

## ÜBER TRITERPENE

VII. DÜNNSCHICHT- UND IONENAUSTAUSCHERPAPIER-  
CHROMATOGRAPHIE VON TRITERPENOIDEN\*

R. TSCHESCHE, F. LAMPERT UND G. SNATZKE\*\*

*Biochemische Abteilung des Chemischen Staatsinstituts, Hamburg (Deutschland)*

(Eingegangen den 29. Juli 1960)

## I. EINLEITUNG

Während die Papierchromatographie der Steroide sehr intensive Bearbeitung erfahren hat (vgl. z.B. die Übersicht von NEHER<sup>2</sup>), ist über die Trennung von Triterpenoiden bisher in der Literatur nur sehr wenig berichtet worden. NISHIOKA<sup>3</sup> hat die Papierchromatographie von einigen Triterpenoiden und Steroiden systematisch behandelt, wobei er Paraffin oder Methylstearat als stationäre Phase verwendete. Als Laufmittel erwiesen sich wässrige Alkohole und die leichten Phasen von Kohlenwasserstoff-Methanol-Wasser-Gemischen als geeignet. Wir konnten die Ergebnisse NISHIOKAs an einigen Beispielen bestätigen, es gelang uns aber nicht, Gemische von isomeren oder verwandten Triterpenoiden zu trennen, da sich die langgezogenen Flecke überdeckten.

HASHIMOTO UND CHATANI<sup>4</sup> arbeiteten ebenfalls nach der "reversed phase"-Methode, indem sie das Papier (Toyo Roshi, No. 52) mit einer Lösung von Dow Corning Silicone No. 1107 imprägnierten und als Laufmittel Alkohole, wässrige Essigsäure oder Toluol-Ammoniak-Gemische (leichte Phase) verwendeten. Auch hier gelang es uns nicht (auf Schleicher & Schüll, sowie Whatman-Papieren), Triterpenoidgemische in diskrete Flecke aufzulösen. TSCHESCHE UND POPPEL<sup>5</sup> erzielten mit dem System Isooctanol-Pentanol-10% wässr. Pyrrolidin-Formamid (6:2:1:4) in Analogie zu der Papierchromatographie von Herzgiften<sup>6</sup> (Imprägnieren des Papiers mit der leichten Phase, Entwickeln mit der wässrigen) eine gute Auftrennung saurer Triterpenoide, wobei man aus dem  $R_F$ -Wert die Anzahl der O-Funktionen abschätzen kann, während isomere Verbindungen hier gleich weit liefen. Triterpen-dicarbonsäuren liessen sich auch sehr gut mit den Gemischen Isooctanol-Pentanol-10% wässr. Morpholin (5:5:7) und Butanol-2 *N* wässr. Ammoniak trennen<sup>1</sup>, wobei in letzteren Fällen die organische Phase als Laufmittel diente.

## II. DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE

Die ausgezeichneten Erfolge, die wir bei Anwendung der Dünnschicht-Chromatographie an Kieselgel G (Merck)<sup>7</sup> auf die Triterpensäuren aus *Bredemeyera floribunda*

\* VI. Mitteilung siehe <sup>1</sup>.

\*\* Neue Anschrift: Bonn, Chemisches Institut der Universität, Meckenheimerallee 168.

Willd.<sup>1</sup> und bei einigen Steroiden<sup>8,9</sup> erzielen konnten, veranlassten uns, dieses sehr einfache Verfahren systematisch auf seine Brauchbarkeit zur schnellen Analyse von Triterpenoiden zu untersuchen. Wie aus den Tabellen I und II hervorgeht, erhielten wir unter Verwendung einfacher Lösungsmittelkombinationen sehr brauchbare Trennungen (siehe auch Fig. 1 und 2). Durch Zusatz von Pyridin oder Diäthylamin

TABELLE I

## DÜNNSCICHT-CHROMATOGRAPHIE DER SÄUREN

Das System I war am allgemeinsten anwendbar und diente als repräsentatives Gemisch. Säuren, die darin Schwänze gaben, wurden in den Systemen II bis V geprüft; auch die übrigen Verbindungen lassen sich darin meist trennen, wobei die  $R_F$ -Werte eine ähnliche Reihenfolge einnehmen, wie im System I.

In dieser und in Tabelle II sind jeweils nur die  $R_F$ -Werte des Hauptflecks angegeben, falls sich die Substanzen als nicht völlig rein erwiesen. Die  $R_F$ -Werte im System I sind immer auf den der Oleanonsäure = 0.68 bezogen. S bei der Angabe der  $R_F$ -Werte bedeutet Schwanzbildung, eingeklammerte Zahlen gelten für Nebenflecke.

Substanz	$R_F$ -Werte in Gemisch*				
	I	II	III	IV	V
Oleanolsäure	0.68	0.64	0.50	0.48	0.96
Ursolsäure	0.68	0.64	0.50		
Betulinsäure	0.68				
Säure aus <i>Alphitonia excelsa</i>	0.68				
Morolsäure	0.59				
Oleanonsäure	0.68				
Masticadienonsäure	0.47				
Isomasticadienonsäure	0.47				
Cochalsäure	0.18 S	0.15 S	0.45	0.29	0.55 S
Bredemolsäure	0.59 S	0.62			0.82
Siaresinolsäure	0.66				
Machaerinsäure	0.23 S	0.27	0.25	0.23	0.54
Guaijavolsäure	0.35				
Dihydroxysäure-Gemisch aus <i>Crataegus oxyacantha</i> L.	0.42 0.54 0.63				
Acantholsäure	0.29				
Bayogenin	0.31				
Sapogenin aus <i>Sideroxylon Pohlms</i>	0.37	0.34 S	0.35		
Chinovasäure	0.55				
Medicagensäure	0.29 S	0.38 S	0.35	0.10 S	0.71
Acetylursolsäure	0.76				
Acantholsäureacetat	0.66				
Emmolsäure	0.59				
Rohe Nimbsäure			Start 0.07 (0.37) S (0.56) S 0.71		

\* Gemische: I: Diisopropyläther-Aceton (5:2); II: Diisopropyläther-Aceton (5:2) mit Zusatz von 5% Pyridin; III: Essigester-Methanol-Diäthylamin (14:4:3); IV: Chlorbenzol-Eisessig (9:1); V: Methylenchlorid-Pyridin (7:2).

TABELLE II

## DÜNNSCICHT-CHROMATOGRAPHIE VON NEUTRALEN TRITERPENOIDEN

Die angegebenen  $R_F$ -Werte stellen Mittelwerte aus mehreren Chromatogrammen dar. Die Substanzen wurden nur immer in den Systemen untersucht, in denen keine zu kleinen oder zu grossen  $R_F$ -Werte auftreten.

Substanz	$R_F$ -Werte in Gemisch*				
	I	VI	VII	VIII	IX
$\beta$ -Amyren			0.82		
$\beta$ -Amyrin				0.12	0.38
$\beta$ -Amyrin-acetat				0.45	
$\alpha$ -Amyrenon				0.31	
Lanosterin		0.75		0.14	0.40
Dihydro-lanosterin-acetat			0.03	0.43	
Ursolsäure-methylester-acetat				0.26	0.77
Oleanolsäure-methylester-acetat				0.24	0.77
Ursonsäure-methylester		0.85			0.51
Crataegolsäure-methylester-monoacetat	0.80	0.40			0.13
Crataegolsäure-methylester-diacetat	0.92	0.72			0.37
Dehydro-crataegolsäure-methylester-diacetat		0.69			0.39
11-Keto-crataegolsäure-methylester-monoacetat	0.77				
Acantholsäure-methylester-monoacetat	0.73				
Echinocystsäure-methylester		0.59			0.15
Emmolsäure-dimethylester		0.73			

\* Gemische: VI: Diisopropyläther; VII: Cyclohexan; VIII: Benzol; IX: Methylenchlorid.

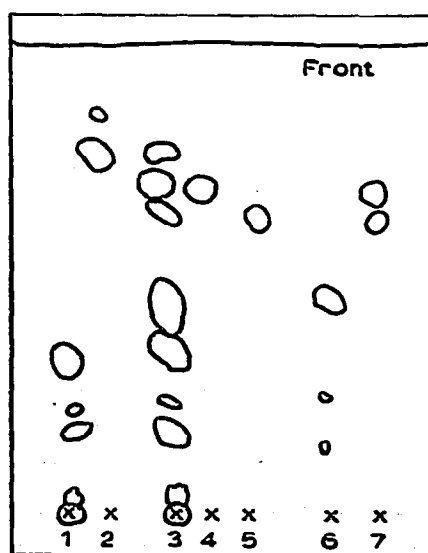


Fig. 1. Dünnschicht-Chromatographie von Triterpen-carbonsäuren im Gemisch I. (1) Nimbsäure (roh); (2) Acetyl-ursolsäure; (3) Gemisch von (1), (2), (4), (5) und (6); (4) Oleanolsäure; (5) Morolsäure; (6) Guaijavolsäure; (7) Gemisch von (4) und (5).

liessen sich bei einigen Substanzen, die auch im Dünnschicht-Chromatogramm zur Schwanzbildung neigten, diskrete Flecke erzielen.

Der Vorteil gegenüber den bisher beschriebenen Verfahren liegt erstens darin, dass die gesamte Zeitdauer für ein Chromatogramm auf 20–30 Minuten reduziert ist; zweitens liessen sich Verbindungen mit verschiedenem  $R_F$ -Wert auch in Vielkomponenten-Gemischen gut trennen; drittens ist diese Methode ebenfalls auf neutrale Triterpenoide (Ester, Alkohole, Kohlenwasserstoffe) anwendbar und viertens

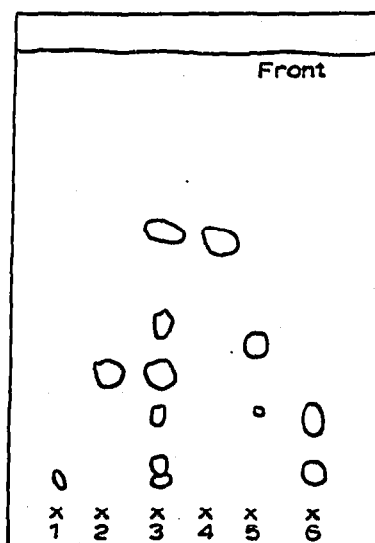


Fig. 2. Dünnschicht-Chromatogramm von Triterpencarbonsäure-estern im Gemisch IX. (1) Crataegolsäure-methylester-monoacetat; (2) Crataegolsäure-methylester-diacetat; (3) Gemisch von (1), (2), (4), (5) und (6); (4) Ursolsäure-methylester-acetat; (5) Ursolsäure-methylester; (6) Echinocystsäure-methylester (Hauptfleck mit kleinerem  $R_F$ -Wert).

ist die Empfindlichkeit der zum Nachweis verwendeten Farbreaktion mit Chlor-sulfonsäure<sup>8</sup> ausserordentlich gross. So ist im entwickelten Chromatogramm noch 0.02  $\gamma$  Oleanolsäure bequem nachweisbar. Dieses Verfahren ist daher auch zur raschen Kontrolle von Reaktionsansätzen und zur Prüfung auf Reinheit sehr geeignet. Die Reproduzierbarkeit der  $R_F$ -Werte ist von der jeweils verwendeten Kieselgel-Charge und von der Dicke der Schicht abhängig. Es ist daher ratsam, eine Standard-Substanz (z.B. Oleanolsäure) auf jeder Platte mitlaufen zu lassen und die  $R_F$ -Werte darauf zu beziehen.

### III. IONENAUSTAUSCHERPAPIER-CHROMATOGRAPHIE

Wie aus Tabelle I hervorgeht, sind die isomeren Verbindungen Oleanol-, Ursol- und Betulinsäure im Dünnschicht-Chromatogramm nicht voneinander zu trennen, während die Morolsäure einen kleineren  $R_F$ -Wert annimmt. Da es uns nicht gelang, durch Variation des Laufmittels (auch nicht durch Verwendung von  $Al_2O_3$  G (Merck) oder durch Herstellen saurer oder basischer "Ionenaustauscher-Platten" durch Anfeuchten mit Salzsäure oder Ammoniak) hier eine Trennung zu erreichen, versuchten wir eine solche auf Ionenaustauscherpapier zu erzielen. MYHRE UND SMITH<sup>10</sup>

berichteten bereits 1958 über die erfolgreiche Trennung verschiedener stark polarer organischer Säuren, wie Gluconsäure, Glucuronsäure, Ascorbinsäure und verschiedener Aminosäuren. Unter Verwendung der Angaben von DAVIES UND OWEN<sup>11</sup>, die an Ionenaustauscher-Säulen nahe verwandte Säuren mithilfe von organischen Lösungsmitteln trennen konnten, versuchten wir diese Methode auf die schwach polaren Triterpen-carbonsäuren zu übertragen.

Zur Verwendung gelangte das Anionenaustauscherpapier der Firma Schleicher & Schüll. Als Laufmittel erwiesen sich nach einer Reihe von Vorproben mit 99 %iger Ameisensäure gesättigte Lösungsmittel wie Cyclohexan (mit 20 bis 40 % Toluol- oder Xylol-Zusatz) und Methylcyclohexan-Chloroform-Gemische als am besten geeignet (siehe Tabelle III). Es wurde dabei nach der aufsteigenden Methode gearbeitet. Die Anfärbung geschah mit dem Zinntetrachlorid-Reagens<sup>5</sup>, bei damit nur schlecht reagierenden Triterpensäuren mit  $\text{SbCl}_3$ - $\text{SbCl}_5$ -Gemischen. Im System X treten allerdings diskrete Flecke erst bei mehrstündigem Liegen nach der  $\text{SnCl}_4$ -Anfärbung hervor. Fig. 3 zeigt die Trennung von Oleanol-, Ursol- und Betulinsäure im Gemisch XI. Zur Identifizierung diente ausser dem  $R_F$ -Wert auch noch die unterschiedliche Anfärbbarkeit mit  $\text{SbCl}_3$ - $\text{SbCl}_5$ ; die ersten beiden Säuren werden dabei violett, Betulinsäure gelbbraun. Auf diese Weise konnte nach Anreicherung durch mehrmaliges Umkristallisieren in der "Crataegussäure" die Oleanolsäure neben der Ursolsäure nachgewiesen werden (Gemisch X)<sup>12</sup>.

TABELLE III

## IONENAUSTAUSCHERPAPIER-CHROMATOGRAPHIE SAURER TRITERPENOIDE

Die angegebenen  $R_F$ -Werte beziehen sich auf die Mittelpunkte der etwas länglichen Flecke, "S" bedeutet längere Schwanzbildung.

Substanz	$R_F$ -Werte im Gemisch*		
	X	XI	XII
Oleanolsäure	0.30	0.30	
Ursolsäure	0.12	0.13	
Betulinsäure	0.45 S	0.43	
Dihydroxysäure-Gemisch aus <i>Crataegus oxyacantha</i> L.			0.28
			0.40
			0.51
Acantholsäure			0.18
Bayogenin			0.30

\* Gemische: X: Cyclohexan-Toluol (4:1), gesättigt mit Ameisensäure; XI: Methylcyclohexan-Chloroform (4:1), gesättigt mit Ameisensäure; XII: Methylcyclohexan-Chloroform (1:1), gesättigt mit Ameisensäure.

Die Ionenaustauscherpapier-Chromatographie lässt sich auch zur Untersuchung von polareren Triterpencarbonsäuren verwenden. So konnten im rohen Dihydroxymonocarbonsäure-Gemisch aus *Crataegus oxyacantha* L.<sup>5</sup> im System XII drei Substanzen nachgewiesen werden, welche der Crataegolsäure, Neotaegolsäure und einer noch unbekanntem Säure zukommen müssen (vgl. Fig. 4). Von den Trihydroxymonocarbonsäuren konnten aus Materialmangel nur Acantholsäure und Bayogenin

geprüft werden. Auch diese liessen sich unter Verwendung von System XII auf-trennen.

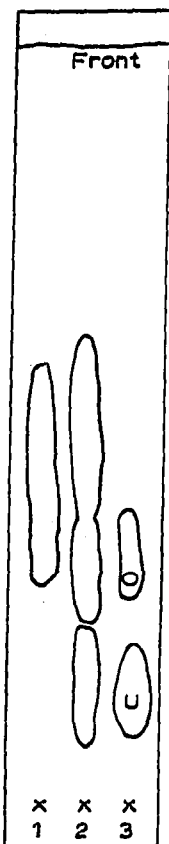


Fig. 3. Ionenaustauscherpapier-Chromatographie. Monohydroxy-triterpen-carbonsäuren im Gemisch XI. (1) Betulinsäure; (2) Gemisch von (1) und (3); (3) Ursolsäure (U) + Oleanol-säure (O). Bei Anfärbung mit  $\text{SbCl}_5$ - $\text{SbCl}_5$  erhält man von der Ursol- und der Oleanol-säure rotviolette Flecke; die Betulinsäure erscheint gelbbraun und ist damit trotz des Ineinanderfließens der Flecke von Oleanol- und Betulinsäure gut identifizierbar.

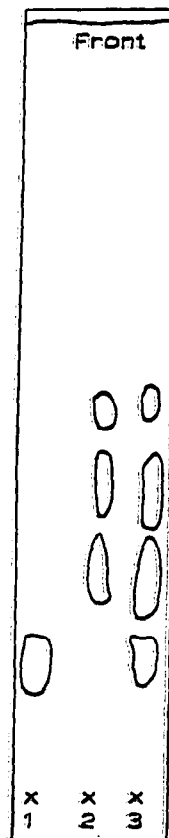


Fig. 4. Stärker hydroxylierte Triterpen-carbonsäuren im Gemisch XII. (1) Acantholsäure; (2) Dihydroxysäure-Gemisch aus *Crataegus oxyacantha* L.; (3) Gemisch von (1) und (2).

#### IV. EXPERIMENTELLER TEIL

##### (a) Dünnschicht-Chromatographie

Auf die Glasplatten wurde in der früher beschriebenen Weise<sup>8</sup> ein Gemisch von Kieselgel G "zur Dünnschicht-Chromatographie" (Merck) und Wasser 1:3 mit einem breiten Spatel gleichmässig ausgestrichen und bei 130° getrocknet. Zur Anfärbung wurde nach dem Trocknen der entwickelten Platten mit einer Lösung von Chlorsulfonsäure in Eisessig (1:2) besprüht, 5 Minuten lang bei 130° gehalten und bei Tageslicht und unter der U.V.-Lampe betrachtet. Die Flecken waren meist violett bis bräunlich gefärbt, Nimbsäure<sup>13</sup> erschien grün. Die Anfärbung kann aber ebensogut mit den üblichen sauren Triterpenreagenzien ausgeführt werden.

An Tagen mit hoher Luftfeuchtigkeit können die  $R_F$ -Werte besonders dann, wenn die Platten längere Zeit der Luft ausgesetzt waren, unverhältnismässig gross werden. Denselben Effekt kann man auch durch Einstellen der fertigen Platten in Gefässe mit wassergesättigter Atmosphäre erzielen. Um ihn auszuschliessen, trocknet man zweckmässigerweise vor dem Einbringen in die Chromatographiegefässe 2 Minuten lang bei  $100^\circ$ , um das vom Kieselgel adsorbierte Wasser zu entfernen.

#### *(b) Ionenaustauscherpapier-Chromatographie*

Anionenaustauscherpapier der Firma Schleicher & Schüll wurde in Streifen von  $3 \times 20$  cm geschnitten, auf die 1 cm vom Rand entfernt bis zu 3 Flecken nebeneinander aufgetragen werden konnten. Die Laufmittel wurden durch kräftiges Durchschütteln der angegebenen Lösungsmittelgemische mit 20 % ihres Volumens an käuflicher 99 %iger Ameisensäure bereit. Nach Abtrennung der schweren Phase im Schütteltrichter wurde die leichte zur Entwicklung der Chromatogramme verwendet.

Es wurde nach der aufsteigenden Methode in entsprechend grossen Reagenzgläsern gearbeitet, anschliessend wurden die Streifen 15 Minuten lang bei  $100^\circ$  getrocknet. Eine vorherige Überführung des Papiers in die Formiat-form brachte keine Vorteile. Auf absteigenden Chromatogrammen wurden sehr langgezogene Flecke erhalten.

Meist wurden die Substanzen nach TSCHESCHE UND POPPEL<sup>5</sup> mit einer Lösung von 10 ml  $\text{SnCl}_4$  in 160 ml eines Eisessig-Tetrachlorkohlenstoff-Gemisches (1:1) sichtbar gemacht, wobei nach 5-minütiger Erwärmung auf  $100^\circ$  rotviolette Tönungen erhalten werden. Im System X scheinen dabei die einzelnen Flecke zunächst ineinander überzugehen, nach mehrstündigem Liegen treten aber auch hier die Hauptmaxima deutlich hervor. Auf diese Weise nur schwer anfärbbare Verbindungen, die auch mit  $\text{SbCl}_3$  oder  $\text{SbCl}_5$  allein kaum nachgewiesen werden konnten, erschienen aber deutlich nach aufeinanderfolgender Behandlung mit  $\text{SbCl}_3$  (10 %ige Lösung in Chloroform, Streifen 2 Minuten lang auf  $100^\circ$  erhitzen) und  $\text{SbCl}_5$  (40 %ige Lösung in Chloroform, bei Zimmertemperatur entwickeln). Stattdessen lässt sich auch ein Gemisch von  $\text{SbCl}_3$ - $\text{SbCl}_5$  (10:1) (10 %ige Lösung in Chloroform, Streifen 1-2 Minuten lang erhitzen auf  $100^\circ$ ) verwenden. Auch hierbei tritt meist eine rotviolette Farbe auf, während aber z.B. Betulinsäure gelbbraun erscheint.

#### DANK

Für die Überlassung einiger der in den Tabellen erwähnten Substanzen möchten wir auch hier den Herren Prof. Dr. H. R. ARTHUR (Hongkong), Prof. Dr. D. H. R. BARTON (Glasgow), Prof. Dr. C. DJERASSI (Stanford), Dr. N. S. NARASIMHAN (Poona) und Dr. J. J. H. SIMES (Sydney) bestens danken.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es werden verschiedene Lösungsmittelsysteme angegeben, mit denen es gelingt, auf Dünnschichtplatten saure und neutrale Triterpenoide auch in komplexeren Mischun-

gen zu trennen. Oleanol-, Ursol- und Betulinsäure, die damit nicht unterscheidbar sind, können aber an basischem Ionenaustauschepapier voneinander getrennt werden. Auch für andere polarere Triterpencarbonsäuren ist dieses Verfahren brauchbar.

## SUMMARY

Some solvent systems are described for the separation of acidic and neutral triterpenoids on chromatoplates, even in the case of complex mixtures. Oleanolic, ursolic and betulinic acids, which cannot be distinguished by this method, are separable on basic ion-exchange paper. This technique is also useful for other more polar acidic triterpenoids.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> R. TSCHESCHE UND A. K. SEN GUPTA, *Chem. Ber.*, 93 (1960) 1903.
- <sup>2</sup> R. NEHER, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 122 und 205.
- <sup>3</sup> I. NISHIOKA, *J. Pharm. Soc. Japan*, 78 (1958) 1428; 79 (1959) 1457.
- <sup>4</sup> Y. HASHIMOTO UND J. CHATANI, *Chem. and Pharm. Bull. (Japan)*, 7 (1959) 127.
- <sup>5</sup> R. TSCHESCHE UND G. POPPEL, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 320.
- <sup>6</sup> R. TSCHESCHE, G. GRIMMER UND F. SEEHOFER, *Chem. Ber.*, 86 (1953) 1235.
- <sup>7</sup> E. STAHL, *Chemiker-Ztg.*, 82 (1958) 323.
- <sup>8</sup> R. TSCHESCHE, W. FREYTAG UND G. SNATZKE, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 3053.
- <sup>9</sup> R. TSCHESCHE UND G. SNATZKE, *Ann.*, 636 (1960) 105.
- <sup>10</sup> D. V. MYHRE UND F. SMITH, *J. Org. Chem.*, 23 (1958) 1229.
- <sup>11</sup> C. W. DAVIES UND B. D. R. OWEN, *J. Chem. Soc.*, (1956) 1681.
- <sup>12</sup> TH. BERSIN UND A. MÜLLER, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 1891.
- <sup>13</sup> N. S. NARASIMHAN, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 769.