

## Dünnschicht-Chromatographie

### IX. Mitteilung. Schnelltrennung von Digitalis- und Podophyllum-Glycosidgemischen

Zur Chromatographie kleinster Mengen von Herzglycosidgemischen werden zur Zeit vorzugsweise die von SCHINDLER UND REICHSTEIN<sup>1</sup>, TSCHESCHE und Mitarb.<sup>2</sup> und KAISER<sup>3</sup> ausgearbeiteten Verfahren auf den mit Formamid oder Octanol imprägnierten Papieren verwendet. Vor zehn Jahren haben STOLL und Mitarb.<sup>4</sup> auf die Leistungsfähigkeit von Silicagel-Säulen zur Trennung derartiger Gemische aufmerksam gemacht. Nach unseren bisherigen Erfahrungen<sup>5</sup> war zu erwarten, dass der Übergang von der "geschlossenen" zur "offenen" Kieselgel-Schicht auch auf dem Gebiet der Steroid-, Triterpen- und Lignanglycoside neben einer Zeitersparnis, eine verbesserte Trennung und eine Spurenanalyse bringen würde.

Unsere Versuche ergaben, dass auf Kieselgel G-Schichten\* mit verschiedenen Elutionsgemischen eine Schnelltrennung der genannten Glycosidgruppen möglich ist. So lassen sich z.B. mit einem Methylenchlorid-Methanol-Formamid-Gemisch (80 + 19 + 1; Vol. Teile) auf einer Trennstrecke von 10 bis 12 cm in einer halben Stunde alle 14 uns zur Verfügung stehenden Digitalisglycoside sauber auftrennen. Zur Sichtbarmachung bevorzugten wir neben dem Antimon(III)-Chlorid Reagenz vor allem die von KAISER<sup>3</sup> verwendete Trichloressigsäure-Chloramin-Reaktion. Hiermit lassen sich auf der Kieselgelschicht die Herzglycoside z.T. bis 0.1  $\mu\text{g}$  bei Tageslicht erkennen. Im ultravioletten Licht werden hiermit noch Mengen bis 0.01  $\mu\text{g}$  gut sichtbar. Vergleichsweise sei angeführt, dass bei den genannten papierchromatographischen Methoden die untere Erfassungsgrenze mit 3–5  $\mu\text{g}$  angegeben wird und die Trennzeit zwischen 3 und 14 Stunden liegt<sup>3</sup>. Da nahe beieinanderliegende  $R_F$ -Werte keine Aussage über die Trennmöglichkeiten der Substanzen machen, ist in der Fig. 1 ein im Durchlicht nachgezeichnetes Dünnschicht-Chromatogramm wiedergegeben. Auf gleiche Weise lassen sich auch *Strophanthus*-, *Scilla*-, *Convallaria*- und ähnliche Herzglycosidgemische auftrennen. Die Möglichkeiten der quantitativen Auswertung nach dem Abschaben der Zone und Elution der Glycoside ist wie bei den *Rauwolfia*-Alkaloiden<sup>6</sup> gegeben.

Durch die Arbeiten von VON WARTBURG und Mitarb.<sup>7</sup> ist bekannt, dass auch die Lignane der beiden medizinisch verwendeten *Podophyllum*-Arten ursprünglich in glycosidischer Bindung vorliegen. Sie werden vor allem bei der Bereitung des Harzes (Podophyllin) zerlegt. Die harzreiche, nicht im DAB.6. offizielle, indische Droge (*Podophyllum emodi* Wall.) enthält im Gegensatz zum offiziellen Podophyllin (*P. peltatum* L. aus U.S.A.) kein  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peltatin, sondern 4'-Demethylpodophyllo-toxin<sup>7</sup>. Hierauf lässt sich eine einfache Unterscheidung der morphologisch sehr ähnlichen Wurzel drogen und auch der Podophylline<sup>8</sup> aufbauen.

Eine Trennung der Lignanglycoside und der Aglukone erreichten wir mit der

\* Die Herstellung erfolgte mit Kieselgel G "Merck" und der Desaga-Grundausrüstung zur Dünnschicht-Chromatographie Nr. 600 nach der Arbeitsvorschrift von E. STAHL.

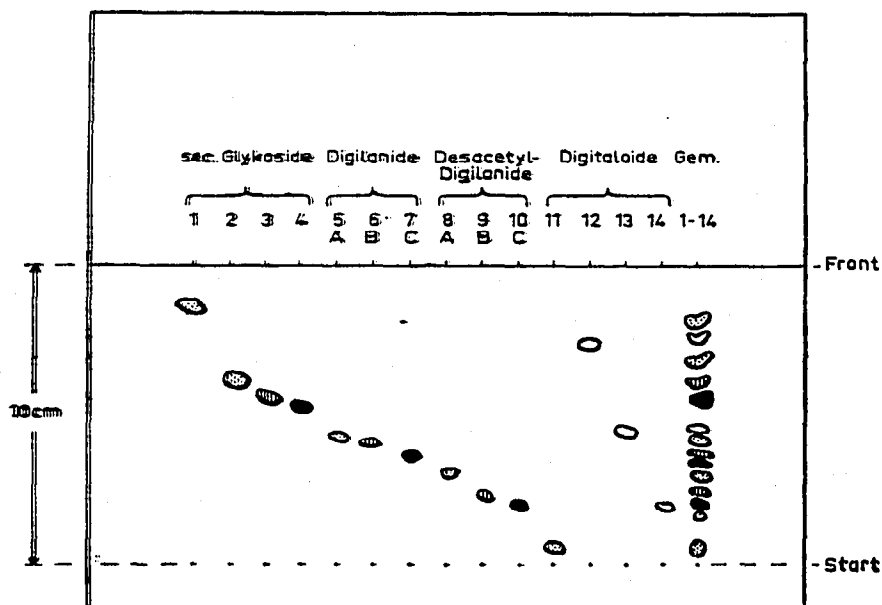


Fig. 1. Dünnschicht-Chromatogramm von Herzglycosiden (je 1  $\mu\text{g}$ ) auf einer Kieselgel G-Schicht. (KÜS)<sup>9</sup>. 1. Acetyldigitoxin; 2. Digitoxin; 3. Gitoxin; 4. Digoxin; 5. Digilanid A; 6. Digilanid B; 7. Digilanid C; 8. Desacetyldigilanid A; 9. Desacetyldigilanid B; 10. Desacetyldigilanid C; 11. k-Strophantosid; 12. Cymaridin; 13. Proscillaridin A; 14. Scillaren A. G-Gemisch aus gleichen Teilen der Substanzen 1–14. Sichtbarmachung: Trichloressigsäure-Chloramin (15 + 1), 10 Min. 110°. Im langwelligen UV-Licht: Fluoreszenz hellgelb = □, braungelb = ▨, hellblau = ▧, violett-blau = ■.

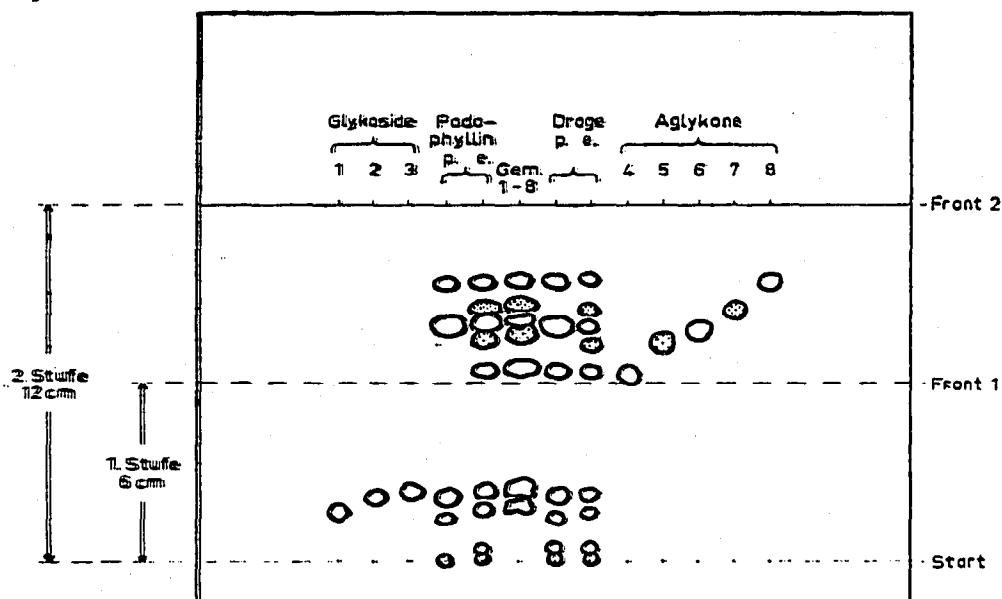


Fig. 2. Dünnschicht-Chromatogramm der *Podophyllum*-Inhaltsstoffe (Kieselgel G; Stufentechnik). 1.  $\alpha$ -Peltatin- $\beta$ -glucosid; 2. Podophyllotoxin-glucosid; 3.  $\beta$ -Peltatin- $\beta$ -D-glucosid; 4. 4'-Demethylpodophyllotoxin; 5.  $\alpha$ -Peltatin; 6. Podophyllotoxin; 7.  $\beta$ -Peltatin; 8. 1-Deshydroxy-podophyllotoxin. Die punktiert gezeichneten Zonen reagieren zusätzlich mit Diazoniumsalzen unter Farbbildung (e. = emodi, p. = peltatum). Von den Reinsubstanzen wurde je 1.0  $\mu\text{g}$ , von den Podophyllinen und der Droge wurde 0.5 mm<sup>3</sup> der 10%igen alkoholischen Auszüge aufgetragen (KÜS).

bereits früher beschriebenen Stufentechnik<sup>9</sup>. Das in der 1. Stufe verwendete Gemisch (Chloroform + 10 % Methanol) trennt die Glycoside. Im der 2. Stufe werden mit Chloroform + 35 % Azeton die Aglukone getrennt (Fig. 2). Zwischen beiden Stufen wurde in 5 Minuten mit einem Kaltluftstrom das 1. Elutionsmittel entfernt. Die Trennzeit betrug etwa 15 + 45 Minuten. Zur Sichtbarmachung wurde eine Mischung von konz. Schwefelsäure + Essigsäureanhydrid (1 + 3) aufgesprüht und 15 Minuten auf 100° erhitzt. Die Substanzen traten danach als rote bzw. granviolette Zonen hervor. Die untere Erfassungsgrenze liegt bei 0.3 µg. Die Fig. 2 lässt erkennen, dass auf diesem Wege eine Unterscheidung der beiden *Podophyllum*-Arten und der hieraus gewonnenen amorphen Harze gut gelingt. Ferner zeigt das Chromatogramm, dass auch im Harz noch kleine Mengen der entsprechenden Lignanglycoside enthalten sind. Abschliessend darf noch erwähnt werden, dass sich die bei der Hydrolyse anfallenden Zucker auf gepufferten Kieselgur G-Schichten im 30 Minuten trennen und bis 0.05 µg nachweisen lassen<sup>10</sup>.

Für die grosszügige Überlassung der Reinsubstanzen sind wir der Sandoz A. G. (Basel), insbesondere Herrn Dr. A. HOFMANN, sehr dankbar.

*Botanisches Institut der Universität des Saarlandes, Saarbrücken (Deutschland)*

EGON STAHL

ULRICH KALTENBACH

- <sup>1</sup> O. SCHINDLER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1108.
- <sup>2</sup> R. TSCHESCHE, G. GRIMMER UND F. SEEHOFER, *Chem. Ber.*, 86 (1953) 1235.
- <sup>3</sup> F. KAISER, *Chem. Ber.*, 88 (1955) 556.
- <sup>4</sup> A. STOLL, E. ANGLIKER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL UND J. RENZ, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1460.
- <sup>5</sup> E. STAHL, *Z. anal. Chem.*, Sonderheft im Druck (1961).
- <sup>6</sup> F. SCHLEMMER UND E. LINK, *Pharm. Ztg.*, 104 (1959) 1349.
- <sup>7</sup> A. VON WARTBURG, E. ANGLIKER UND J. RENZ, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1331.
- <sup>8</sup> H. AUTERHOFF UND O. MAY, *Planta Med.*, 6 (1958) 240.
- <sup>9</sup> E. STAHL, *Arch. Pharm.*, 292/64 (1959) 411.
- <sup>10</sup> E. STAHL UND U. KALTENBACH, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 351.

Eingegangen den 6. Januar 1961

*J. Chromatog.*, 5 (1961) 458-460