

Chromatographie von Steroiden und Triterpenen an käuflichen Kieselgel- und Aluminiumoxyd-Papieren

Zur Trennung von Steroiden und Triterpenen auf Papier ist im allgemeinen eine Vorbehandlung desselben erforderlich (vgl. die Zusammenfassungen von NEHER¹ und BUSH²). Meist geschieht dies durch direkte (ZAFFARONI- und reversed-phase-Systeme) oder indirekte (BUSH-Systeme) Imprägnierung mit einer geeigneten Flüssigkeit, gelegentlich auch durch Silikonieren oder chemische Veränderung der Cellulose (z.B. Acetylierung); anorganische Salze dienen nur in Einzelfällen zum Hydrophobieren³⁻⁵. In den letzten Jahren kam dazu die Dünnschichtchromatographie, deren Vorteil in der häufig ausgezeichneten Trennschärfe, der kurzen Laufzeit und der um etwa 2 Größenordnungen empfindlicheren Anfärbbarkeit liegt (vgl. die Übersichtsreferate von DEMOLE⁶ und STAHL⁷). Nachteilig ist die umständlichere Dokumentation und der – wenn auch nur geringe – Aufwand bei der Herstellung der Platten.

Vor kurzem kamen nun von zwei Firmen Papiere in den Handel*, die bis zu 40 % anorganisches Pigment eingelagert enthalten. Sie schienen die Vorteile beider Trennverfahren in sich zu vereinen und wurden daher zur Chromatographie von Steroiden und Triterpenen herangezogen. Wir arbeiteten nach der aufsteigenden Technik (zur Trennung eng beieinander liegender Flecke nach der Keilstreifenmethode) und ähnlich wie bei der Dünnschichtchromatographie genügt im allgemeinen eine Laufstrecke von etwa 10 cm, da die Flecke sehr klein bleiben. Der Zeitaufwand beträgt dafür etwa 15–20 Minuten. Zur Anfärbung kann mit ziemlich aggressiven Reagenzien eingesprüht werden; sehr gut eignet sich zuerst SbCl_3 (20 % in Chloroform), 2 Min. bei 100°, wonach die Flecke bei Tageslicht und unter der U.V.-Lampe betrachtet werden. Anschliessend besprüht man mit SbCl_5 (40 % in Chloroform) und hält nochmals 2 Min. auf 100°; die meisten Flecke treten nun schon bei Tageslicht deutlich hervor. 0.05 μg Cholesterin sind so z.B. noch im entwickelten Chromatogramm (Aluminiumoxyd-Papier) sichtbar zu machen. Nach Besprühen mit Chlorsulfonsäure (33 % in Eisessig⁸) kann etwa 80 Sek. lang auf 100° erhitzt werden, ohne dass die Papiere braun werden. Für Dokumentationszwecke überziehen wir solche Chromatogramme beidseitig mit selbstklebender Polyäthylenfolie. Von geeigneten Substanzen können auch direkt Kontaktfotogramme hergestellt werden. Allerdings muss man länger belichten, als bei gewöhnlichen Papieren.

Wie aus den Tabellen I bis VI hervorgeht, sind die neuen Papiere für alle Typen von Steroiden und für Triterpene brauchbar; die Trennfähigkeit ist ähnlich gut wie bei der Dünnschichtchromatographie und in manchen Fällen ergänzen sich beide

* Aluminiumoxydpapier Nr. 288 und Kieselgelpapier Nr. 289 mit je 35–40 % anorganischem Pigment der Fa. Schleicher u. Schüll, Dassel, beide bereits im Handel erhältlich. – Whatman TAL/A 1 mit 3 % und TAL/A 2 mit 7.5 % Al_2O_3 und TAL/S 1 mit 7 % sowie TAL/S 2 mit 11 % SiO_2 der Fa. H. Reeve Angel u. Co., Ltd., London. Letztere Papiere dürften demnächst ausgeliefert werden.

Methoden. So liess sich auf Papier Δ^4 -Cholesten- $3\beta,6\beta$ -dioldiacetat bisher nicht von seinem 3α -Epimeren trennen, dagegen wies z.B. dünnschichtchromatographisch reiner Oleanolsäuremethylester auf dem Papier zwei deutlich sichtbare Nebenflecke auf. Die Trennung der in Tabelle I angegebenen fünf Δ^4 -3-Ketone von ihren zugehörigen $\Delta^{1,4}$ -Dehydrierungsprodukten konnte bisher ebenfalls nur zum Teil auch auf der Dünnschichtplatte erzielt werden. Sehr gut eignen sich die Papiere auch zur schnellen Verfolgung von Reaktionsansätzen. Um störende Einflüsse der dabei verwendeten Lösungsmittel (z.B. Acetanhydrid bei Acetylierungen) auszuschalten, empfiehlt es sich, ein System auszuwählen, das zu einigen Prozent diese Komponente enthält.

TABELLE I*
 R_F -WERTE VON C_{19} - UND C_{21} -STEROIDEN

Substanz	R_F -Werte im Gemisch		
	\dot{A} -Chl (10:1)		Bz-Eg (9:1)
	KG	AL	AL
Testosteron	0.45 (0.48)	0.09 (0.38)	
Δ^5 -Androsten- 3β -ol-17-on	0.57 (0.59)	0.15 (0.41)	
Δ^5 -Pregnen- 3β -ol-20-on	0.65 (0.71)	0.18 (0.46)	
Progesteron	0.60 (0.66)	0.31 (0.55)	
16-Methylen-Reichstein-S-21-acetat			0.70
1-Dehydro-16-methylen-Reichstein-S-21-acetat			0.66
16-Methylen-hydrocortison-21-acetat			0.56
1-Dehydro-16-methylen-hydrocortison-21-acetat			0.50
16-Methylen-cortison-21-acetat			0.66
1-Dehydro-16-methylen-cortison-21-acetat			0.58**
Δ^4 -16-Methylen- $9\beta,11\beta$ -oxido-pregnen-17 $\alpha,21$ -diol-3,20-dion-21-acetat			0.60
$\Delta^{1,4}$ -16-Methylen- $9\beta,11\beta$ -oxido-pregnadien-17 $\alpha,21$ -diol-3,20-dion-21-acetat			0.56
$\Delta^{4,6}$ -16-Methylen- $9\beta,11\beta$ -oxido-pregnadien-17 $\alpha,21$ -diol-3,20-dion-21-acetat			0.65
$\Delta^{1,4,6}$ -Methylen- $9\beta,11\beta$ -oxido-pregnatrien-17 $\alpha,21$ -diol-3,20-dion-21-acetat			0.60

* Die R_F -Werte können von Bogen zu Bogen stark schwanken, die relative Lage der Flecke zueinander ändert sich dagegen nur unwesentlich. In den Tabellen wurden im allgemeinen nur dann Werte angegeben, wenn keine Schwanzbildung eintritt oder der Fleck nicht zu nahe am Start oder an der Front liegt. Die direkt angegebenen R_F -Werte beziehen sich auf Schleicher u. Schüll-Papiere, die eingeklammerten Zahlen auf Whatman-Papiere (TAL/A 2 bzw. TAL/S 2). Abkürzungen: KG = Kieselgel-Papier; AL = Aluminiumoxyd-Papier. Lösungsmittel: PÄ = Petroläther (40–60°); Bz = Benzol; Ä = Diisopropyläther; Chl = Chloroform; Me = Methanol; Al = Äthanol; Ee = Essigester; Eg = Eisessig; Py = Pyridin.

** Anfärbung mit Millon's Reagenz.

TABELLE II
R_F-WERTE VON STERINEN UND DEREN DERIVATEN
 (vgl. auch Fig. 1)

Substanz	<i>R_F</i> -Werte im Gemisch	
	KG	AL
	<i>PÄ</i>	
<i>i</i> -Cholesterin	0.14	0.31
B-nor-Cholesterin-acetat	0.15	0.22
Cholesteryl-rhodanid	0.24	0.24
Thiocholesterin	0.79	0.70
Cholesteryl-chlorid	0.93	0.84
Cholesteryl-bromid	0.93	0.85
	<i>PÄ-Py (50:0.2)</i>	
Δ^5 -Cholesten-3-on-äthylenketal	0.52	0.60
<i>epi</i> -Cholesterin-acetat	0.60	0.24
Cholestan-3 α -ol-acetat	0.64	0.27
Cholestan-3 β -ol-methyläther	0.64	0.37
Cholesterin-acetat	0.70	0.31
Cholestan-3 β -ol-acetat	0.73	0.38
Cholesterin-methyläther	0.75	0.50
Cholestan-3 α -ol-methyläther	0.80	0.63
	<i>Chl + 1% Me</i>	
Cholestan-3 β ,5-diol-6-on	0.19 (0.11)	0.06 (0.08)
Koprostan-3 β ,6 β -diol	0.56 (0.48)	0.37 (0.45)
Cholestan-3 β ,5-diol	0.63 (0.57)	0.48 (0.52)
Cholestan-3 β ,7 β -diol	0.66 (0.54)	0.62 (0.64)
	<i>A'</i>	
Cholestan-3 β ,5,6 β -triol-6-monoacetat	0.19 (0.24)	0.04 (0.11)
Cholestan-3 β ,5,6 β -triol-3-methyläther	0.36 (0.44)	0.12 (0.33)
Cholestan-3 β ,5,6 β -triol-3-methyläther-6-acetat	0.35 (0.47)	0.12 (0.32)
Cholestan-3 α ,5,6 β -triol	0.44 (0.51)	0.28 (0.24)

(Fortsetzung S. 113)

TABELLE II (Fortsetzung)

Substanz	<i>R_F</i> -Werte im Gemisch	
	<i>KG</i>	<i>AL</i>
	<i>Bz</i>	
B-nor-Cholesterin	0.28	0.20
Δ^4 -Cholesten-3-on	0.29	0.32
Cholesterin	0.30	0.08
Ergosterin	0.30	0.04
Cholestan-3 β -ol	0.32	
Cholesterin-dibromid	0.38	0.26
Lanosterin	0.57	0.18
<i>i</i> -Cholesterin	0.57	0.82
B-nor-Cholesterin-acetat	0.58	0.88
Cholestan-3-on	0.60	0.48
	<i>Bz-Py (100:1)</i>	
Cholestan-3 β ,7 β -diol	0.09	Start
Δ^4 -Cholesten-6 β -ol-3-on	0.39	0.12
Cholestan-3 β ,5,6 β -triol-3,6-diacetat	0.43	0.11
Cholesterin	0.57	0.22
Cholestan-3 β ,5-diol-6-on-3-acetat	0.58	0.15
	(0.49)	(0.44)
Lanosterin	0.69	0.46
Δ^4 -Cholesten-3 β ,6 β -diol-diacetat	0.70	0.85
	(0.67)	(0.67)
Cholestan-3 β ,5-diol-6-on-3-tosylat-5-acetat	0.78	0.31
	(0.71)	(0.51)
<i>i</i> -Cholesterin	0.83	0.94
Ergosterin		0.22
Cholestan-3 β -ol		0.23

TABELLE III

R_F-WERTE VON GALLENSÄUREN UND DEREN DERIVATEN

Substanz	<i>R_F</i> -Werte im Gemisch				
	<i>Ä-Bz-Eg (6:6:1)</i>		<i>Ä-Bz-Eg (20:20:1)</i>		<i>Me + 5% Eg</i> <i>AL</i>
	<i>KG</i>	<i>AL</i>	<i>KG</i>	<i>AL</i>	
Cholsäure		0.35	0.14		0.61
Desoxy-cholsäure	0.62	0.40	0.16		0.61
Biliansäure		0.40			0.65
Isobiliansäure	0.47	0.53	0.28		0.67
3,7,12-Triketo-cholansäure	0.62	0.62	0.48	0.15	0.60
					(0.81)
Cholansäure	0.94	0.90	0.94	0.59	0.55
					(0.76)
Desoxy-biliansäure					0.65
					(0.82)

TABELLE IV
R_F-WERTE VON SPIROSTANOLEN

Substanz	R _F -Werte im Gemisch				Ee-Eg AL (9:1)
	Ä-Al (20:1)		Ä		
	KG	AL	KG	AL	
Necoruscogenin	0.39 (0.44)	0.15 (0.27)			
Isorhodea-sapogenin			0.43 (0.57)	0.08 (0.35)	
Kammogenin-diacetat			0.64 (0.65)	0.40 (0.66)	
Gitogenin-diacetat	0.66 (0.50)	0.12 (0.26)			
Diosgenin			0.67 (0.64)	0.22 (0.47)	
Hecogenin	0.69 (0.63)	0.46 (0.68)			
Sarsasapogenin			0.71 (0.61)	0.38 (0.59)	
Gentrogenin-acetat			0.72 (0.71)	0.49 (0.77)	
Hecogenon	0.81 (0.72)	0.79 (0.87)			
Digitogenin					0.32
Gitogenin					0.86

TABELLE V
R_F-WERTE VON CARDENOLID-DERIVATEN

Substanz	R _F -Werte im Gemisch			
	Ä + 5% Al		Ä + 10% Al	
	KG	AL	KG	AL
Clepogenin			0.11 (0.13)	(0.13)
Gitoxin			0.23 (0.24)	(0.19)
Ouabagenin-1,5,19-orthoformiat			0.31 (0.18)	0.07 (0.27)
Evomonosid			0.36 (0.40)	(0.15)
Gitaloxin			0.36 (0.38)	0.13 (0.35)
Digitoxin			0.42 (0.42)	(0.39)

(Fortsetzung S. 115)

TABELLE V (Fortsetzung)

Substanz	<i>R_F-Werte im Gemisch</i>			
	<i>A + 5% Al</i>		<i>A + 10% Al</i>	
	<i>KG</i>	<i>AL</i>	<i>KG</i>	<i>AL</i>
Sarmentogenin	0.43 (0.21)	0.19 (0.49)		
Coroglaucigenin			0.47 (0.35)	0.23 (0.33)
Ouabagenin-tetraacetat			0.51 (0.36)	0.35 (0.61)
Digoxigenin	0.52 (0.27)	0.18 (0.52)		
Gitoxigenin			0.57 (0.52)	0.32 (0.58)
Ouabagenin-1,5,19-orthoformiat-3,11-diacetat			0.57 (0.50)	0.37 (0.71)
Adynerin			0.58	
Ouabagenin-1,19-acetonid			0.58 (0.60)	
α -Gitoxigenon	0.59 (0.38)	0.13 (0.51)		
Digoxigenon	0.59 (0.43)	0.31 (0.65)		
β -Anhydro-sarmentogenin	0.60 (0.43)	0.44 (0.75)		
Sarmentocymarin			0.64 (0.54)	0.37 (0.71)
Somalin			0.78 (0.74)	0.58 (0.83)
Uzarigenin	0.67 (0.50)	0.35 (0.70)		
Xysmalogenin	0.74 (0.55)	0.31 (0.71)		
Digitoxigenin	0.75			
Dihydro-digitoxigenin	0.76 (0.59)	0.49 (0.83)		
	<i>Me + 5% Eg</i>		<i>Ee-Eg-Py (85:10:5)</i>	
	<i>KG</i>	<i>AL</i>	<i>KG</i>	
Ouabain	0.72	0.54		
Dihydro-ouabagenin	0.72			
Ouabagenin	0.77	Front		
Uzarin	0.76	0.35		
<i>h</i> -Strophanthin- β	0.82	0.51		
Lanatosid A	0.85	0.53		
Convallatoxol				0.32
Convallatoxin				0.40

TABELLE VI
R_F-WERTE VON TRITERPENEN
 (vgl. auch Fig. 2)

Substanz	<i>R_F</i> -Werte im Gemisch						
	<i>Bz-Chl</i> (1:1)		<i>Bz-Chl</i> (4:1) AL	<i>A-Eg</i> (10:1) AL	<i>PA-Bz</i> (1:1)		<i>Bz</i> AL
	KG	AL			KG	AL	
Crataegolsäure-methylester	0.13 (0.18)	(0.13)		0.52			
Oleanolsäure	0.25 (0.25)	(0.28)		0.17			
Acetyl-oleanolsäure-methylester					0.46 (0.47)	0.45 (0.78)	
Crataegolsäure-diacetat	0.56 (0.53)	(0.49)		0.17			
α -Amyrenon					0.62 (0.72)	0.55 (0.76)	
Acetyl-ursolsäure	0.65 (0.67)						0.43 (0.21)
Echinocystsäure-methylester	0.68 (0.48)		0.15 (0.55)				
Oleanolsäure-methylester	0.72 (0.75)		0.42 (0.73)				
Taraxasterol-acetat					0.72 (0.82)	0.68 (0.83)	
Pyrochinovasäure-methylester	0.79 (0.63)	0.26	(0.67)				

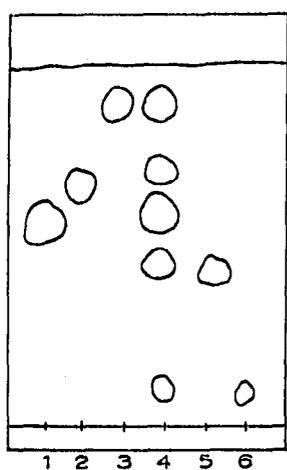


Fig. 1. Chromatographie von Sterin-Derivaten an Kieselgelpapier 289. Laufmittel: Benzol-Pyridin (100:1). 1 = Cholesterin; 2 = Lanosterin; 3 = *i*-Cholesterin; 4 = Gemisch aller; 5 = Cholestan-3 β ,5,6 β -triol-3,6-diacetat; 6 = Cholestan-3 β ,7 β -diol.

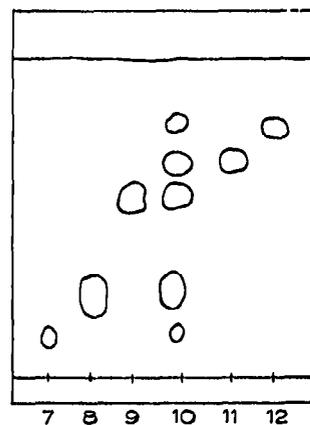


Fig. 2. Chromatographie von Triterpenen an Kieselgelpapier 289. Laufmittel: Chloroform-Benzol (1:1). 7 = Crataegolsäure-methylester; 8 = Oleanolsäure; 9 = Crataegolsäure-diacetat; 10 = Gemisch aller; 11 = Echinocystsäure-methylester; 12 = Pyrochinovasäure-methylester.

Die Hersteller geben an, dass die Streifen durch kurzzeitiges Erhitzen aktiviert werden können. Wir haben aber in einigen Testbeispielen keine wesentlichen Unterschiede zu unbehandelten Papieren feststellen können. Im allgemeinen werden die Flecke auf den Whatman-Papieren etwas länglicher als auf denen von Schleicher u. Schüll, was auf die geringere "Chargierung" ersterer zurückgeführt werden könnte. An der Front treten bei diesen auch mehr fluoreszierende Verunreinigungen auf, als bei letzteren, was aber nur bei grossen R_F -Werten stört. Einflüsse der Laufrichtung des Papiers waren nicht erkennbar.

Herrn Professor R. TSCHESCHE danke ich sehr herzlich für die Förderung dieser Arbeit, ferner den Herren H. LANDER und K. SCHNEIDER für die Mithilfe bei der Ausführung der Chromatogramme. Den Firmen Schleicher u. Schüll, Dassel und H. Reeve Angel u. Co., Ltd., London, bin ich für die kostenlose Überlassung von Papiermustern, der Fa. E. Merck AG, Darmstadt, für die Überlassung von Steroidproben zu Dank verpflichtet.

*Organisch-chemisches Institut der Universität,
Bonn (Deutschland)*

G. SNATZKE

¹ R. NEHER, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 122, 205.

² I. E. BUSH, *The Chromatography of Steroids*, Pergamon Press, Oxford, 1961.

³ R. NEHER, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 213.

⁴ I. E. BUSH, *The Chromatography of Steroids*, Pergamon Press, Oxford, 1961, S. 162.

⁵ B. PASICH, *Dissertationes Pharm.*, 11 (1959) 23; 12 (1960) 201.

⁶ E. DEMOLE, *J. Chromatog.*, 6 (1961) 2.

⁷ E. STAHL, *Angew. Chem.*, 73 (1961) 646.

⁸ R. TSCHESCHE, W. FREYTAG UND G. SNATZKE, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 3053.

Eingegangen den 11. Dezember, 1961

J. Chromatog., 8 (1962) 110-117

Notes

Die papierchromatographische Untersuchung von Heparin

Wie im allgemeinen bei der Arzneimittelkontrolle, so treten die chemischen Untersuchungsmethoden auch bei der Kontrolle biochemischer Präparate allmählich in den Vordergrund und machen die biologischen Verfahren überflüssig. Wie bekannt, ist das Heparin eine aus tierischen Organen isolierte Verbindung von Polysaccharid-Charakter, die von mehreren heparinartigen Stoffen begleitet wird. Diese sind entweder wirkungslos oder weniger wirksam als das Heparin selbst.

Eines der am besten geeigneten Verfahren zur Untersuchung der Einheitlichkeit

J. Chromatog., 8 (1962) 117-118