

Laufmittel  $L_5$ ,  $L_8$  und  $L_9$  eignen sich bei den angewandten Bedingungen nicht zur Trennung von Aminosäuren auf Cellulose-Schichten. Entweder erscheinen die Flecken nach dem Besprühen mit Ninhydrin garnicht oder aber sehr lang gezogen und verformt. Dagegen liefern die übrigen Laufmittel in den meisten Fällen schöne runde Flecken. Die sauren Aminosäuren bleiben bei Anwendung basischer Laufmittel am Start (vgl.  $R_F$ -Werte in Tabelle II).

### *Diskussion der Ergebnisse*

Auch mit Hilfe der DC lassen sich auf Cellulose-Schichten nicht alle Aminosäuren bei Einsatz nur eines Laufmittels trennen. Eine Anzahl Laufmittel können aus der PC übernommen werden. Aminosäuretrennungen auf Cellulose-Schichten MN 300\* (ohne Gipszusatz) verlaufen wesentlich besser und schärfer als auf Cellulose-Schichten mit Gipszusatz. Weil diese Tendenz bei allen angewendeten Laufmitteln deutlich wurde, wird auf eine Wiedergabe der  $R_F$ -Werte bei Schichten mit Gipszusatz verzichtet. Die Laufzeit der Trennungen auf Cellulose-Schichten liegt zwischen 30 und 90 Minuten und damit weit unter dem Zeitbedarf für papier-chromatographische Methoden. Mengen von 0.5 bis 1  $\mu$  können eindeutig und leicht nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit der dünn-schicht-chromatographischen Methode ist also wesentlich grösser als die bei papier-chromatographischen Methoden.

Wissenschaftliche Abteilung der Firma Macherey, Nagel & Co., PAUL WOLLENWEBER  
Düren-Rl. (Deutschland)

<sup>1</sup> E. STAHL, *Angew. Chem.*, 73 (1961) 646; *Z. anal. Chem.*, 181 (1961) 303.

<sup>2</sup> E. DEMOLE, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 24; 6 (1961) 2.

<sup>3</sup> H. K. MANGOLD, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 38 (1961) 708.

<sup>4</sup> E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMAYER, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 449.

<sup>5</sup> M. BRENNER UND A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 16 (1960) 378.

<sup>6</sup> K. TEICHERT, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMAYER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 100 (1960) 283.

<sup>7</sup> A. R. FAHMY, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND M. BRENNER, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 2022.

Eingegangen den 29. März 1962

\* Firma Macherey, Nagel & Co., 516 Düren-Rl. (Deutschland).

## Thin-layer chromatography

### Chromatoplate analysis of the bufadienolides isolated from toad venoms

Chromatoplate analysis, owing to its versatility, is receiving extensive attention from organic chemists<sup>1</sup>. It has been successfully applied to the analysis of steroids<sup>1</sup> and recently STAHL has extended its use to the rapid resolution of cardiac glycosides<sup>2</sup>.

Work on the isolation and identification of the cardiotoxic principles (bufadienolides or "bufogenins") from Brazilian toad venoms (*Bufo ictericus* Spix, *Bufo crucifer* Wied and *Bufo paracnemis* Lutz) has been undertaken in this laboratory<sup>3</sup>, and in connection with these studies, we wish to report the results of chromatoplate analysis of this group of substances.

Paper chromatography has been used for identification and preparative isolation of bufogenins, with propylene glycol-water or formamide as stationary phases<sup>4</sup>. Detection of the steroidal compounds is accomplished by spraying a saturated chloroform solution of  $\text{SbCl}_3$ , then heating and reading in natural or ultra-violet light.

Using glass plates coated with silica gel, we have found that a good and rapid resolution of the bufogenin group could be easily achieved with the following solvents: ethyl acetate, ethyl acetate-cyclohexane (80:20), or ethyl acetate-acetone (90:10). Good results were also obtained by using ethyl acetate saturated with water.

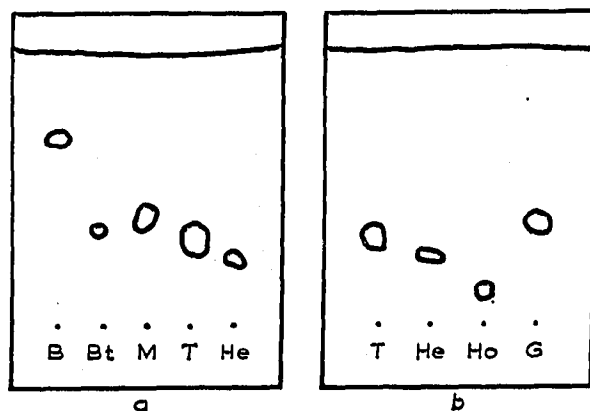


Fig. 1. Solvent: ethyl acetate, time of development (a) 55 min, (b) 60 min. B = Bufalin; Bt = Bufotalinin; M = Marinobufogenin; T = Telocinobufogenin; G = Gamabufotalin; He = Hellebrigenin; Ho = Hellebrigenol; R = Resibufogenin.

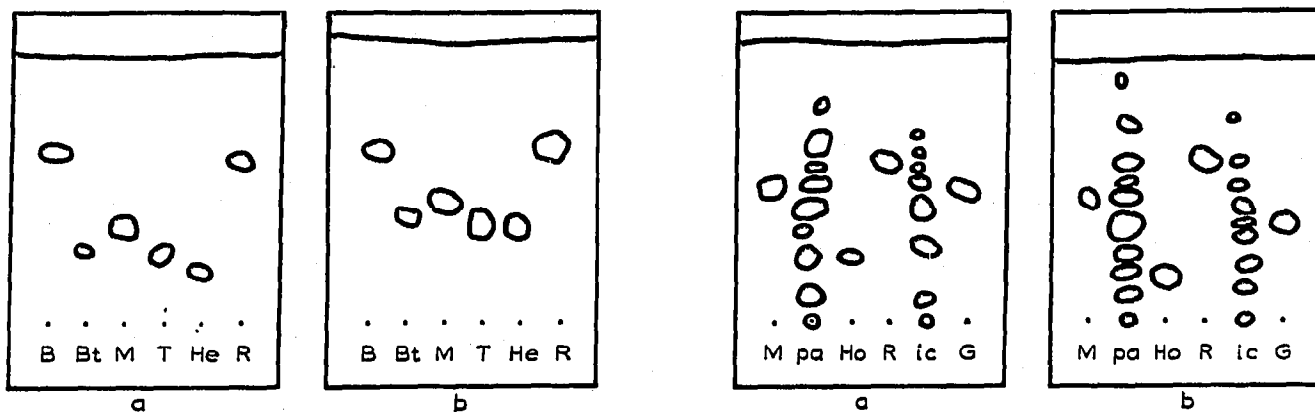


Fig. 2. (a) Solvent: ethyl acetate-cyclohexane (80:20); time 75 min. (b) Solvent: ethyl acetate-acetone (90:10); time 40 min.

Fig. 3. (a) Solvent: ethyl acetate saturated with water; time 40 min. (b) Solvent: ethyl acetate-acetone (90:10); time 35 min. pa = extract from *B. paracnemis* Lutz; ic = extract from *B. ictericus* Spix.

Detection of the spots was carried out by spraying with the  $\text{SbCl}_3$  reagent, heating and reading under ultra-violet light: a bright fluorescence of each of the bufogenins permitted their easy location.

Figs. 1, 2 and 3 show the general pattern obtained in the chromatographic separations.

On investigating the sensitivity of the method, we also found that quantities as low as 1  $\mu$ g of two pure samples (marinobufogenin and telocinobufogenin) could be distinctly located.

In a few runs, we used the crude extract isolated from the parotid glands of two species of toads (*B. ictericus* Spix and *B. paracnemis* Lutz) (Fig. 3).

In Table I, the  $R_F$  values of eight bufogenins are given. Each vertical column corresponds to one chromatoplate experiment. Slight variations of the  $R_F$  values can be observed; these were difficult to avoid owing to differences in the thickness of the coatings and changes in moisture.

TABLE I

 $R_F$  VALUES OF SOME BUFOGENINS

Solvents: A = ethyl acetate; B = ethyl acetate-cyclohexane (80:20); C = ethyl acetate-acetone (90:10); D = ethyl acetate saturated with water.

Bufogenin	$R_F \times 100$					
	A	B	C	D		
Resibufogenin	61	60	61	60	66	
Bufalin	62	61		64	62	
Bufotalinin	31	22		39	34	
Marinobufogenin	42	43	34	32	47	50
Gamabufotalin		31		26	37	47
Telocinobufogenin	34		23		28	37
Hellebrigenin	28	27	18		25	30
Hellebrigenol		9		7	17	23

*Experimental*

Rectangular glass plates (10  $\times$  18 cm) were coated with silica gel (Merck's Silica Gel G). The plates were activated at 100° before being used. Samples were deposited along a line 3 cm above the bottom of the plate, and from 30 to 75 min were necessary for development, which was in the ascending direction.

*Acknowledgement*

We are grateful to Dr. O. SCHINDLER and Prof. K. MEYER and T. REICHSTEIN, Basel University, for supplying authentic samples of bufogenins. We thank the Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan for financial help.

Instituto Butantan,  
Sao Paulo (Brazil)

R. ZELNIK  
L. M. ZITI

<sup>1</sup> E. DEMOLE, *J. Chromatog.*, 6 (1961) 2.

<sup>2</sup> E. STAHL AND U. KALTENBACH, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 458.

<sup>3</sup> R. ZELNIK AND L. M. ZITI, *Bull. soc. chim. France*, (1962), in the press.

<sup>4</sup> M. BARBIER, M. BHARUCHA, K. K. CHEN, V. DEULOFEU, E. ISELI, H. JÄGER, M. KOTAKE, R. REES, T. REICHSTEIN, O. SCHINDLER AND E. WEISS, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 362.

Received May 15th, 1962