

## PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON FUROCUMARINEN

THORSTEN BEYRICH

*Pharmazeutisches Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität\*, Greifswald (Deutschland)*

(Eingegangen den 1. Mai 1963)

In der Pflanzenwelt weit verbreitet ist die Stoffklasse der Cumarine<sup>1</sup>. Neben dem einfachen Cumarin und seinen Derivaten finden sich besonders in der Familie der Umbelliferen und Rutaceen zahlreiche Verbindungen, die sich vom Furocumarin ableiten. Meistens kommen mehrere Verbindungen dieses Typs nebeneinander vor. Daher bereitet die Isolierung reiner Stoffe oft erhebliche Schwierigkeiten. Es wäre daher besonders vorteilhaft, durch eine geeignete Mikromethode die Reinheit und Einheitlichkeit eines Stoffes feststellen zu können. Als Methode der Wahl empfahl sich uns auch hier die Papierchromatographie unter der Voraussetzung, dass ein Lösungsmittel zur Anwendung kommt, welches eine hinreichende Trennung dieser Substanzen erlaubt.

Trotz des häufigen Vorkommens dieser Stoffklasse im Pflanzenreich sind vergleichsweise wenig Arbeiten in dieser Richtung erschienen. Die Untersuchungen wurden im wesentlichen mit zwei Typen von Lösungsmitteln angestellt. Einerseits verwendete man wässrig-alkoholische Systeme mit oder ohne Zusatz von Säure oder vereinzelt auch Basen, sowie Mischungen von Kohlenwasserstoffen und Alkohol als Fliessmittel, indem Wasser als stationäre Phase diente. Andererseits wurden die Papiere mit wässrigen Glykollösungen imprägniert und Petroläther als mobile Phase benutzt. Eine Übersicht über die brauchbarsten Systeme verschiedener Autoren ist in Tabelle I gegeben.

In einphasigen Systemen treten dabei oft Schwanzbildungen auf; die Trennung mehrerer Cumarine ist nach den angegebenen  $R_F$ -Werten nur in einigen Fällen möglich. Im allgemeinen liegen die  $R_F$ -Werte recht hoch, weil die Furocumarine in Wasser nahezu unlöslich sind. Es wurden daher wiederholt auch Versuche unternommen, von zweiphasigen Systemen die wässrige Phase zum Chromatographieren zu verwenden (SWAIN<sup>6</sup>, JASTRZEBSKI<sup>11</sup>), wobei mittlere  $R_F$ -Werte zu erreichen sind. Aber auch in extrem hydrophoben Lösungsmitteln ist ihre Löslichkeit nur gering, so dass die Substanzen nur wenig mit ihnen wandern. Verheissungsvoller erscheinen die Ergebnisse, die bei "reversed-phase-Papierchromatographie" unter Verwendung von acetyliertem Papier erzielt wurden (Tabelle I, Zit. 4).

Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist eine vergleichende papierchromatographische Untersuchung der Furocumarine bisher nur von RIEDL UND NEUGEBAUER<sup>2</sup> sowie von GRUJIC-VASIC<sup>14</sup> durchgeführt worden, ohne dabei jedoch eine befriedigende Trennung der Mehrzahl der Furocumarine erreichen zu können. Die eigenen Versuche sollten

\* Direktor: Prof. Dr. R. POHLOUDEK-FABINI.

TABELLE I

LITERATURÜBERSICHT ÜBER PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNGEN VON FUROCUMARINEN

System*	$R_F \times 100$										Autor (Zit. Nr.)			
	Psoralen	Angelicin	Imperatorin	Isoimperatorin	Pimpinellin	Isopimpinellin	Xanthoxin	Bergapten	Isobergapten	Oxybergapten		Peucedanin	Sphondin	Xanthoxol
A	—	58	—	—	—	—	35	—	—	63	88	—	—	2
B	07	07	21	47	03	12	05	00-16	00-22	—	—	—	—	3
A	—	—	—	—	—	—	—	40	—	—	25	—	—	4
C	—	—	—	—	—	—	—	50	—	—	62	—	—	5
D	—	—	—	—	85	74	—	69	81	—	—	—	—	6
E	—	—	91	—	—	—	87	88	—	—	—	—	—	7
F	—	—	90	—	—	—	83	81	—	—	—	—	—	8
G	—	—	50	—	—	—	67	59	—	—	—	—	—	9
H	—	—	47	—	—	—	58	45	—	—	—	—	—	10
J	54	—	—	—	—	—	60	45	—	61	—	—	67-72	11
H	—	15-20	45-48	—	—	—	58-60	43-46	—	—	—	—	—	12
E	—	90-93	90-92	—	—	—	85-90	88-90	—	—	—	—	—	13
H	—	—	—	—	64	—	—	45	—	—	—	—	—	14
K	—	—	—	—	51	—	—	36	—	—	—	—	—	10
L	—	—	—	—	72	—	—	60	—	—	—	—	—	11
M	—	—	—	—	42	—	—	26	—	—	—	—	—	12
N	—	—	—	—	68	—	—	46	—	—	—	—	—	13
O	—	—	—	—	81	68	—	—	76	—	—	57	—	14
P	—	—	—	—	58	59	—	56	—	—	—	48	—	11
Q	—	—	—	87	—	—	82	75	—	—	—	—	—	12
R	—	—	80	—	—	—	75	70	—	—	—	—	—	13
S	73	76	—	—	81	76	73	74	77	78	—	—	—	14

\* Lösungsmittelsysteme:

- A: Impr. 20% ige wässrige Glykollösung/Lfm. Benzin 65-70°.  
 B: 20% ige wässrige Propylenglykollösung/Lfm. Benzin 65-70°.  
 C: Acetylcellulose/Lfm. Methyläthylketon-Aceton-Wasser (3:1:5).  
 D: Petroläther-Benzol-Methanol (5:4:2).  
 E: Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5).  
 F: Isopropanol-Wasser (2:3).  
 G: Benzylalkohol-Eisessig-Wasser (4:1:5) (wässrige Phase).  
 H: Essigsäure 10% ig.  
 J: Butylenglykol-Eisessig-Wasser (6:10:86).

- K: Äthylenglykol-Wasser (1:24).  
 L: Pyridin-Wasser (3:97).  
 M: Wasser.  
 N: Wasser-Dioxan (9:1).  
 O: Benzin-Benzol-Methanol (30:15:10).  
 P: *n*-Pentanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) (wässrige Phase).  
 Q: Methanol-Wasser (4:6).  
 R: Petroläther-Methanol (1:1) (26°).  
 S: Propanol-Wasser (9:1).

klären, inwieweit die Verwendung von Formamid bzw. Dimethylformamid als stationärer Phase eine Trennung der Furocumarine ermöglicht und inwieweit sich Beziehungen innerhalb dieser Stoffklasse zwischen Struktur und Verteilungsverhalten ableiten lassen.

Aus den Ergebnissen der eigenen Versuche (Tabelle II) ist ersichtlich, dass sich die Furocumarine im System I Formamid und im System II Dimethylformamid und Heptan-Benzol gut trennen lassen.

Für die Chromatographie mit Formamid bewährte sich eine Mischung von Heptan-Benzol (8:2), während bei Verwendung von Dimethylformamid zur Imprägnierung eine Erhöhung des Benzolanteils im Laufmittel von Vorteil war. Besonders hervorzuheben für dieses System ist dabei, dass auch Bergapten, das sonst leicht zu Schwanzbildung neigt, wohlausgebildete Flecke liefert. Durch Variation der Trockenzeit nach der Imprägnierung kann man den Grad der Polarisierung der stationären Phase verändern und dadurch eine allgemeine Erhöhung oder Erniedrigung der  $R_F$ -Werte erreichen.

Die beiden Grundkörper der Furocumarine sind das 2',3'; 7,6-Furocumarin (Psoralen) und das 2',3'; 7,8-Furocumarin (Angelicin). Diese zeigen in dem von uns benutzten System ein deutlich unterschiedliches Verhalten ( $R_F$  Psoralen in System I: 0.17, in II: 0.29;  $R_F$  Angelicin in I: 0.29, in II: 0.39). Die Eigenschaften der Grundkörper offenbaren sich gleichfalls in ihren Derivaten: Verbindungen mit linear ankondensiertem Furanring (Psoralentyp) haben durchgehend einen niedrigeren  $R_F$ -Wert als die isomeren Verbindungen mit angular ankondensiertem Furanring (Angelicintyp), wie die Beispiele Isopimpinellin < Pimpinellin sowie Bergapten < Isobergapten erkennen lassen. Diese Regel gilt auch für das Isomerenpaar Xanthotoxin-Sphondin, obgleich es hier weniger augenfällig ist.

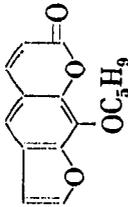
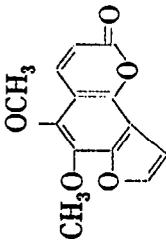
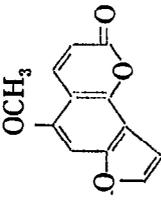
Eine Verlängerung der Seitenkette verschiebt die Löslichkeit zugunsten der organischen Phase, wie es generell für die Verteilung der Glieder homologer Reihen erkannt wurde (Beispiel: Xanthotoxin-Imperatorin).

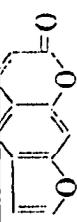
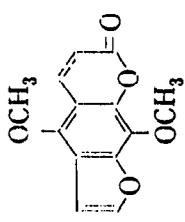
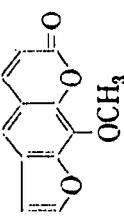
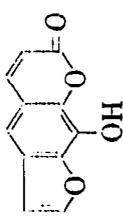
Die Entmethylierung und damit das Auftreten einer freien phenolischen Hydroxylgruppe erhöht die Löslichkeit in der polaren Phase so stark, dass die Verbindung am Start verbleibt (Beispiel: Xanthotoxol).

Während die einfachen Methyl- und Dimethyläther in beiden Systemen ein gleiches Verhalten zeigen, macht der Isopentenyläther Imperatorin eine Ausnahme. Infolge seiner besseren Löslichkeit in Dimethylformamid wandert er in diesem Lösungsmittelsystem weniger weit als Isobergapten und Pimpinellin, während er im System mit Formamid über diesen beiden Verbindungen liegt. Zur Abtrennung des Imperatorins von den übrigen Furocumarinen ist daher das Formamidsystem wegen seiner grossen Selektivität besser geeignet.

Zum Nachweis der Furocumarine empfiehlt sich die Beobachtung ihrer Fluoreszenz im U.V.-Licht, die nach Behandlung mit Alkali sich teilweise verändert oder besonders leuchtend hervortritt (Tabelle II). Bemerkenswert ist dabei, dass die Grundkörper Psoralen und Angelicin primär nur eine ganz schwache oder gar keine Fluoreszenz—wie auch Cumarin selbst—zeigen, sondern erst nach Behandlung mit Alkali unter allmählicher Aufspaltung des Lactonringes im U.V.-Licht sichtbar werden. Der Nachweis der Furocumarine unter der Quarzlampe ist die empfindlichste aller Methoden. Zur weiteren Differenzierung der einzelnen Verbindungen kann Diazo-reagens herangezogen werden. Damit geben alle Furocumarine charakteristische

TABELLE II  
PAPIERCHROMATOGRAPHISCHES VERHALTEN DER FURCUMARINE

Name	Formel	R <sub>F</sub>		Nachweisreaktionen			
		System I	System II	U.V.	KOH/U.V.	Diazoreaktion	Emersonreaktion
Imperatorin		0.56	0.48	gelb	tiefgelb	violettrot	—
Pimpinellin		0.50	0.54	gelb	gelbbraun	rosarot	schwach violett
Isobergapten		0.44	0.51	bläulich	fahlgelb	gelborange	violett
Angelicin		0.29	0.39	—	grünlichgelb	orange	rotviolett

Ergapten		0.23	0.35	bläulich	fahlgelb	rotviolett	---
Psoralen		0.17	0.29	bläulich	grünlichgelb	violett	(gelbbraun)
Isopimpinellin		0.15	0.31	gelb	braun	bräunlich	(gelb)
Sphondin		0.13	0.21	bläulich	fahlgelb	schwach violett	rotviolett
Xanthoxin		0.12	0.20	gelb	tiefgelb	blauviolett	—
Xanthotoxin		0.00	0.04	bräunlich	braun	rot	blau

Färbungen, deren deutliche Nuancierung jedoch nur bei grösseren Mengen wahrzunehmen ist. Wie die vergleichende Betrachtung der Färbung zeigt, treten mit den Derivaten des Psoralens im allgemeinen violettrote, kräftige Farben auf, während die Abkömmlinge des Angelicins nur zarte Tönungen liefern.

Neben diesen bekannten Nachweisverfahren erprobten wir das Reagens nach EMERSON<sup>15</sup>, das allgemein zum Nachweis von Phenolen dient. Dabei konnten wir die Feststellung machen, dass dieses Reagens nur mit Furocumarinen vom Angelicintyp reagiert, und zwar unter Bildung einer deutlichen und empfindlichen Rot- bis Rotviolettfärbung. Diese generelle Beobachtung lässt den Schluss zu, dass der Eintritt dieser Reaktion an ein nicht furanringgebundenes C-Atom C<sub>6</sub> (*p*-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe) geknüpft ist. Dabei ist die Substitution durch eine Methoxylgruppe an dieser Stelle ohne Einfluss (Sphondin).

Eine Sonderstellung unter den untersuchten Furocumarinen nimmt das Xanthotoxol ein, das einzige Phenol dieser Reihe. So wie sein Verteilungsverhalten deutlich von dem anderer Verbindungen absticht, so ist auch die Reaktion mit Emerson-Reagens anders als bei den Äthern: mit dem Xanthotoxol tritt eine Blaufärbung auf. Die Untersuchungen zur Klärung dieser Reaktion werden fortgesetzt.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Auf Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043b, 30 × 30 cm, werden etwa 10 µl einer 0.1 %igen Lösung der Substanzen in Aceton aufgetragen. Anschliessend werden die Bogen bis etwa 1 cm oberhalb der Startlinie durch das Imprägnierbad gezogen (System I: Formamid-Äthanol (40:60), System II: Dimethylformamid-Äthanol (40:60) Gew./Gew.). Der Bogen wird zwischen Filtrierpapier trockengepresst und die nichtimprägnierte Zone mit der Formamid- bzw. Dimethylformamidlösung besprüht. Man lässt die Bogen 15 Min. an der Luft hängen, heftet zu einem Zylinder und entwickelt ohne vorherige Sättigung mit Heptan-Benzol (System I (8:2), System II (7:3) Vol./Vol.).

Zur Identifizierung der einzelnen Cumarine dienen folgende Verfahren:

- (a) Betrachtung im U.V.-Licht.
- (b) Besprühen mit 0.5 N alkoholischer Kalilauge und Betrachtung im U.V.-Licht.
- (c) Besprühen mit 0.5 N alkoholischer Kalilauge, 5 Min. langes Erwärmen auf 80° und anschliessendes Besprühen mit Diazoreagens. Lösung I: 1.0 g Natriumnitrit werden in 250 ml Wasser gelöst; Lösung II: 1.6 g Natriumsulfanilat werden in 240 ml Wasser gelöst und 10 ml conc. Salzsäure zugegeben. Die Lösungen werden im Kühlschrank aufbewahrt und vor Gebrauch gleiche Teile von I und II gemischt.
- (d) Besprühen mit 0.5 N alkoholischer Kalilauge, Trocknen wie unter (c) und aufeinander folgendes Besprühen mit Lösungen I und II. Lösung I: 1.0 g Aminopyrin wird in 100 ml Wasser gelöst; Lösung II: 1.0 g Kaliumhexacyanoferrat (III) wird in 100 ml Wasser gelöst.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde das Verhalten der wichtigsten Furocumarine vom Psoralen- und Angelicintyp bei der Papierchromatographie unter Verwendung des Systems Formamid bzw. Dimethylformamid und Heptan-Benzol als Laufmittel studiert. Die Beziehungen zwischen Struktur und chromatographischem Verhalten werden diskutiert. Zum

Nachweis der Verbindungen wird neben der Beobachtung der Fluoreszenz die Diazo-reaktion herangezogen. Um festzustellen, welchem Grundkörper eine fragliche Verbindung zuzuordnen ist, wird die Reaktion nach EMERSON vorgeschlagen, die nur bei Derivaten des Angelicintyps positiv ausfällt. Nach dem angegebenen Verfahren lassen sich alle untersuchten isomeren Furocoumarine durch ihr Verteilungsverhalten und ihre spezifischen Farbreaktionen eindeutig identifizieren.

## SUMMARY

The behaviour was studied of the most important furocoumarins of the psoralene and angelicin types on paper chromatography, using the system formamide or dimethylformamide and heptane-benzol as solvent. The relationships between structure and chromatographic behaviour are discussed. The compounds were detected by their fluorescence and by means of the diazo reaction. In order to determine to which group an unknown compound belongs, the reaction of EMERSON is recommended, which reaction is only positive in the case of compounds belonging to the angelicin class. With the method described it was possible to identify all the isomeric furocoumarins investigated, by their chromatographic behaviour and their specific colour reactions.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> L. REPPPEL, *Pharmazie*, 9 (1954) 278.
- <sup>2</sup> K. RIEDL UND L. NEUGEBAUER, *Monatsh.*, 83 (1952) 1083.
- <sup>3</sup> F. WESSELY UND J. KOTLAN, *Monatsh.*, 86 (1955) 430.
- <sup>4</sup> F. WESSELY UND L. NEUGEBAUER, *Monatsh.*, 84 (1953) 217.
- <sup>5</sup> A. B. SVENDSEN, *Pharm. Acta Helv.*, 27 (1952) 44.
- <sup>6</sup> T. SWAIN, *Biochem. J.*, 53 (1953) 200.
- <sup>7</sup> L. FABBRINI, *Sperimentale, Sez. Chim. Biol.*, 6 (1955) 7.
- <sup>8</sup> F. CORCILIOUS, *Arch. Pharm., Ber. Deut. Pharm. Ges.*, 289/61 (1956) 81.
- <sup>9</sup> D. P. CHAKRABORTY UND H. C. CHAKRABORTTY, *Sci. Cult. (Calcutta)*, 22 (1956) 117.
- <sup>10</sup> A. SCHERM, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 99 (1959) 511.
- <sup>11</sup> M. JASTRZEBSKI, *Acta Polon. Pharm.*, 16 (1959) 215.
- <sup>12</sup> A. RAHMAN UND A. KASSEM, *Arch. Pharm., Ber. Deut. Pharm. Ges.*, 292/64 (1959) 277.
- <sup>13</sup> B. AKAČIĆ, D. KUSTRAK UND B. POJE, *Planta Med.*, 9 (1961) 70.
- <sup>14</sup> J. GRUJIC-VASIC, *Monatsh.*, 92 (1961) 236.
- <sup>15</sup> E. EMERSON, *J. Org. Chem.*, 8 (1943) 417.

*J. Chromatog.*, 13 (1964) 181-187