

Discussion

Chromatographic data for various aromatic acids are summarized in Table I. Migration rates are given as R_B values (where R_B is the migration distance of the acid divided by the migration distance of benzoic acid) rather than as R_F values. The R_F values for benzoic acid averaged about 0.65 in solvent system A and 0.25 in solvent system B. A somewhat better separation of benzoic and cinnamic acids was observed in *n*-heptane-acetic acid (solvent system B) than in benzene-pyridine. However, the latter system is more generally useful for separating a large number of acids.

Considerably sharper separations of substances with similar R_B values were obtained without solvent saturation of the chromatographic chamber. However, under conditions of saturation, development time was reduced by nearly 50 % and the slight "edge effect" was eliminated. R_F values were generally reduced by 1/3 by saturating the chamber. The values given are those obtained in an unsaturated atmosphere.

Acknowledgements

The author is indebted to Mr. C. J. McCoy for assistance in preparing the chromatoplates and to the Esso Research and Engineering Co. for permission to report these findings.

Esso Research and Engineering Co., Linden, N.J. (U.S.A.)

J. W. FRANKENFELD

1 D. BRAUN AND H. GEENEN, *J. Chromatog.*, 7 (1962) 56.

2 M. GILLIO-TOS, S. A. PREVITERA AND A. VIMERCATI, *J. Chromatog.*, 13 (1964) 571.

3 J. W. COPIUS-PEEREBOOM AND H. W. BEEKES, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 417.

4 G. PASTUSKA, *Z. Anal. Chem.*, 179 (1961) 355.

5 G. PASTUSKA AND H. J. PETROWITZ, *Chemiker Ztg.*, 86 (1962) 311.

Received August 21st, 1964

J. Chromatog., 18 (1965) 179-180

Auftrennung von Veratrum-Alkaloiden durch Dünnschichtchromatographie

(Herrn Prof. Dr. Ing. Dr. med. HELMUT NIEMER zum 65. Geburtstag gewidmet).

Die seit alten Zeiten schon in der Volksmedizin verwendete Veratrum-Droge ist seit 1945 als hypotensives Mittel wieder in die Therapie eingeführt worden. Da die Droge jedoch aus mehreren Alkaloiden besteht, treten demzufolge unsichere therapeutische Ergebnisse und Nebenwirkungen auf, sodass eine Methode zur schnellen Auftrennung und Bestimmung kleinerer und grösserer Mengen ihrer Inhaltsstoffe auch von pharmakologischem Interesse ist.

Besonders in Pflanzen der Liliaceen- (*Fritillaria*, *Schoenocaulon*, *Veratrum*, *Zygadenus*) und Solanaceen-Gattungen (*Lycopersicum*, *Solanum*) sind polycyclische Aminoalkohole enthalten, deren Kohlenstoffgerüst an das der Sterine erinnert, wobei die Seitenkette unter Stickstoffeinbau zu einem Heterocyclus umgewandelt ist.

J. Chromatog., 18 (1965) 180-183

Diese *Sterin-Alkaloide* liegen in der Pflanze als freie Aminoalkohole vor, zum Teil auch als deren Glykoside oder Ester. Hinsichtlich der Aminoalkohole lassen sich 4 Gruppen bilden, die man sich formal von einem aus Cholestanol durch Kondensation mit Ammoniak gebildeten Molekül ableiten kann: *Solanidin*, *Solasodin*, *Veratramin* und *Cevin*.

Die im "Veratrin"* enthaltenen Hauptkomponenten Cevadin und Veratridin sind Ester-Alkaloide und leiten sich von dem Alkamin *Veracevin* vom Cevin-Typ ab, dessen sauerstofffreies Grundgerüst das hexacyclische Cevan darstellt.

Die am C-3 β -ständige Hydroxylgruppe im Veracevin (= Protocevin) ist mit Angelicasäure bzw. mit Veratrumsäure verestert, im Cevacin mit Essigsäure. Die Chemie dieser Sterin-Alkaloide ist vor allem von KUPCHAN¹ und seinen Mitarbeitern aufgeklärt worden.

Den umständlichen Reinigungsverfahren der fraktionierten Fällung^{2,3} oder der Gegenstromverteilung⁴ hat die Methode der Dünnschichtchromatographie die Einfachheit und Schnelligkeit voraus, mit der Trennungen im Mikromassstab wie auch zu präparativen Zwecken durchgeführt werden können.

Während Kieselgur als Sorptionsmittel zur Trennung der Veratrum-Alkaloide ungeeignet ist, gelingt diese vorzüglich auf voreluierem aktiviertem Kieselgel HF₂₅₄ (Merck). Die Zonen zeichnen sich durch eine zum Teil intensive Fluoreszenz bzw. Absorption im U.V.-Licht (350 m μ , 254 m μ) aus.

Als geeignetes Laufmittel erwiesen sich Gemische aus Cyclohexan und Diäthylamin. Besonders zur Auftrennung grösserer Substanzmengen ist eine wiederholte Entwicklung der gleichen Dünnschichtplatte notwendig, um bei nahe zusammenliegenden R_F -Werten einen besseren Trenneffekt zu erreichen. Die R_F -Werte zeigen eine Abhängigkeit vom Aktivitätszustand der Sorptionsschicht, sowie bei mehrmaliger Entwicklung auch von der Belüftungszeit der Dünnschichtplatten zwischen den einzelnen Entwicklungen. Bei kurzer Belüftung (unvollständige Entfernung des Diäthylamin) verschieben sich die R_F -Werte zu höheren Werten.

Experimenteller Teil

Zur präparativen Auftrennung wurden 2 g Veratrin (Merck) in 8 ml Chloroform gelöst und strichförmig auf 2 Platten (20 \times 20 cm) mit einer 2 mm dicken Sorptionschicht aus Kieselgel HF₂₅₄ aufgetragen, welches vorher zur Abtrennung von Verunreinigungen in einer Soxhlet-Apparatur mit Chloroform und anschliessend mit Essigester extrahiert worden war (Sorptionschichten von mehr als 0,5 mm Dicke werden 12 Stdn. luftgetrocknet und erst anschliessend bei etwa 105° aktiviert). Beide Platten wurden dreimal im System Cyclohexan-Diäthylamin (180 + 20) entwickelt, nach jeder Entwicklung ausreichend belüftet und anschliessend die 3 im U.V.-Licht bei 254 m μ dunkel erscheinenden Zonen (Zone 1 am Start, Zone 2 mit R_F 0,2 und Zone 3 mit R_F 0,5) abgeschabt, mit Chloroform eluiert und die jeweiligen Eluate eingedunstet. Die Rückstände der 3 Fraktionen ergaben bei der Rechromatographie auf je 2 Platten (1 mm Kieselgel HF₂₅₄) im gleichen Laufmittel nach dreimaliger Entwicklung bereits einheitliche Banden. Lediglich aus der Zone 1 wurde bei der Rechromatographie noch eine geringe Menge der 2. Zone abgetrennt. Nach Elution

* Veratrin Merck, No. 8530, DAB. 6 ist ein aufgereinigtes Alkaloidgemisch aus *Sabadilla officinarum*.

und Trocknen im Hochvakuum (100°) wurden aus der Zone 1 286 mg, Zone 2 (Veratridin!) 448 mg und Zone 3 (Cevadin!) 880 mg erhalten.

Diskussion

Zur Trennung bzw. Identifizierung der durch Hydrolyse der Esteralkaloide bzw. Umlagerung aus Veracevin (= Protocevin) entstehenden Produkte Cevagenin und Cevin, sowie deren Essigsäureester⁵ (vgl. Fig. 1) eignen sich die Systeme Cyclohexan-Diäthylamin (180:20) und Cyclohexan-Diäthylamin (140:60).

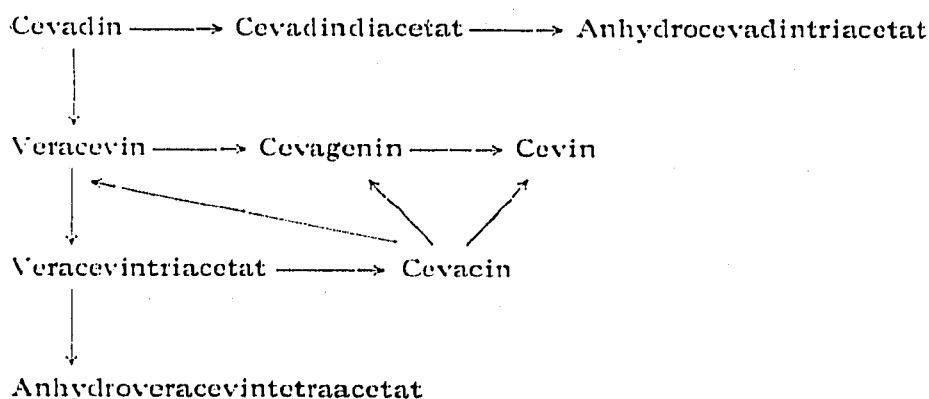


Fig. 1. Chemische Umwandlung einiger Veratrum-Alkaloide.

Wie aus der Tabelle I hervorgeht (die R_F -Werte gelten für frisch aktivierte Kieselgel HF₂₅₄-Platten, 250 μ dicke Sorptionsschicht) lassen sich die Ester-Alkaloide Veratridin, Cevacin und Cevadin im System (I) trennen, während zur Trennung der

TABELLE I

R_F -WERTE EINIGER VERATRUM-ALKALOIDE UND IHRER DERIVATE

Die in Klammern gesetzten R_F -Werte gelten für kurze Belüftung zwischen den einzelnen Entwicklungen.

| | Laufmittel | | | |
|--|------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------|
| | Cyclohexan-Diäthylamin | | Cyclohexan-abs. Athanol | |
| | (180:20) (System I) | (140:60) (System II) | (170:30) (System III) | |
| | 1 × entwickelt | 3 × entwickelt | 1 × entwickelt | 2 × entwickelt |
| 1 Veratridin | 0.07 | 0.16 (0.28) | 0.54 | 0.13 |
| 2 Cevadin | 0.25 | 0.49 (0.68) | 0.78 | 0.22 |
| 3 Veracevin | 0.00 | 0.03 | 0.23 | 0.14 |
| 4 Cevagenin | 0.00 | 0.03 | 0.26 | 0.05 |
| 5 Cevin | 0.03 | 0.08 | 0.35 | 0.09 |
| 6 Cevacin | 0.19 | 0.42 (0.54) | 0.65 | 0.19 |
| 7 Anhydrocevagenin-triacetat | 0.24 | 0.48 (0.66) | 0.66 | 0.27 |
| 8 Anhydrocevadintriacetat | 0.45 | 0.81 (0.90) | 0.84 | 0.29 |
| 9 Anhydroveracevin-tetraacetatperchlorat | 0.35 | 0.67 (0.80) | 0.75 | 0.13 |

Stereoisomere Veracevin (β -OH an C-3) und Cevin (α -OH an C-3) das System (II) herangezogen werden kann. Cevagenin ist in Chloroform schwerer löslich als Veracevin und Cevin.

Zur analytischen Beurteilung werden die Dünnschicht-Platten mit einer 25 %-igen Lösung von Trichloressigsäure in Chloroform kräftig besprüht, 10 bis 15 Min auf etwa 120° erhitzt und anschliessend unter der U.V.-Lampe bei 350 m μ betrachtet. Die Ester Veratridin, Cevadin und Cevacin fluoreszieren bläulich bis grünlich, die Alkamine Veracevin und Cevin gelb, Cevagenin gelbbraun und die Acetate der Anhydro-Verbindungen blau.

Wie die Tabelle I und die Fig. 2 zeigen, ist das System Cyclohexan-abs. Äthanol zur Auftrennung weniger geeignet. Die geringen Unterschiede in den R_F -Werten und die langgezogene Fleckenform erschweren die Identifizierung.

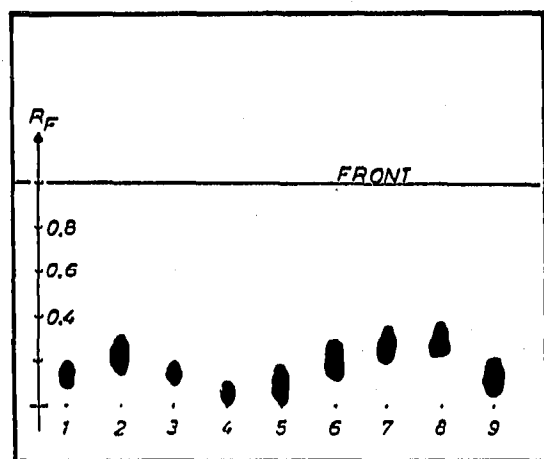


Fig. 2. Dünnschichtchromatographie von Veratrum-Alkaloiden im System III. (Die Ziffern unter den Startpunkten beziehen sich auf die Tabelle I.)

Dank

Herrn Prof. S. M. KUPCHAN* möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Überlassung einiger Vergleichspräparate danken.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität München
(Deutschland)

HANS-JÖRG ZEITLER

- 1 S. M. KUPCHAN, *J. Pharm. Sci.*, 50 (1961) 273.
- 2 B. K. BLOUNT, *J. Chem. Soc.*, (1935) 122;
- 3 CH. E. POETSCH, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 38 (1949) 525.
- 4 H. MITCHNER, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 45 (1956) 549.
- 5 S. M. KUPCHAN, D. LAVIE, C. V. DELIWALA UND B. Y. A. ANDOH, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 5519.

Eingegangen den 7. Dezember 1964

* The University of Wisconsin.