

SOLANUM-ALKALOIDE

LXXXIII. ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE DÜNNSCHICHT-
CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON 5α -GESÄTTIGTEN BZW.
 Δ^5 -UNGESÄTTIGTEN STERIODALKALOIDEN UND -SAPOGENINEN AN
SILBERNITRAT-HALTIGEN ADSORPTIONSSCHICHTEN*

HASSO RÖNSCH UND KLAUS SCHREIBER

*Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu
Berlin (D.D.R.)*

(Eingegangen den 7. Februar 1967)

Dünnschichtchromatographische Verfahren haben sich — wie auf vielen andern Gebieten — auch zur Trennung von C_{27} -Steroidalkaloiden¹⁻⁴ und -sapogeninen⁵⁻¹⁰ sehr bewährt. Jedoch zeigen die entsprechenden 5α -gesättigten und Δ^5 -ungesättigten Verbindungen, die häufig gemeinsam in Pflanzenmaterial vorkommen, nahezu identisches chromatographisches Verhalten; lediglich die Detektion der Δ^5 -Steroidalkaloide z.B. mit CLARKE-Reagens^{1,10}, bzw. die selektive Dehydrierung der gesättigten 3β -Hydroxy-Verbindungen zu den entsprechenden 3-Ketonen nach SARETT^{1,11} bot gewisse Differenzierungsmöglichkeiten. Auch mit einer kürzlich beschriebenen verbesserten Entwicklungstechnik¹² liessen sich zwar einige Paare stickstofffreier 5α - und Δ^5 -Steroide, nicht jedoch Tomatidin und Δ^5 -Tomatidenol, trennen. Als eine weitere Ausnahme erwies sich die von uns früher beschriebene Trennung von Demissidin (5α -Solanidan- 3β -ol, 1a) und Solanidin (Solanid-5-en- 3β -ol, 1b) an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten¹; allerdings liess sich dieses Verfahren nicht ohne weiteres auch auf andere analoge Steroidalkaloidpaare übertragen.¹

Silbernitrat enthaltende Sorptionsmittel¹³ wurden bereits mehrfach zur Trennung von Verbindungen mit unterschiedlicher Zahl bzw. Stellung von Doppelbindungen angewendet, so bei Lipiden und Fettsäuren^{14,15}, mehrfach ungesättigten Olefinen¹⁶, Mono-¹⁷, Di-¹⁸ und Triterpenen¹⁹⁻²⁴ sowie schliesslich auch bei Sterinen²²⁻³⁰. Hierbei wird die Komplexbildungstendenz zwischen Silberionen und Doppelbindungen ausgenutzt. So erschien es lohnend, die Anwendungsmöglichkeiten dieser Chromatographietechnik auch auf dem Steroidalkaloid- und Steroidsapogeninengebiet nochmals systematisch zu prüfen. Im folgenden berichten wir über die hierbei erzielten Ergebnisse. In der Tat liessen sich durch Dünnschichtchromatographie an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgel- bzw. Aluminiumoxydschichten mehrere 5α -gesättigte Solanidan-, Spirosolan-, 22,26-Epimino-cholestan- und Spirostan-Derivate von ihren entsprechenden Δ^5 -Dehydroverbindungen sowohl in analytischem als auch im mikropräparativem Masstab trennen.

* LXXXII. Mitt.; E. HÖHNE, H. RIPPERGER und K. SCHREIBER, *Tetrahedron*, 23 (1967), im Druck.

METHODIK

Herstellung der Adsorptionsschichten

(I) 5 g Kieselgel G (Merck) wurden in 15 ml 5-% Silbernitratlösung suspendiert, das Gemisch auf einer Glasplatte der Grösse 13 × 25 cm gleichmässig verteilt und nach Trocknen bei Raumtemperatur 1 Std. bei 110° aktiviert (AgNO₃-Gehalt der Schicht etwa 15 %).

(II) Aluminiumoxyd zur Chromatographie, standardisiert nach BROCKMANN (Merck), wird unter Zusatz von 10 % Gips (CaSO₄ · 0.5 H₂O) 5 Std. in der Kugelmühle vermahlen. 5 g des Gemischs, in 10 ml 5-% Silbernitratlösung suspendiert, werden auf eine Platte der Grösse 13 × 25 cm aufgetragen und, wie unter (I) beschrieben, getrocknet und aktiviert (AgNO₃-Gehalt der Schicht etwa 10 %).

Für präparative Trennungen (vgl. Lit. 31 und 32) werden 15 g Kieselgel G + 42 ml 5-% Silbernitratlösung bzw. 20 g Al₂O₃/CaSO₄-Gemisch + 30 ml 5-% Silbernitratlösung pro Platte gleicher Grösse verwendet; es wird 2 Std. bei 110° aktiviert (AgNO₃-Gehalt der Schichten etwa 12 % bzw. 7 %).

Eine beim längeren Aufbewahren der Platten in diffusem Licht eintretende leichte Dunkelfärbung der Adsorptionsschichten hat keinen nachteiligen Einfluss auf die Trenneigenschaften.

Auftragen der Substanzen

Für analytische Zwecke werden je Steroid 30–50 µg, in etwas Chloroform–Methanol (1:2) gelöst, aufgetragen. Die Startpunkte befinden sich 2 cm vom unteren bzw. 1.5 cm vom äusseren Rand entfernt und haben einen gegenseitigen Abstand von 1.2 cm.

Für mikropräparative Trennungen werden die Substanzgemische (bezüglich der jeweils einzusetzenden Mengen vgl. Tabelle I) in 0.5 ml Chloroform–Methanol (1:2) gelöst und diese Lösung mit Hilfe einer Pipette entlang einer 10 cm langen Startlinie aufgetragen, falls erforderlich unter Zwischentrocknung mit Warmluft.

Entwicklungsgemische

(A) Chloroform–Methanol (90:10) (alle Angaben in v/v)

(B) Chloroform–Methanol (95:5)

(C) Chloroform–Äther–Essigsäure (97:2.5:0.5)²⁵.

Die Entwicklung erfolgt aufsteigend bei 22°. Die Laufstrecke beträgt 15 cm; sie wird vor der Chromatographie durch eine Markierung begrenzt. Zwecks Erzielung von Kammersättigung werden die Entwicklungsgemische mindestens 5 Std. vor Beginn der Trennung in die mit Fließpapier ausgekleideten Glaskammern eingefüllt. Die Durchlaufchromatographie (bei analytischen Trennungen Laufzeit 4 Std.) erfolgt nach der "Abdunstmethode" (vgl. Lit. 33 und 34); dabei wird die etwa 5 cm aus dem Entwicklungsgefäss herausragende Platte durch zwei Abdeckscheiben in senkrechter Lage gehalten.

Nachweisreagenzien

Durch ausreichendes Besprühen mit 10-% wässr. Kaliumbromidlösung lassen sich die Steroide als weissgraue Zonen auf dunklerem Untergrund erkennen. Die so erreichbare Empfindlichkeit (> 5 µg) kann nach dem Trocknen der Chromatogramme

durch zusätzliche Anwendung von Jodreagens (0.2 g Jod + 0.4 g Kaliumjodid im 100 ml Wasser) auch bei präparativer Dünnschichtchromatographie (vgl. Lit. 35) noch erhöht werden. Sapogenine, die mit Jodreagens im allgemeinen keine oder nur sehr schwache Anfärbungen geben, sind mit einer gesätt. Lösung vom Cer(IV)-sulfat im 70-% Schwefelsäure (5–10 Min. Erhitzen auf 110°) gut nachweisbar. Hierbei kommt eine signifikante Minderung der Nachweisempfindlichkeit im Vergleich zur Anwendung dieses Reagens bei silberfreien Adsorbentien (vgl. Lit. 26) nicht festgestellt werden.

Präparative Isolierung dünn-schichtchromatographisch genannter Verbindungen

Das nach Detektion der Chromatogramme und Abkratzen der unmarkierten substanzhaltigen Zonen gewonnene Material wird durch 2-stünd. Schütteln mit 8 ml 10-% Kaliumcyanidlösung und 2 ml 2 N NaOH pro Platte und Zone von störenden Silberverbindungen befreit. Filtrieren, mehrfaches Waschen mit Wasser, Trocknen bei Raumtemperatur und erschöpfende Elution mit Äther-Methanol (9:1) liefert im 75–85-% Ausbeute dünn-schichtchromatographisch einheitliche Verbindungen, die sich nach 1–2-maliger Kristallisation, z.B. aus Methanol-Wasser, als frei von beigegemengten kolloidalen Adsorbentien erwiesen.

Zur Elution der Steroide aus noch silberhaltigem Trägermaterial ist Chloroform-Methanol (8:2) erforderlich. Hierbei werden erhebliche Mengen dunkelgefärbter Silberverbindungen mit extrahiert. Eindampfen der Eluate i. Vak., Schütteln des Rückstandes mit 10-% Kaliumcyanidlösung und anschließende Extraktion mit Methylchlorid liefert aber auch in diesem Fall reine Präparate.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Alle untersuchten 5 α -gesätt.- Δ^5 -ungesätt. stickstoffhaltigen Steroidpaare lassen sich mit System IA (Dünnschichtchromatographie am Kieselgel G + 15% Silbernitrat*, Entwicklung mit Chloroform-Methanol (9:1)) im analytischen Maßstab trennen; vor allem bei Anwendung der Durchlauftechnik. In Fig. 1 ist die relative Lage der Verbindungen auf dem Dünnschichtchromatogramm wiedergegeben; auf die Angabe von R_F - oder $R_{Standard}$ -Werten wurde verzichtet, da diese im gewissem Umfang variieren können. Für die weniger stark polaren Basen eignet sich noch besser das System IIB, mit dem 4 Std. im Durchlauf chromatographiert wird. Zu dieser Gruppe gehören Demissidin, 22-Isodemissidin, Soladulcin, Tomatidin und deren Δ^5 -ungesättigte Analoga (1a, b–4a, b), aber auch die aus Wurzeln von *Solanum dulcamara* L. isolierten Nebenalkaloide 7a und b³⁶, deren zweite 15 β -ständige Hydroxygruppe durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke gebunden ist.

Auch Aluminiumoxyd + 10% Silbernitrat ist als Adsorbens grundsätzlich geeignet (vgl. Fig. 1, System IIB), weist jedoch gegenüber Kieselgel-Silbernitrat eher Nachteile als Vorteile auf. So sind die auftretenden Flecke oder Zonen im allgemeinen weniger scharf abgegrenzt; auch Neigung zur Schwammbildung wurde gelegentlich beobachtet. Das System kann jedoch für die präparative Trennung von Soladulcin (3a) und Solasodin (3b) empfohlen werden.

Für die Trennung der stickstofffreien Steroidsapogenine Tigogenin (11a) und

* Bisher wurden gelegentlich höhere Prozentsätze an Silbernitrat (bis etwa 45%) verwendet (vgl. z.B. Lit. 25). Solche Schichten erwiesen sich jedoch bei unseren Untersuchungen als ungeeignet. MORRIS (vgl. Lit. 13) empfahl einen AgNO₃-Anteil von 5%.

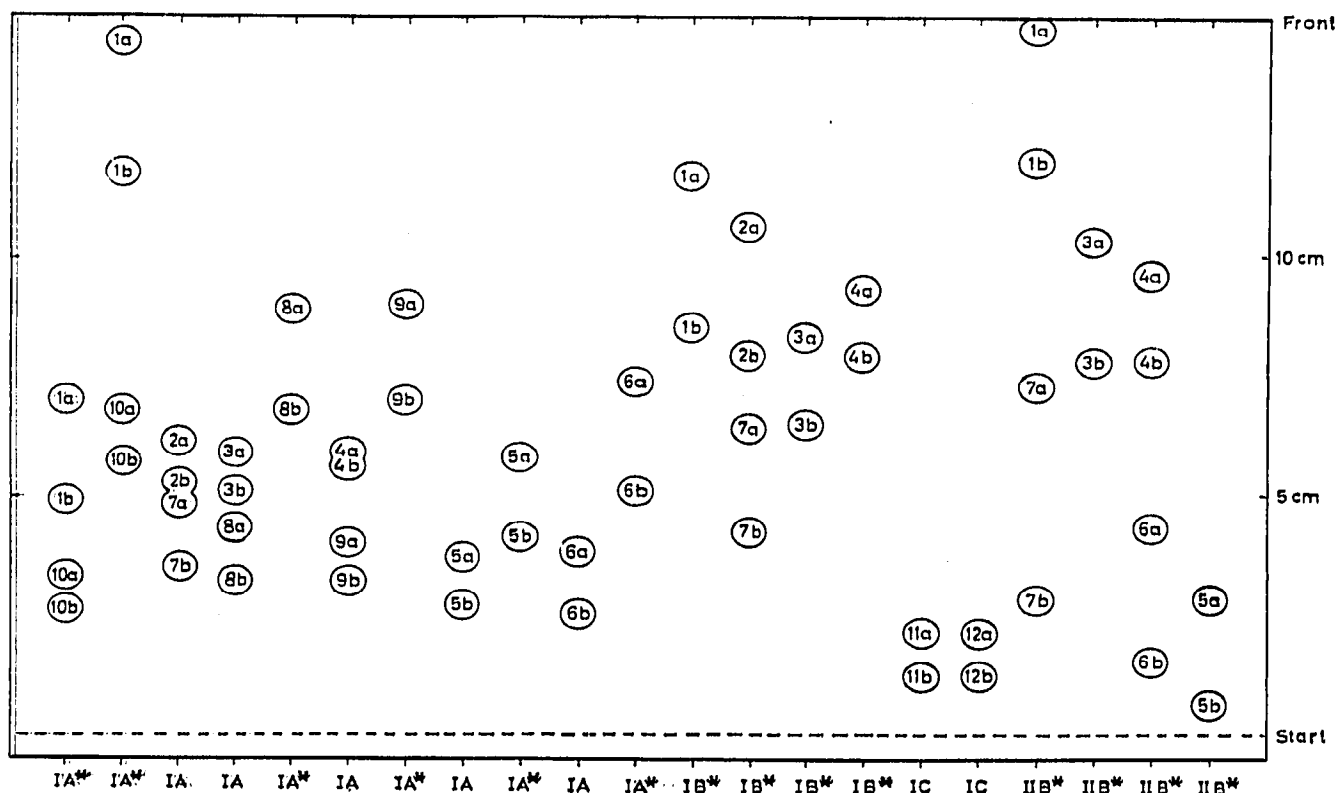


Fig. 1. Dünnschichtchromatographische Trennung von 5α -gesättigten und Δ^5 -ungesättigten C_{27} -Steroidalkaloiden und -sapogeninen an Silbernitrat enthaltenden Adsorptionschichten in analytischem Masstab. Die römischen Zahlen bezeichnen die Adsorbentien, die grossen Buchstaben die Entwicklungsgemische, ein Sternchen (*) die Anwendung von Durchlaufchromatographie (vgl. Abschnitt Methodik). Die arabischen Zahlen und kleinen Buchstaben kennzeichnen die untersuchten Steroide und zugleich deren Strukturformeln (a = 5α -gesättigte, b = Δ^5 -ungesättigte Verbindungen): 1a = Demissidin [5α -Solanidan- 3β -ol], 1b = Solanidin [Solanid-5-en- 3β -ol], 2a = 22-Isodemissidin [$5\alpha, 22\beta$ H-Solanidan- 3β -ol], 2b = 22-Isosolanidin [22β H-Solanid-5-en- 3β -ol], 3a = Soladulcin [(25R)- $5\alpha, 22\alpha$ N-Spirosolan- 3β -ol], 3b = Solasodin [(25R)- 22α N-Spirosol-5-en- 3β -ol], 4a = Tomatidin [(25S)- $5\alpha, 22\beta$ N-Spirosolan- 3β -ol], 4b = Tomatidenol [(25S)- 22β N-Spirosol-5-en- 3β -ol], 5a = 15α -Hydroxy-soladulcin [(25R)- $5\alpha, 22\alpha$ N-Spirosolan- $3\beta, 15\alpha$ -diol], 5b = 15α -Hydroxy-solasodin [(25R)- 22α N-Spirosol-5-en- $3\beta, 15\alpha$ -diol], 6a = 15α -Hydroxy-tomatidin [(25S)- $5\alpha, 22\beta$ N-Spirosolan- $3\beta, 15\alpha$ -diol], 6b = 15α -Hydroxy-tomatidenol [(25S)- 22β N-Spirosol-5-en- $3\beta, 15\alpha$ -diol], 7a = 15β -Hydroxy-soladulcin [(25R)- $5\alpha, 22\alpha$ N-Spirosolan- $3\beta, 15\beta$ -diol], 7b = 15β -Hydroxy-solasodin [(25R)- 22α N-Spirosol-5-en- $3\beta, 15\beta$ -diol], 8a = (22S:25R)-22,26-Epimino- 5α -cholestan- $3\beta, 16\beta$ -diol, 8b = (22S:25R)-22,26-Epimino-cholest-5-en- $3\beta, 16\beta$ -diol, 9a = (22S:25S)-22,26-Epimino- 5α -cholestan- $3\beta, 16\beta$ -diol, 9b = (22S:25S)-22,26-Epimino-cholest-5-en- $3\beta, 16\beta$ -diol, 10a = (22R:25S)-22,26-Epimino- 5α -cholestan- $3\beta, 16\beta$ -diol, 10b = (22R:25S)-22,26-Epimino-cholest-5-en- $3\beta, 16\beta$ -diol, 11a = Tigogenin [(25R)- $5\alpha, 22\alpha$ O-Spirostan- 3β -ol], 11b = Diosgenin [(25R)- 22α O-Spirost-5-en- 3β -ol], 12a = Neotigogenin [(25S)- $5\alpha, 22\alpha$ O-Spirostan- 3β -ol], 12b = Yamogenin [(25S)- 22α O-Spirost-5-en- 3β -ol].

Diosgenin (11b) bzw. Neotigogenin (12a) und Yamogenin (12b) bewährte sich das System IC (Fig. 1).

Zur Auftrennung natürlich vorkommender Gemische sowie zur Identifizierung von deren Einzelkomponenten hat es sich als zweckmässig erwiesen, zuerst eine normale dünnschichtchromatographische Gruppentrennung an Kieselgel G unter Verwendung von z.B. Cyclohexan-Essigester (1:1)¹ durchzuführen und erst dann zur weiteren Differenzierung und endgültigen Identifizierung an den oben genannten Silbernitrat-haltigen Adsorbentien zu entwickeln. Ein Mitchromatographieren authentischer Vergleichssubstanzen ist in jedem Fall unerlässlich. Auch die zweidimensionale

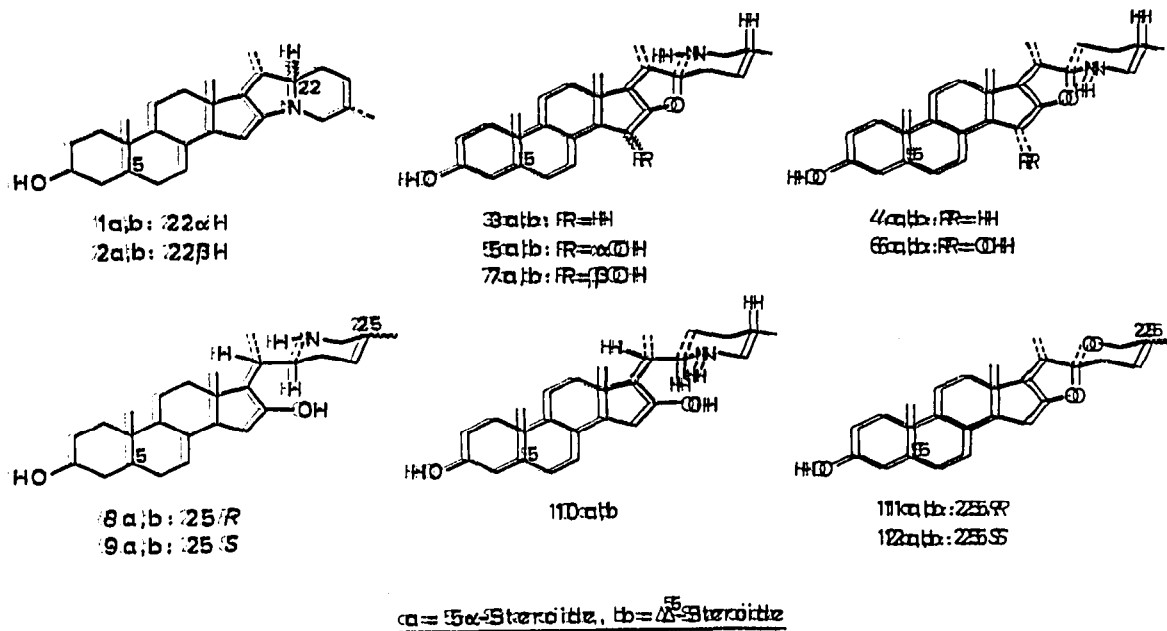
TABELLE I

PRÄPARATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG 5 α -GESÄTTIGTER STEROIDALKALOIDE UND -SAPOGENINE VON IHREN Δ^5 -UNGESÄTTIGTEN ANWÄNDEN AN SILBERNITRAT ENTHALTENDEN ADSORBENTEN

Steroidpaar	System ^a (Lauffakt. in Sttl.)	Thamnkapazität ^b (mg)
Demissidin (1a) + Solanidin (1b)	III B ((7))	35
Soladulcidin (3a) + Solasodin (3b)	III B ((7)) oder III B ((6))	20 5-10
Tomatidin (4a) + Tomatidenol (4b)	III B ((7))	10
15 α -Hydroxy-soladulcidin (5a) + 15 α -Hydroxy-solasodin (5b)	II A ((7))	30
15 β -Hydroxy-soladulcidin (7a) + 15 β -Hydroxy-solasodin (7b)	III B ((6))	30
Tigogenin (11a) + Diosgenin (11b)	IC ((2))	20

^a Vgl. Fig. 1 und Abschnitt Methodik.

^b Die von einer Dünnschichtplatte noch gut aufgetrennte Menge eines α : β -Gemisches.



Dünnschichtchromatographie, bei der nach der Erstentwicklung mit Silbernitrat imprägniert wird, hat hier gelegentlich gute Dienste geleistet.

Einige durchgeführte präparative Trennungen sind in Tabelle II zusammengestellt. Bei Auftragen von α : β -Steroidgemischen war eine saubere Trennung der betreffenden 5 α -gesättigten und Δ^5 -ungesättigten Verbindungen möglich. Die in 75-85% Ausbeute isolierten Steroide erwiesen sich nach 2-maliger Kristallisation in ihren physikalischen Konstanten sowie nach Misch-Schmp., Infrarotspektrum und Dünnschichtchromatogramm (an Kieselgel-Silbernitrat) mit authentischen Verbindungen als vollkommen identisch. Die Leistungsfähigkeit dieser Methode wurde bereits bei

Isolierung von vier neuen 15α -Hydroxy-spirosolan-Alkaloiden aus Wurzeln von *Solanum dulcamara* L. unter Beweis gestellt.³⁷

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Anzahl 5α -gesätt.- Δ^5 -ungesätt. C_{27} -Steroidpaare mit Solanidan-, Spirosolan-, 22,26-Epimino-cholestan- und Spirostan-Grundgerüst wurde durch Dünnschichtchromatographie an Silbernitrat-haltigem Kieselgel G bzw. Aluminiumoxyd G sowohl in analytischem als auch mikropräparativem Masstab getrennt.

SUMMARY

A number of 5α -saturated and Δ^5 -unsaturated C_{27} -steroids with solanidane, spirosolane, 22,26-epiminocholestane and spirostane skeletons have been separated by thin-layer chromatography using silver nitrate impregnated Silica Gel G or Alumina G, both on an analytical and a micro-preparative scale.

LITERATUR

- 1 K. SCHREIBER, O. AURICH UND G. OSSKE, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 63.
- 2 S. HEŘMÁNEK, V. SCHWARZ UND Z. ČEKAN, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 26 (1961) 1669.
- 3 P. M. BOLL, *Acta Chem. Scand.*, 16 (1962) 1819.
- 4 H. SANDER, M. ALKEMEYER UND R. HÄNSEL, *Arch. Pharm.*, 295 (1962) 6.
- 5 R. D. BENNETT UND E. HEFTMANN, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 353.
- 6 N. MATSUMOTO, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 11 (1963) 1189.
- 7 K. TAKEDA, S. HARA, A. WADA UND N. MATSUMOTO, *J. Chromatog.*, 11 (1963) 562.
- 8 G. BLUNDEN UND R. HARDMAN, *J. Chromatog.*, 15 (1964) 273.
- 9 D. T. ELMUNAJED, M. B. E. FAYEZ UND A. S. RADWAN, *Phytochemistry*, 4 (1965) 587.
- 10 E. G. C. CLARKE, *Nature*, 181 (1958) 1152.
- 11 G. I. POOS, G. E. ARTH, R. E. BEYLER UND L. H. SARETT, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 422.
- 12 R. D. BENNETT UND E. HEFTMANN, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 488.
- 13 B. DE VRIES, *Chem. Ind. (London)*, (1962) 1049; *ibid.*, *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, 40 (1963) 184; vgl. L. J. MORRIS, in A. T. JAMES UND L. J. MORRIS (Herausgeber), *New Biochemical Separations*, Van Nostrand, London, Toronto, New York, Princeton, 1964, S. 295.
- 14 C. B. BARRETT, M. S. J. DALLAS UND F. B. PADLEY, *Chem. Ind. (London)*, (1962) 1050.
- 15 L. J. MORRIS, *Chem. Ind. (London)*, (1962) 1238.
- 16 A. S. GUPTA UND S. DEV, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 189.
- 17 M. VON SCHANTZ, S. JUVONEN UND R. HEMMING, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 618.
- 18 R. D. BENNETT, S.-T. KO UND E. HEFTMANN, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 1360.
- 19 R. IKAN, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 591.
- 20 J. BERGMAN, B. O. LINDGREN UND C. M. SVAHN, *Acta Chem. Scand.*, 19 (1965) 1661.
- 21 B. O. LINDGREN UND C. M. SVAHN, *Acta Chem. Scand.*, 20 (1966) 1763.
- 22 J. AVIGAN, D. S. GOODMAN UND D. STEINBERG, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 100.
- 23 P. BENVENISTE, L. HIRTH UND G. OURISSON, *Compt. Rend.*, 259 (1964) 2284; *ibid.*, *Phytochemistry*, 5 (1966) 31.
- 24 R. G. NICHOLLS UND W. W. REID, im Druck.
- 25 J. W. COPIUS-PEEREBOOM UND H. W. BEEKES, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 99.
- 26 A. S. TRUSWELL UND W. D. MITCHELL, *J. Lipid Res.*, 6 (1965) 438.
- 27 J. R. CLAUDE, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 596.
- 28 R. IKAN UND M. CUDZINOVSKI, *J. Chromatog.*, 18 (1965) 422.
- 29 N. W. DITULLIO, C. S. JACOBS JR. UND W. L. HOLMES, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 354.
- 30 R. D. BENNETT, S.-T. KO UND E. HEFTMANN, *Phytochemistry*, 5 (1966) 231.
- 31 K. RANDEPATH, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 2. Aufl., 1965, S. 88.
- 32 R. NEHER, *Steroid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, 2nd Ed., 1964, S. 239.
- 33 M. BRENNER UND A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 17 (1961) 237.
- 34 T. M. LEES, M. J. LYNCH UND F. R. MOSHER, *J. Chromatog.*, 18 (1965) 595.
- 35 G. ADAM UND K. SCHREIBER, *Z. Chem.*, 3 (1963) 100.
- 36 H. RÖNSCH UND K. SCHREIBER, Veröffentlichung in Vorbereitung.
- 37 H. RÖNSCH UND K. SCHREIBER, *Liebigs Ann. Chem.*, 694 (1966) 169.