

CHROM. 10,826

CHROMATOGRAPHISCHE DIFFERENZIERUNG VON CARDENOLIDEN DURCH ANWENDUNG VON BORATEN UND ANDEREN DIOLREAGENZEN*

R. MEGGES, BARBARA STRECKENBACH und K. R. H. REPKE

Bereich Biomembranen, Zentralinstitut für Molekularbiologie, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin der Akademie der Wissenschaften der D.D.R., Lindenberger Weg, 70 DDR-1115 Berlin-Buch (D.D.R.)

(Eingegangen am 10. Mai 1977; geänderte Fassung eingegangen am 15. Dezember 1977)

SUMMARY

Chromatographic separation of cardenolides using borates and other diol reagents

The paper probes 13 diol reagents known to interact with the *cis*-1,2- and/or -1,3-diol groups of carbohydrates and other compounds, as to their influence on the relative mobilities of 16-acetylgitoxin and acetylgitoxin- α as representatives for *cis*-1,2- and *cis*-1,3-diols in the cardenolide series. The influence on mobility has been studied using paper partition chromatography with formamide as stationary phase.

Metaboric acid, boric acid, arsenic pentoxide, phenyl arsonic acid, ammonium metavanadate, sodium molybdate, and sodium tungstate are without influence on the relative mobilities of both diols.

Sodium metaborate, disodium tetraborate, and potassium borooxalate decrease and arsenic trioxide increases specifically the mobility of the 1,2-diol. Phenylboronic acid and diphenylborinic acid increase the relative mobility of both diols. In the case of phenylboronic acid a differentiation between both diols is possible: at low concentration the relative mobility of the 1,3-diol only and at high concentration that of the 1,2-diol, too, increases.

The effect of the diol reagents is completely lost by acetylation of one OH group of the reacting diol group. Apparently, the reagent's effects on chromatographic mobility are due to the formation of cyclic complexes or cyclic esters with the *cis*-1,2- or *cis*-1,3-diol group.

EINLEITUNG

Borsäure und ihre Salze bilden mit Polyolen geeigneter Struktur mehr oder minder stabile cyclische Derivate (Ester oder Komplexe, Übersichten z.B. Lit. 1, 2). Diese Eigenschaft ist wiederholt benutzt worden zur besseren chromatographischen

* Auszugsweise vorgetragen am 9.5.1972 auf dem Kongress der Pharmazeutischen Gesellschaft der D.D.R. in Berlin: *Pharmazie*, 27 (1972) 718.

Trennung von Polyolen ähnlicher chromatographischer Mobilität, aber unterschiedlicher Neigung zur Derivatbildung (z.B. Lit. 3–5). Analoge Derivate werden auch mit Phenylborsäure^{6,7}, Diphenylborsäure^{8,9}, Boroxalat⁸, Arsenit^{4,10,11}, Arsensäure¹², Phenylarsonsäure¹³, Molybdat^{10,14}, Wolframat^{10,14}, Vanadat¹⁴ u.a. Diolreagenzien gebildet und teilweise in der Chromatographie angewandt.

Entsprechend dem Polyolcharakter der Cardenolide sollte ihr chromatographisches Verhalten durch Diolreagenzien beeinflussbar sein. Bisher liegen darüber aber nur wenige Untersuchungen vor^{15–17}. In der vorliegenden Arbeit wird die Möglichkeit der Beeinflussung der chromatographischen Mobilität von 16-Acetyl-gitoxin bzw. Acetylgitoxin- α (vgl. Fig. 1) als Vertreter von *cis*-1,2- bzw. *cis*-1,3-Diolen der Cardenolidreihe durch 13 Diolreagenzien vergleichend geprüft. Ziel der Arbeit ist, durch Anwendung geeigneter Diolreagenzien die chromatographische Trennung von Cardenoliden zu verbessern sowie eine einfache Methode zum Nachweis der An- oder Abwesenheit entsprechender Diolgruppierungen im Molekül zu erhalten.

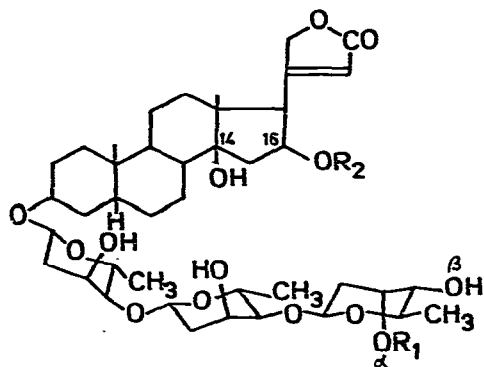


Fig. 1. Acetylgitoxin- α : $R_1 = \text{CH}_3\text{CO}$; $R_2 = \text{H}$. 16-Acetylgitoxin: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3\text{CO}$.

EXPERIMENTELLES

Die papierchromatographische Analyse von je $0.1 \mu\text{Mol}$ Cardenolidglykosid erfolgte vergleichend in Abwesenheit und in Gegenwart des jeweils geprüften Diolreagens absteigend mit formamidgesättigtem Propyläther-Tetrahydrofuran 2:1 (modifiziert nach Lit. 18) auf Formamid-impregniertem Papier (30% Formamid in Aceton; Schleicher und Schüll, 2043 b Mgl).

Diphenylborsäure wurde der mobilen, alle übrigen Reagenzien wurden der stationären Phase zugesetzt. Das erfolgte je nach Löslichkeit entweder durch Lösung in der Formamid-Imprägnierungsmischung (Phenylborsäure, Phenylarsonsäure) oder vor der Formamidimprägnierung durch Eintauchen der Papiere in die wässrigen Lösungen (alle übrigen Reagenzien) und anschließende Trocknung. Die entwickelten Chromatogramme wurden zur Entfernung des Formamids bei 160 Torr 30 min auf 90° erhitzt. Zur Lokalisierung der Cardenolide wurden die Chromatogramme mit Trichloressigsäure-Chloramin¹⁹ oder (bei Einsatz der Salze sowie der Phenylarsonsäure und der Arylborsäuren) mit *m*-Dinitrobenzol-Natronlauge²⁰ behandelt. Das Formamid wurde zur Reinigung je 30 min mit stark basischem und stark saurem Ionenaustauscher geschüttelt und *in vacuo* fraktioniert.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses von 13 Diolreagenzien auf die papierchromatographische Mobilität von 16-Acetylgitoxin (*cis*-1,2-Diol: α, β -OH an der endständigen Digitoxose) bzw. Acetylgitoxin- α (*cis*-1,3-Diol: $14\beta, 16\beta$ -OH am Steroidgerüst; vgl. Fig. 1) sind in der Tabelle I zusammengefasst, auf die sich die folgende Besprechung stützt. Dabei sind nur die durch Derivatbildung verursachten spezifischen Mobilitätsänderungen berücksichtigt. Eine mögliche Erhöhung der Mobilität durch den unspezifischen Salzeffekt^{5,15} ist durch Bezug auf die Mobilität des jeweils nicht reagierenden Diols rechnerisch eliminiert (relative Mobilität: s. Legende zur Tabelle I).

TABELLE I

EINFLUSS VON 13 DIOLREAGENZIEN AUF DAS PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE VERHALTEN VON ACETYLGITOXIN- α UND 16-ACETYLGITOXIN

Die Änderung der relativen Mobilität ΔR_W der Verbindungen wurde berechnet nach: $\Delta R_W = 100 \times (LB_o \times LD_m) / (LB_m \times LD_o) - 100$, wobei LB_o bzw. LB_m = Laufstrecke (cm) der Bezugssubstanz (nicht reaktives Diol) ohne (o) bzw. mit (m) Diolreagens, und LD_o bzw. LD_m = Laufstrecke (cm) des Diols ohne (o) bzw. mit (m) Diolreagens. Die Chromatogramme wurden 20 Stunden im Durchlaufverfahren (Reagenzien Nr. 1–5 und 8–12) bzw. 3,5 Stunden (Nr. 6, 7 und 13) entwickelt. Weitere methodische Angaben im experimentellen Teil. o.E. = ohne Einfluss auf die Mobilität.

Nr.	Diolreagens	Imprägnierungslösung		ΔR_W	
		% Reagens [*]	pH	1,3-Diol	1,2-Diol
1	Metaborsäure	2	5	o.E.	o.E.
2	Borsäure	2	5	o.E.	o.E.
3	Natriummetaborat	2	11	o.E.	–83
4	Dinatriumtetaborat	2	9	o.E.	–76
5	Kaliumboroxalat ^{**}	2	5	o.E.	–20
6	Phenylborsäure	0.1	—	+460	o.E.
		1	—	+430 ^{***}	+344 ^{***}
7	Diphenylborsäure	5	—	+590 ^{***}	+505 ^{***}
8	Ammonium-meta-vanadat	0.5	5	o.E.	o.E.
9	Natriummolybdat	2	6	o.E.	o.E.
10	Natriumwolframat	2	8	o.E.	o.E.
11	Arsentrioxid	1	5	o.E.	+40
12	Arsenpentoxid	1	2; 7.4 [†]	o.E.	o.E.
13	Phenylarsonsäure	1; 5	—	o.E.	o.E.

^{*} In der Regel konnten höhere Konzentrationen infolge der geringen Löslichkeit der Reagenzien nicht geprüft werden.

^{**} Äquimolekulares Gemisch von Borsäure und Kaliumoxalat.

^{***} Hier ist $100 \times LD_m / LD_o - 100$ statt ΔR_W angegeben.

[†] pH-Einstellung mit NaOH.

An der Derivatbildung beteiligte Gruppen

Die beiden Cardenolide besitzen je fünf freie OH-Gruppen, die als Angriffsorte der Diolreagenzien in Frage kommen. Die chromatographischen Effekte der Diolreagenzien werden bereits durch die Ausschaltung nur einer OH-Gruppe der jeweiligen Diolgruppierung durch Acetylierung völlig aufgehoben. Damit ist bewiesen, dass nur die OH-Gruppen der jeweiligen Diolgruppierung mit dem Diolreagens offenbar unter

Bildung eines cyclischen Derivates reagieren. Die Bildung cyclischer Derivate ist für Borsäure²¹, Phenylborsäure²²⁻²⁴ und Diphenylborsäure^{25,26} durch Röntgenkristallstrukturanalyse bewiesen.

Borsäuren, Borate, Boroxalat

Meta- und Orthoborsäure (Tabelle I) beeinflussen die relativen Mobilitäten beider Dirole nicht. Offenbar sind unter den geprüften Bedingungen die Borsäureester nicht stabil. Im Gegensatz zur Papierchromatographie tritt jedoch bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G mit Borsäure (0.16% bezogen auf Kieselgel) beim 1,3-Diol Derivatbildung ein (mobile Phase: Chloroform + 10% Äthanol; $100 \times R_F$ in Gegenwart/Abwesenheit von Borsäure: 70/48), beim 1,2-Diol (bis 10% Borsäure) jedoch nicht (40/39). Die Borate (Nr. 3 und 4 in Tabelle I) sind ohne Einfluss auf das 1,3-Diol, vermindern aber die relative Mobilität des 1,2-Diols erheblich. Diese Spezifität der Boratkomplexbildung und die grössere Stabilität des 1,2-Diol-Komplexes gegenüber dem Ester stehen im Einklang mit Literaturangaben (z.B. Lit. 1 und 2).

Die Prüfung des Einflusses der Reagenskonzentration im Falle von Dinatriumtetraborat zeigt, dass mit wachsender Reagenskonzentration (0.2 bis 2%) die relative Mobilität weiter abnimmt ($\Delta R_w = -10$ bis -76). Dieses Verhalten lässt den Schluss zu, dass die wandernde Substanz das 1,2-Diol ist, dessen Wanderungsgeschwindigkeit durch zunehmende Bildung des polaren Boratkomplexes in der stationären Phase reduziert wird. Der stark basische Charakter der Borate verursacht ausserdem eine teilweise Desacetylierung beider Cardenolide sowie eine Acetylwanderung bei Acetyl-gitoxin- α zur β -Position. Diese Effekte treten in dem gesamten pH-Bereich (pH > 8.5) auf, in dem die Boratlösungen die relative Mobilität beeinflussen. Verseifung und Acetylwanderung lassen sich durch Anwendung von Kaliumboroxalat, das bei pH 5 Derivate bildet, vermeiden. Dieses Reagens wirkt ebenfalls nur auf das 1,2-Diol.

Phenylborsäure

Schon in niedriger Konzentration (0.1%) erhöht Phenylborsäure die relative Mobilität des 1,3-Diols beträchtlich. Erst bei höherer Konzentration (1%) wird auch die Mobilität des 1,2-Diols in gleichem Masse erhöht. Die Grösse der Mobilitäts-erhöhung durch Phenylborsäure ist unabhängig von der Diolareagenskonzentration. Danach ist die Erhöhung der Mobilität auf die Bildung eines Phenylborsäureesters zurückzuführen. Dass Phenylborsäure im Gegensatz zu Ortho- und Metaborsäure unter den geprüften Bedingungen ausreichend stabile Derivate bildet, entspricht der grösseren Hydrolysestabilität der Phenylborsäure- im Vergleich zu den Borsäure-estern²⁷.

Diphenylborsäure

Diphenylborsäure ist bei 1% ohne Einfluss und erhöht erst bei 5% die Mobilität beider Dirole. Diphenylborsäurekomplexe sind danach offenbar infolge grösseren Raumbedarfs des Reagenses weniger stabil als Phenylborsäureester oder Boratkomplexe. Bemerkenswert ist, dass im Gegensatz zum Borat, das nur mit 1,2-Diolen Derivate bildet, Diphenylborsäure mit beiden Diolen reagiert.

Vanadat, Molybdat, Wolframat

Die genannten Reagenzien sind ohne Einfluss auf die relative Mobilität der beiden Diole und danach unter den geprüften Bedingungen offenbar nicht in der Lage, eine Reaktion unter Bildung stabiler Derivate einzugehen.

Arsentrioxid, Arsenpentoxid, Phenylarsonsäure

Arsentrioxid erhöht die relative Mobilität des 1,2-Diols offenbar unter Bildung eines Arsenigsäureesters, der demnach stabiler ist als der analoge Borsäureester. Arsentrioxid reagiert dagegen nicht mit dem 1,3-Diol und verhält sich in dieser Beziehung wie die Borate. Arsenpentoxid und Phenylarsonsäure sind ohne Einfluss auf die Mobilität beider Diole.

Praktische Verwertbarkeit

Sieben der 13 Diolreagenzien sind unter den geprüften Bedingungen in der Lage, die relative Mobilität des 1,2- und/oder 1,3-Diols zu beeinflussen. Die Reagenzien unterscheiden sich z.T. beträchtlich in bezug auf Spezifität, Richtung und Ausmass der Beeinflussung sowie in bezug auf die pH-Wert-Anforderungen an die Derivatbildung.

Für die Anwendung zur Trennung von Cardenolidgemischen bzw. den Nachweis der An- oder Abwesenheit von *cis*-1,2- und/oder *cis*-1,3-Diolgruppen im Molekül stehen damit verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Die Anwendung der Diolreagenzien ist dabei nicht auf die Papierchromatographie beschränkt, sondern ist ebensogut auch bei der Dünnschichtchromatographie^{16,17} (auch an Kieselgel) möglich. Die beschriebene Spezifität von Phenyl- und Diphenylborsäure wurde auch bei anderen *cis*-1,2- bzw. *cis*-1,3-Diolen der Cardenolid- und Bufadienolidreihe geprüft²⁸. Dabei zeigte sich, dass sich die in dieser Arbeit gezogenen Schlussfolgerungen weitgehend verallgemeinern lassen.

DANK

Für geschickte experimentelle Mitarbeit danken wir Frau H. Timm und Frau I. Sümnick. Den Herren Dir. Dr. J. Renz (Basel) und Dr. G. Baumgarten (Wernigerode) sind wir für die freundliche Überlassung von Acetylgitoxin- α und 16-Acetylgitoxin sehr verbunden.

ZUSAMMENFASSUNG

Von 13 untersuchten Verbindungen haben sich 7 als geeignet erwiesen, die chromatographische Mobilität eines Cardenolid-1,2- bzw. -1,3-diols spezifisch zu beeinflussen. Die Arbeit beschreibt Verfahren zum Nachweis und zur verbesserten chromatographischen Trennung oder zur analytischen Klassifizierung von *cis*-1,2- und *cis*-1,3-Diolen der Cardenolidreihe.

LITERATUR

- 1 J. Dale, *J. Chem. Soc.*, (1961) 910, 922.
- 2 R. Köster, in E. Müller (Herausgeber), *Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie*, Band VI/2, Georg Thieme, Stuttgart, 4. Aufl., 1963, S. 171ff.

- 3 S. S. Cohen und D. B. M. Scott, *Science*, 111 (1950) 543.
- 4 L. J. Morris, *J. Chromatogr.*, 12 (1963) 321.
- 5 M. T. Krauss, H. Jäger, O. Schindler und T. Reichstein, *J. Chromatogr.*, 3 (1960) 63.
- 6 E. J. Bourne, E. M. Lees und H. Weigel, *J. Chromatogr.*, 11 (1963) 253.
- 7 R. J. Ferrier, W. G. Overend, G. A. Rafferty, H. M. Wall und N. R. Williams, *Proc. Chem. Soc. (London)*, (1963) 133.
- 8 H. J. Roth, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 103 (1963) 520.
- 9 P. J. Garegg und K. Lindström, *Acta Chem. Scand.*, 25 (1971) 1559.
- 10 H. Weigel, *Advan. Carbohydr. Chem.*, 18 (1963) 61.
- 11 M. L. Wolfrom und M. J. Holm, *J. Org. Chem.*, 26 (1961) 273.
- 12 B. Englund, *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsal.*, Ser. IV, 8 (3) (1932) 1.
- 13 E. J. Salmi, K. Merivuori und E. Laaksonen, *Suomen Kemistilehti B*, 19 (1946) 102.
- 14 J. Halmekoski, *Suomen Kemistilehti B*, 35 (1962) 39.
- 15 H. P. Deys, *Dissertation*, Reichsuniversität Utrecht, Utrecht, 1961.
- 16 J. Reichelt und J. Pitra, *Česk. Farm.*, 12 (1963) 416.
- 17 C. Lindig, P. Franke und K. R. H. Repke, *J. Prakt. Chem.*, 317 (1975) 17.
- 18 F. Kaiser, E. Haack und H. Spingler, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 603 (1957) 75.
- 19 F. Kaiser, *Chem. Ber.*, 88 (1955) 556.
- 20 O. Schindler und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 108.
- 21 J. D. Dunitz, D. M. Hawley, D. Mikloš, D. N. J. White, Yu. Berlin, R. Marušić und V. Prelog, *Helv. Chim. Acta*, 54 (1971) 1709.
- 22 H. Shimanouchi, N. Saito und Y. Sasada, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 42 (1969) 1239.
- 23 H. Andrew, J. Wang, I. C. Paul, K. L. Rinehart, Jr. und F. J. Antosz, *J. Amer. Chem. Soc.*, 93 (1971) 6275.
- 24 P. J. Cox, P. D. Cradwick und G. A. Sim, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, (1976) 110.
- 25 S. J. Rettig, J. Trotter und W. Kliegel, *Can. J. Chem.*, 52 (1974) 2531.
- 26 S. J. Rettig und J. Trotter, *Can. J. Chem.*, 54 (1976) 1168.
- 27 R. Megges, B. Streckenbach und K. Repke, *DDR-Wirtschaftspatent*, 77489 (1968).
- 28 R. Megges, B. Streckenbach und K. R. H. Repke, *J. Chromatogr.*, im Druck.