

# Über die Sokratine, das Obelin und andere Nebenalkaloide des Zigarrenrauches<sup>1</sup>

Von

**Friedrich Kuffner, Karl Schick und Herbert Bühn**

Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingelangt am 3. Oktober 1956)

Die papierchromatographische Untersuchung der Nebenalkaloide des Zigarrenrauches zeigt, daß im wesentlichen darin die auch in den verwendeten Zigarren enthaltenen Alkaloide vorhanden sind. In den mit Wasserdampf schwer flüchtigen Anteilen finden sich noch eine Anzahl unbekannter Alkaloide mit Pyridinring.

Von den von *Wenusch* und *Schöller* als neue Stoffe aufgefaßten Nebenalkaloiden ist  $\gamma$ -Sokratin als reines (—)-Nicotin erkannt worden,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sokratin enthalten hauptsächlich Nicotyrin und  $\alpha, \beta'$ -Bipyridyl; Obelinpikrat ist mit Ammoniumpikrat identisch. Da die Wasserdampfdestillation keine gute Methode zur glatten Trennung oder zur Charakterisierung von Tabakalkaloiden vorstellt, wird der Verlauf der Dampfdestillation solcher Gemische papierchromatographisch verfolgt und dabei (wahrscheinlich) das Nicotellin wiederentdeckt.

Gute Dienste zur mikropräparativen Trennung von Alkaloidgemischen leistet die Säulenchromatographie an gepuffertem Cellulosepulver.

*A. Gautier* und *G. LeBon*<sup>2</sup> haben als erste klar erkannt, daß im Tabakrauch zahlreiche Nebenalkaloide das Nicotin begleiten. Ihre Absicht, darüber näher zu berichten, haben sie aber nicht durchgeführt. Später

<sup>1</sup> Zum Teil vorgetragen beim 14. Internationalen Kongreß für Reine und Angewandte Chemie in Zürich am 26. Juli 1955.

<sup>2</sup> *A. Gautier* und *G. LeBon*, C. r. acad. sci., Paris **115**, 992 (1892). Höher siedende Anteile des Rohnicotins haben schon *A. Cahours* und *A. Etard* [Bull. soc. chim. France (2) **31**, 459 (1880)] als Nebenalkaloide aufgefaßt.

haben dann *A. Wenusch* und *R. Schöller*<sup>3</sup> in mühsamen Untersuchungen die Nebenalkaloide des Tabakrauches zu trennen versucht. Ihr bedeutendster Erfolg war dabei die Entdeckung des kristallisierbaren Myosmins (im Zigarrenrauch), dessen Konstitutionsformel später *E. Späth*, *A. Wenusch* und *E. Zajic*<sup>4</sup> ermittelt haben. Außer dieser wohldefinierten neuen Base haben *Wenusch* und *Schöller* noch eine größere Anzahl anderer Basen des Zigarren- oder auch Zigarettenrauches durch ihr Verhalten bei der Wasserdampfdestillation und bei Ausschüttelungsoperationen, vielfach auch durch Darstellung von Pikraten oder Pikrolonaten unterschieden, ferner haben sie auf Grund einiger qualitativer Reaktionen gewisse Aussagen über den Bau ihrer Tabakrauchalkaloide gemacht<sup>5</sup>.

Inzwischen waren auch mehrere Arbeiten über die Nebenalkaloide des Tabaks (und zwar in erster Linie der technischen Tabaklaugen) bekannt geworden. Wir stellen im folgenden die (mit neueren Befunden ergänzte) Liste der Tabakalkaloide einer Liste der Tabakrauchalkaloide

Tabelle I

a) Alkaloide, welche in Tabaken gefunden wurden:	b) Alkaloide, welche im Rauch von Zigarren oder Zigaretten gefunden wurden:
Nicotin	Nicotin
Nicotyrin	Nicotyrin
Nornicotin (akt. und rac.)	
Myosmin	Myosmin
Pyridyl-methylketon	Pyridyl-äthylketon
Anabasin (akt. und rac.)	$\alpha$ -Sokratin
Anatabin (akt. und rac.)	$\beta$ -Sokratin
N-Methylanabasin	$\gamma$ -Sokratin
N-Methylanatabin	Obelin
$\alpha, \beta'$ -Bipyridyl	Pyridin (und Homologe)
Nicotinsäure	Poikilin
Nicotinsäureamid	Lohitam
Nicotin-N-oxyd	Lathraein
Nicotellin	Gudham (nur im
Nicoton („Oxazolidon“)	Zigarettenrauch)
Piperidin	Pyrrolderivate
N-Methylpyrrolin und -pyrrolidin	Methylamin
Trimethylamin	Ammoniak
Isoamylamin	
Ammoniak	

<sup>3</sup> Die nicht leicht zugänglichen Arbeiten von *Wenusch* sind in einem Artikel „Tabak-Alkaloide“ von *E. Späth* und *F. Kuffner* referiert: Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **2**, 276 (1939); in Zeile 4 (von unten) sind dort die Worte „und Nornicotin“ zu streichen.

<sup>4</sup> *E. Späth*, *A. Wenusch* und *E. Zajic*, Ber. dtsh. chem. Ges. **69**, 393 (1936).

<sup>5</sup> *A. Wenusch* und *R. Schöller*, Fachl. Mitt. österr. Tabakregie 1936/I/3.

gegenüber, wie sie vor kurzem<sup>6</sup> in Wiederholung älterer Angaben<sup>7</sup> aufgestellt wurde (Tabelle 1).

Was an diesen Listen besonders auffällt ist, daß neben dem in beiden Fällen weit überwiegenden Nicotin die vorhandenen Nebenalkaloide nur zum kleinen Teil übereinstimmen. Es mußte daraus der Schluß gezogen werden<sup>7</sup>, daß solche Basen durch eine Zersetzung des Nicotins in der Oxydationszone entstehen. Vermutlich war dabei an Oxydations- und Krackprozesse gedacht, und die nur in kleinen Mengen vorhandenen Nebenalkaloide mochten daneben ganz zurücktreten; übrigens können viele von ihnen in der Glutzone dieselben Produkte geben wie das Nicotin, mit welchem sie chemisch meist nahe verwandt sind.

Um eine Identifizierung der Tabakrauch-Nebenalkaloide durchführen zu können, haben wir<sup>8</sup> die Möglichkeiten, Pikrate und Pikrolonate von Tabakalkaloiden papierchromatographisch zu identifizieren, studiert und gefunden, daß der einfachste Weg für die geplante Untersuchung in einer Zerlegung dieser schwerlöslichen Salze auf dem Startpunkt des Papierchromatogramms ist, da bei Verwendung von Diisopropylamin die Basen die gleichen  $hR_f$ -Werte geben<sup>9</sup>, wie wenn sie als freie Basen aufgebracht werden.

Da zu einer papierchromatographischen Identifizierung ein  $hR_f$ -Wert ebensowenig ausreicht wie ein einziger Schmelzpunkt, haben wir eine größere Anzahl von Lösungsmittelsystemen herangezogen. Als erstes haben wir<sup>8</sup> eines der von *W. L. Porter, J. Naghski* und *J. A. Eisner*<sup>11</sup> angegebenen Lösungsmittel benutzt, jedoch das verwendete Papier entweder mit Ammonchloridlösung (von uns als Lösungsmittelsystem S 1 bezeichnet) oder mit Acetatpuffer (S 2) imprägniert. Auf mit demselben Puffer imprägniertem Papier verwendeten wir auch ein von *T. C. Tso* und *R. N. Jeffrey*<sup>12</sup> benutztes Lösungsmittelsystem (L 1), ferner ein Lösungsmittel von *S. M. Partridge*<sup>13</sup> (L 2). Die Flüchtigkeit der Essigsäure machte es aber wünschenswert, weniger flüchtige Puffersysteme anzuwenden, um konstantere Bedingungen und vor allem rundere Flecke zu erhalten. Nach mannigfachen Versuchen fand sich im Ammontartrat eine sehr brauchbare Imprägnierung des Papiers, mit welchem wir dann wieder das Lösungsmittelsystem von *Tso* und

<sup>6</sup> *A. I. Kosak*, Exper. 10, 69 (1954).

<sup>7</sup> *A. Wenusch*, Österr. Chem.-Ztg. 42, 230 (1939).

<sup>8</sup> *F. Kuffner* und *K. Schick*, Fachl. Mitt. österr. Tabakregie 1954/II/1.

<sup>9</sup> Als  $hR_f$ -Werte bezeichnen *F. Kuffner* und *N. Faderl*<sup>10</sup> das Hundertfache der  $R_f$ -Werte, um die lästigen Dezimalen zu vermeiden.

<sup>10</sup> *F. Kuffner* und *N. Faderl*, Mh. Chem. 86, 999 (1955).

<sup>11</sup> *W. L. Porter, J. Naghski* und *A. Eisner*, Arch. Biochemistry 24, 461 (1949).

<sup>12</sup> *T. C. Tso* und *R. N. Jeffrey*, Arch. Biochem. Biophys. 43, 269 (1953).

<sup>13</sup> *S. M. Partridge*, Biochemic. J. 42, 238 (1949).

*Jeffrey* (L 3), das *Partridge*-System (L 4), ein Butanol-Pyridin-Wasser-system (L 5) und ein weiteres Lösungsmittel von *Porter*, *Naghski* und *Eisner*<sup>11</sup> (mit kleinen Modifikationen: L 6) verwendeten. Schließlich ist für manche Trennungen die schon von *Kuffner* und *Schick*<sup>8</sup> empfohlene 15%ige NaCl-Lösung (E 1) sowie Ammontartratlösung verwendet worden (E 2).

Die mit allen diesen von uns verwendeten Systemen ermittelten  $hR_f$ -Werte finden sich in Tabelle 2; sie sind, da wir ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen arbeiten, nicht streng reproduzierbar, die Systeme trennen aber zum Teil sehr gut, so daß man durch Mitlaufenlassen von Vergleichspräparaten und unter Berücksichtigung der bisweilen recht charakteristischen Farbnuancen bei der *Königschen* Reaktion auf Pyridinringe<sup>14</sup> zu sicheren Aussagen gelangt.

Tabelle 2. Verwendete Lösungsmittelsysteme

- S 1: Butanol-(1) : Benzol : Acetatpuffer (0,2 m, pH = 5,7) = 85 : 5 : 30 auf mit 0,2 m Ammonchloridlösung imprägniertem Papier.  
 S 2: Butanol-(1) : Benzol : Acetatpuffer (0,2 m, pH = 5,7) = 85 : 5 : 30 auf mit dem gleichen Acetatpuffer imprägniertem Papier.  
 L 1: tert. Amylalkohol : Acetatpuffer (0,2 m, pH = 5,7) = 1 : 1, auf mit dem gleichen Puffer imprägniertem Papier.  
 L 2: Butanol-(1) : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5, auf mit Acetatpuffer (0,2 m, pH = 5,7) imprägniertem Papier.  
 L 3: tert. Amylalkohol : Acetatpuffer (0,2 m, pH = 5,7) = 1 : 1, auf mit 0,2 m Ammontartratlösung (pH = 6,5) imprägniertem Papier.  
 L 4: Butanol-(1) : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5, auf mit 0,2 m Ammontartratlösung imprägniertem Papier.  
 L 5: Butanol-(1) : Pyridin : Wasser = 3 : 1 : 3, auf mit 0,2 m Ammontartratlösung imprägniertem Papier.  
 L 6: Methanol : Isoamylalkohol : Benzol : Acetatpuffer (0,2 m, pH = 5,7) = 31 : 15 : 50 : 8 auf mit 0,2 m Ammontartratlösung imprägniertem Papier.  
 E 1: 15%ige wäßrige NaCl-Lösung.  
 E 2: 2 m Ammontartratlösung (ungepuffertes Papier).

Der Acetatpuffer wurde durch Mischen von 0,2 m Essigsäure mit 0,2 m Natriumacetatlösung im Verhältnis 1 : 10 hergestellt. Bei den zweiphasigen Lösungsmitteln wurde die Oberphase verwendet. Die Papierimprägnierung erfolgte durch Besprühen des vertikal hängenden Bogens mit der Lösung in horizontalen Reihen und Trocknen über Nacht. Die untersten 3 cm des Bogens wurden abgesehnt.

Mit den so geschaffenen bzw. geprüften Methoden haben wir dann auch die Tabakrauchalkaloide untersucht, wobei wir, wie üblich, den großen Nicotinüberschuß durch fraktionierte Wasserdampfdestillation (bisweilen auch Fällung des Dipikrates aus großem Volumen) abtrennten

<sup>14</sup> W. König, J. prakt. Chem. [2] 69, 1, 105 (1904).

und ähnlich wie *Wenusch* und *Schöller*<sup>15</sup> aufarbeiteten. Es zeigte sich, daß der von uns durch mechanisches Abrauchen von Zigarren gewonnene Rauch in erster Linie die Alkaloide enthielt, welche auch in unseren Zigarren enthalten waren, wobei immerhin außerdem sehr kleine Mengen neuer Alkaloide nachweisbar waren. Mit großer Sicherheit identifizierten wir in dem mit Wasserdampf mehr oder weniger leicht flüchtigen Anteil Nicotin, Nornicotin, Anabasin, Anatabin und  $\alpha,\beta'$ -Bipyridyl, ferner Myosmin, Nicotin-N-oxyd, Nicotin und Nicotinsäure. In Substanz gefaßt und durch Mischprobe des Pikrats und Pikrolonats identifiziert wurde Pyridin (vgl. <sup>15c</sup>). Einige in kleiner Menge vorhandene Pyridinderivate, die in manchen Fraktionen auftraten, blieben unidentifiziert. Da die von uns zur Sichtbarmachung verwendete *König*-Reaktion<sup>14</sup> Pyridinringe anzeigt, können wir über das Vorkommen von Basen, welche diesen Ring nicht enthalten, keinerlei Aussagen machen.

Jedenfalls sind einige Stoffe vorhanden, welche die *König*-Reaktion nicht geben, aber im Lichte der Analysenquarzlampe fluoreszieren.

Keine unserer Nebenalkaloidfraktionen war auch nur annähernd einheitlich, obwohl wir uns, um eine Zuordnung zu den von *Wenusch* und *Schöller* gemachten Angaben zu erleichtern, im wesentlichen an den von diesen Pionieren des Arbeitsgebietes gefundenen Trennungsgang hielten. Es ist aber klar, daß die Trennung so kleiner Mengen nahe verwandter Stoffe sehr schwierig ist.

Da diese überraschenden Befunde erheblich von den Ergebnissen abwichen, welche *Wenusch* und *Schöller* erhalten hatten, haben wir die wenigen noch erhaltenen Originalpräparate dieser Forscher ebenfalls papierchromatographisch geprüft.

Als erstes stand uns ein  $\gamma$ -Sokratin-pikrolonat zur Verfügung. Obwohl diese Probe etwa 20 Jahre alt war, zeigte sie noch den richtigen Schmelzpunkt und war im Papierchromatogramm praktisch einheitlich, was für die sorgfältige Arbeitsweise der genannten Autoren charakteristisch ist. Der  $hR_f$ -Wert des Originalpräparats von reinem  $\gamma$ -Sokratin lag nun in allen von uns herangezogenen Lösungsmittelsystemen dort, wo Nornicotin auftritt, auch die Farbnuance bei der *König*-Reaktion (mit Benzidin und Bromcyan) war gleich. Die Identität von  $\gamma$ -Sokratin<sup>15</sup> mit linksdrehendem Nornicotin, das als Nebenalkaloid des Tabaks bekannt ist, folgt aber auch aus dem von *Wenusch* und *Schöller* angegebenen Pikrolonatschmp. (256°), während der des Pikrolonates der rac. Base erheblich tiefer läge. Es mag überraschen, daß *Wenusch* und *Schöller* diese Identität nicht selbst festgestellt haben, doch wird dies sofort verständlich, wenn man bedenkt, daß Nornicotin mit Wasserdampf schwer flüchtig ist, während die Sokratine gerade im Wasserdampfdestillat

<sup>15</sup> a) *A. Wenusch* und *R. Schöller*, *Fachl. Mitt. österr. Tabakregie* 1933/II/1; b) ebenda 1934/I/5; c) ebenda 1935/I/11; d) ebenda 1935/III/2.

der rohen Rauchalkaloide gefunden wurden. Erst unter Verwendung größerer Basenmengen und von Kolonnen hat man in neuerer Zeit nachgewiesen, daß z. B. das Myosmin, das ebenfalls im Dampfdestillat der Tabakrauchalkaloide auftritt, mit Wasser kein Azeotrop gibt<sup>16</sup>. Überdies werden die charakteristischen Geruchsnuancen, welche *Wenusch* an den Sokratinen beobachtete, für Nornicotin nicht angegeben.

Ein zweites Originalpräparat von *Wenusch* und *Schöller* war als rohes Gemisch von  $\alpha$ - +  $\beta$ -Sokratin-pikrolonat deklariert, während leider Reinpräparate dieser beiden Tabakrauchalkaloide nicht verfügbar sind. Die papierchromatographische Untersuchung dieses Präparats zeigte, daß es, ebenso wie entsprechende Fraktionen, welche wir selbst gewonnen hatten, als Hauptkomponenten Nicotyrin und  $\alpha, \beta'$ -Bipyridyl enthält, daneben kleinere Mengen Nicotinsäure, Nornicotin und vielleicht Anatabin, Nicotin-N-oxyd und andere Produkte, darunter eines, das unter der Quarzlampe intensiv fluoresziert. Damit ist also gezeigt, daß die von uns oben beschriebenen Befunde nicht etwa darauf zurückzuführen sind, daß wir mit einer anderen Zigarrensorte arbeiteten (Rositas der Austria-Tabakwerke A. G.; *Wenusch* und *Schöller* verwendeten *Britanicas* der Österr. Tabakregie, welche heute nicht mehr erzeugt werden, aber den Rositas sehr ähnlich waren), und auch nicht auf die Modifikationen der Abrauchapparatur und des Abrauchvorganges.

Vergleicht man die Schmelzpunkte, welche *Wenusch* und *Schöller* für die Pikrolonate von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sokratin angegeben haben, mit denen, welche wir für die des Nicotyryns und des  $\alpha, \beta'$ -Bipyridyls gefunden haben, so wird die papierchromatographische Identifizierung doch wieder recht unwahrscheinlich, da so starke Schmelzpunktsdepressionen zwischen den beiden reinen Pikrolonaten nicht beobachtet werden konnten und auch nicht zu erwarten waren.

	Pikrat	Pikrolonat
$\alpha$ -Sokratin . . . . .	—	104°
$\beta$ -Sokratin . . . . .	150°	130°
Nicotyrin . . . . .	171°	224°
$\alpha, \beta'$ -Bipyridyl . . . .	168°	240°

Wir haben deshalb das Originalpräparat weiteren Untersuchungen unterworfen. Zunächst zeigte die Elementaranalyse, daß es sich um ein Monopikrolonat handeln dürfte, und es ist bekannt, daß die beiden von uns vermuteten Komponenten gegen Säuren, wie Pikrinsäure, einwertig sind. Ferner haben wir Versuche zur präparativen Auftrennung des Originalpräparats gemacht, wobei uns vor allem die Säulenchromatographie gute Dienste leistete. Wir haben sie zunächst an Gemischen von Tabakalkaloiden studiert und gefunden, daß Cellulosepulver, das mit

<sup>16</sup> C. F. Woodward, A. Eisner und P. G. Haines, J. Amer. Chem. Soc. **66**, 911 (1944).

Ammoniartratlösung imprägniert wurde, sich gut zur präparativen Trennung kleiner Mengen der Tabakalkaloide eignet<sup>17</sup>. Deshalb destillierten wir die Basen (aus dem Originalpräparat) im Vakuum und unterwarfen sie der Chromatographie an der imprägnierten Cellulosepulversäule (Abb. 1). Obwohl eine vollkommene Trennung wegen der geringen Menge nicht gelang, erhielten wir doch Fraktionen, deren Pikrate bei 153 bis 159° bzw. bei 131 bis 138° schmolzen. Ähnliche Schmelzpunkte gaben Pikrate, welche die vermuteten Basen in ähnlichen Mengenverhältnissen enthielten, wobei diese Mengenverhältnisse aus der Farbintensität von Papierchromatogrammen geschätzt wurden.

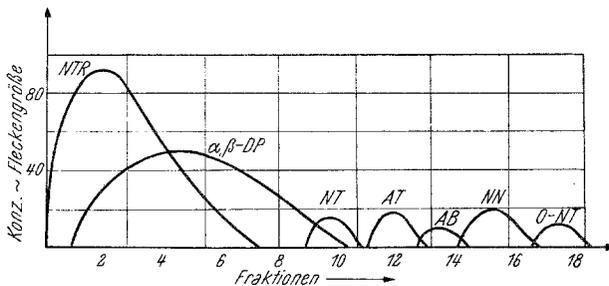


Abb. 1. Auftrennung des  $\alpha$ - +  $\beta$ -Sokratins an einer acetatgepufferten (0,2 m) Cellulosesäule

Mit unserer Identifizierung stimmt die Beobachtung von *Wenusch* und *Schöllner* überein, daß  $\gamma$ -Sokratin (das ist Nornicotin) stärker basisch ist als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sokratin (Nicotylin und  $\alpha, \beta'$ -Bipyridyl) und daß die Sokratine (Nornicotin und Nicotylin) bei der Oxydation von Nicotindipikrat unter bestimmten Bedingungen in kleinen Mengen entstehen<sup>5</sup>.

Ein interessantes Verhalten zeigte bei der papierchromatographischen Untersuchung noch ein drittes als Originalpräparat vorhandenes Produkt von *Wenusch* und *Schöllner*, das Obelinpikrat<sup>15c, d</sup>. Unsere damit aufgenommenen Papyrogramme zeigten nämlich nur den Fleck der Pikrinsäure, während das Pikrat, ehe es gelaufen war, die *König*-Reaktion gab. Ein solcher Farbfleck aber lief nach kurzer Zeit aus und verschwand schließlich ganz. Ähnliches Verhalten zeigen auch andere leicht flüchtige Pyridinderivate. Da also die papierchromatographische Methode nicht angewandt werden konnte, entschlossen wir uns, das Originalpräparat der Elementaranalyse zu unterwerfen. Das Ergebnis zeigte eindeutig,

<sup>17</sup> Unsere Methode wurde mit Erfolg auch von *H. Kuhn* und *H. Bühn*<sup>18</sup> für die Untersuchung von Nebenalkaloiden der Handelstabake verwendet. Diese Autoren haben auch papierchromatographisch mit unseren Solvenssystemen gearbeitet. Leider erfolgte eine Bezugnahme auf uns an unrichtiger Stelle.

<sup>18</sup> *H. Kuhn* und *H. Bühn*, *Fachl. Mitt. österr. Tabakregie* 1956/I/6.

daß Obelinpikrat mit reinem Ammoniumpikrat identisch ist. Mit diesem Befund stimmt der Schmp. des Obelinpikrolonates (270°) überein, und auch der für das Obelinpikrat von *Wenusch* und *Schöller* angegebene Schmp. ist dem in der Literatur schwer auffindbaren des Ammonpikrates gleich<sup>15c, d</sup>. Wir überzeugten uns ferner davon, daß sowohl Ammonpikrat als auch Diisopropylamin bei der *Königschen* Reaktion ein ähnliches Verhalten zeigen wie Obelinpikrat. Nicht ganz klar ist, wieso für Obelin Geruchlosigkeit angegeben wird<sup>15e</sup>; es mag dies mit den sehr geringen Alkaloidmengen und der Flüchtigkeit der Base zusammenhängen. Auch eine Äquivalentgewichtsbestimmung<sup>19</sup>, bei welcher der Wert 146 erhalten wurde, mag zur Nichterkennung beigetragen haben. Ammoniak ist als Bestandteil des Tabakrauches schon von *Zeise*<sup>20</sup> nachgewiesen worden, wird aber bei Aufzählung der „Alkaloide“ nie genannt.

In den nicht mit Wasserdampf flüchtigen Fraktionen des Tabakrauches, in welchen *Wenusch* und *Schöller* Anodmin, Gudham (im Zigarettenrauch), Lohitam und Lathraein entdeckt haben<sup>15</sup>, fanden wir neben sieben bekannten, mit Sicherheit identifizierbaren Nebenbasen (Myosmin,  $\alpha, \beta'$ -Bipyridyl, Anabasin, Anatabin, Nornicotin, Nicotinsäure und Nicoton) noch etwa ein halbes Dutzend unbekannter Basen, welche die *König*-Reaktion gaben, dazu etwa ebenso viele Verbindungen, welche zwar im UV-Licht fluoreszierten, aber weder *König*-Reaktion gaben noch mit 1%iger Jodlösung oder FeCl<sub>3</sub> sichtbar gemacht werden konnten. Die geringen verfügbaren Mengen all dieser Stoffe haben es uns nicht erlaubt, sie mit einer der Basen von *Wenusch* und *Schöller* zu identifizieren oder gar eine Konstitutionsermittlung durchzuführen.

Während die Papierchromatographie schon wiederholte Male für die Untersuchung von Tabaken auf ihre bekannten und auch unbekanntem Alkaloide herangezogen wurde<sup>12, 19, 21</sup>, liegt nur *eine* größere Untersuchung über Tabakrauchalkaloide vor, und zwar von *L. Leiserson* und *Th. B. Walker*<sup>22</sup>. Diese Autoren, welche eine sehr subtile Methodik entwickelt haben, finden im Zigarettenrauch eine größere Anzahl von Alkaloiden, welche Pyridinderivate sind, und deren  $R_f$ -Werte mit denen von Vergleichssubstanzen (Tabakalkaloide) übereinstimmen. Wenn diese Autoren dennoch nicht von einer Identifizierung ihrer Rauchalkaloide sprechen, so deshalb, weil sie, ähnlich wie z. B. *Tso* und *Jeffrey*<sup>12</sup>, nur mit *einem* Solvenssystem arbeiten, so daß eine bloß zufällige Übereinstimmung von  $R_f$ -Werten ohne weiteres möglich wäre. Wir haben dadurch, daß wir stets mehrere Solvenssysteme herangezogen haben,

<sup>19</sup> *R. Schöller*, Fachl. Mitt. österr. Tabakregie 1936/III/13.

<sup>20</sup> *W. Ch. Zeise*, Ann. Chem. Pharmac. 47, 212 (1843).

<sup>21</sup> a) *R. Wahl*, Tabakforsch. Nr. 5 (1951); b) *E. Wegner*, Tabakforsch., Sonderheft 1953, 20; c) *H.-B. Schröter*, Kulturpflanze 3, 114 (1955).

<sup>22</sup> *L. Leiserson* und *Th. B. Walker*, Analyt. Chemistry 27, 1129 (1955).

daß wir  $hR_f$ -Werte, welche höher liegen als etwa 80, mit besonderer Reserve auswerteten und für viele Stoffe sehr charakteristische Werte in bestimmten Solvenssystemen kennen, eine weit höhere Sicherheit unserer Aussagen erreicht. Eine noch charakteristischere Identifizierungsmöglichkeit bietet die zweidimensionale Papierchromatographie.

Da ungepufferte Papiere mit Basen meist erhebliches Ziehen der Flecke verursachen, auf imprägnierten aber beim zweiten Lauf keine Sicherheit besteht, ob die Imprägnierung noch genügend gleichförmig ist, wurde bei den Tabakalkaloiden kaum jemals zweidimensional gearbeitet. Wir haben aber mit gutem Erfolg zweidimensionale Papyrogramme erhalten, z. B. auch, wenn wir die von *Kuffner* und *Schick* eingeführten Salzlösungen zum ersten Lauf und dabei zugleich zur Imprägnierung für den zweiten Lauf verwendeten. Da wir stets ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen arbeiten und andererseits Temperatur, die Sättigung der Atmosphäre („Liner“ nach *Leiserson* und *Walker*<sup>22a</sup>; hier zeigt sich sogar ein Einfluß der Phase, in welche der Liner

eintaucht) und andere Versuchsbedingungen sicher Einfluß auf die  $R_f$ -Werte haben, lassen wir immer, wie auch bei präziseren Versuchen üblich, Vergleichspräparate mitlaufen. Beim zweidimensionalen Papyrogramm tun wir dies in beiden Dimensionen getrennt (vgl. Abb. 2). Auch diese Versuche haben alle jene Identifizierungen, welche wir oben als gesichert bezeichnen, stets bestätigt, und wir glauben daher nicht, daß sich hier noch Änderungen als notwendig erweisen werden.

Wir haben schon erwähnt, daß die Wasserdampfdestillation keine gute Charakterisierungs- und Trennungsmethode für Gemische von Tabakalkaloiden, vor allem nicotinreiche, vorstellt. Um empirisch die

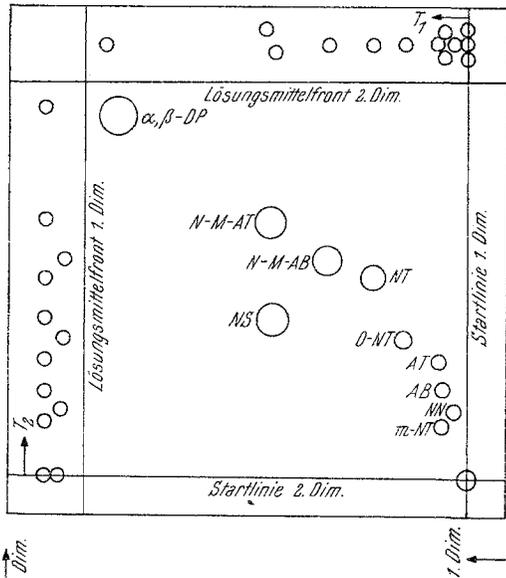


Abb. 2. Wiedergabe eines zweidimensionalen Chromatogramms verschiedener Tabakalkaloide.  $\text{NH}_4$ -tartrat-imprägniertes Papier 0,2 m. 1. Dim.: 3; 2. Dim.: 6.  $T_1$ : Testsubstanz 1. Dim.;  $T_2$ : Testsubstanz 2. Dim.

<sup>22a</sup> Eine derartige Vorrichtung hat schon vor *Leiserson* und *Walker* *W. Matthias* (Quedlinburg) beschrieben: *Der Züchter* **24**, 313 (1954).

hier waltenden Verhältnisse näher kennenzulernen, haben wir einen technischen Tabakextrakt der Wasserdampfdestillation unterworfen, nachdem er stark alkalisch gemacht worden war. Wir fingen dabei 80 Fraktionen auf, deren papierchromatographische Untersuchung zeigte, daß schon in den ersten 10 Fraktionen die Hauptmenge des Nicotins übergegangen ist. Sehr bald folgt Anabasin, ab Fraktion 5 auch Anatabin; von der 8. Fraktion an erscheint Normnicotin, viel später (Frakt. 20)  $\alpha, \beta'$ -Bipyridyl und ab Frakt. 23 Nicotyryl. Während die Menge des

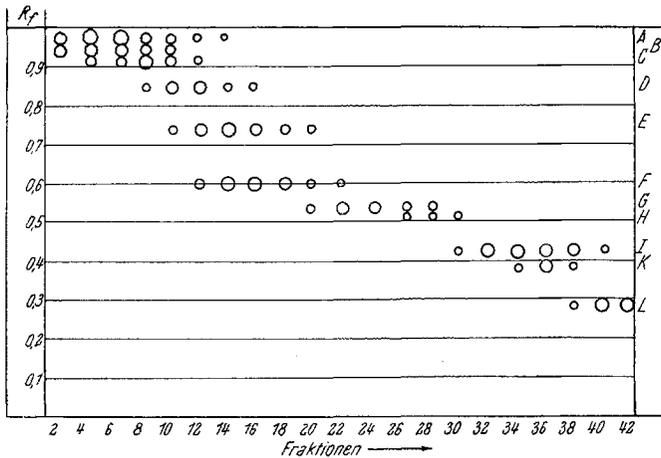


Abb. 3. Auftrennung eines nicht wasserdampflichen Extraktes an einer acetatgepufferten Cellulosesäule, 0,2 m. Wiedergabe der einzelnen Fraktionen in einem Papierchromatogramm. Lösungsmittelgemisch L 1

übergehenden Anabasins annähernd konstant bleibt und auch Normnicotin sehr schleichend übergeht, nimmt der Gehalt der Fraktionen an Anatabin allmählich ziemlich stark zu, so daß es in den Fraktionen 30 bis 55 als Hauptalkaloid auftritt; aber auch in den letzten Fraktionen sind, wenn man höhere Konzentrationen im Chromatogramm aufträgt, noch alle „dampflichen“ Alkaloide nachweisbar. Da der Versuch ohne jede Vorsichtsmaßregel durchgeführt wurde, mögen hier bei sorgfältigem Arbeiten noch verschiedene Effekte zu finden sein, sicher ist aber, daß der Vorgang recht kompliziert ist (vgl. *Wenusch* und *Schöller*<sup>23</sup>).

Im nichtflüchtigen Anteil (Volum etwa 2 l) fanden sich auch dann noch immer die meisten der überdestillierbaren Alkaloide in merklicher Menge (Abb. 3); hier konnte auch bei geeigneter Aufarbeitung neben anderen eine Base gefunden werden, die sehr wahrscheinlich mit dem Nicotellin identisch ist, das 1901 von *A. Pictet* und *A. Rotschy*<sup>24</sup> entdeckt und später

<sup>23</sup> *A. Wenusch* und *R. Schöller*, *Fachl. Mitt. österr. Tabakregie* **1937/III/1**.

<sup>24</sup> *A. Pictet* und *A. Rotschy*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **34**, 696 (1901). — *A. Pictet*, *Arch. Pharmaz.* **244**, 388 (1906).

nur noch von *E. Noga*<sup>25</sup> isoliert wurde. Es ist übrigens das einzige der recht zahlreichen Tabakalkaloide, welche jene Autoren als Pyridinderivate beschrieben haben, welches sich später als einheitliches Individuum erwiesen hat.

### Experimenteller Teil

#### Abrauchversuche und Papierchromatographie der Fraktionen

Während *Wenusch* und *Schöller* mit Zigarren der Marke „Britanica“ der Österr. Tabakregie arbeiteten (Nicotiningehalt 2%), verwendeten wir die Marke „Rositas“ der Austria Tabakwerke A. G. mit 1,88% Nicotin. Auch unsere Abrauchapparatur lehnte sich an die von *Wenusch*<sup>26</sup> angegebene an, sie war aber automatisiert. Statt des die Mundhöhle imitierenden Gummiballons diente ein Rundkolben von 100 ml Inhalt, die Züge wurden mittels eines hoch untersetzten Elektromotors von einem Messing-Dreiweghahn besorgt. Die 6 g schweren Zigarren wurden in 30 Zügen von je 2 Sek. Dauer mit Rauchpausen von 20 bis 30 Sek. abgeraucht. Die verkürzten Rauchpausen können auf die Zusammensetzung des Rauches höchstens im quantitativen Sinne Einfluß haben, da mit Ausnahme der Glutzone die Zigarre in jedem Falle auf belanglos niedere Temperatur kommt. Gleichzeitiges Abrauchen mehrerer Zigarren an einem „Kamm“ führte zu ungleichmäßigem Abbrand und wurde daher unterlassen.

Der Inhalt des Absorptionstraktes, welcher mit einer Lösung von 5 Gew.-% Schwefelsäure in 50%igem Alkohol beschickt war, wurde nach Abrauchen von 1000 Zigarren zentrifugiert und im Vak. vom Alkohol befreit; mit diesem gingen viele Geruchsträger über, dagegen keine Basen, welche die *König*-Reaktion gaben. Dann wurde alkalisch gemacht, mit Wasserdampf erschöpfend destilliert und auch weiter ungefähr nach den Angaben von *Wenusch* und *Schöller*<sup>15</sup> aufgearbeitet.

Die erhaltenen Fraktionen, welche die Sokratine enthalten sollten, wurden ebenso wie die Lohitamfraktion papierchromatographisch untersucht, wobei wir die obenstehenden Lösungsmittelgemische (Tabelle 2) verwendeten und, wo angegeben, das Papier (Schleicher & Schüll 2043 b, rau) mit Puffer- oder Salzlösungen imprägnierten (durch Besprühen mit den entsprechenden Flüssigkeiten in horizontalen Reihen; die drei untersten Zentimeter des Bogens wurden verworfen). Als Reaktion zur Sichtbarmachung benutzten wir ausschließlich die auf Pyridinringe ansprechende Reaktion nach *W. König*<sup>14</sup>, indem wir die ausreichend getrockneten Bogen in horizontalen Reihen mit 0,5%iger alkohol. Benzidinlösung besprühten und nach dem Übertrocknen, z. B. mit einer Infrarotlampe (*Elstein*-Rohr), den Bogen in einen Zylinder stellten, welcher Bromcyankristalle enthielt.

Die auftretenden Farbnuancen sind nicht auf jeder Imprägnierung gleich, doch gestatten sie, wenn man mit Vergleichspräparaten arbeitet, bisweilen zusätzliche Identifizierungen bzw. beweisen sie Nichtidentität bei gleichen  $hR_f$ -Werten.

Wir haben sehr viel mit L 1 gearbeitet, sehr gut ist auch L 6 brauchbar, das z. B. Anatabin und m-Nicotin gut trennt. Dies ist insofern von Wichtigkeit, als vielfach m-Nicotin als Inhaltsstoff von Tabaken angegeben wird, obwohl Anatabin sehr ähnliche  $hR_f$ -Werte liefert und als Vergleichssubstanz

<sup>25</sup> *E. Noga*, Fachl. Mitt. österr. Tabakregie 1914/I/1.

<sup>26</sup> *A. Wenusch*, Fachl. Mitt. österr. Tabakregie 1931/I/1; 1932/II/1.

vielen Autoren nicht zur Verfügung steht. Wir haben wahrscheinlich niemals m-Nicotin in Tabak oder Tabakrauch auffinden können. S 1 trennt  $\alpha, \beta'$ -Bipyridyl vom Myosmin, welche oft ähnliche Farbnuancen geben, auch E 1 und E 2 trennen diese Basen gut, ferner Nicotellin, Nicotyryl, Nornicotin. Die recht schwierige Trennung von Methylanabasin und Methylanatabin gelingt mit L 3 und L 5, letzteres gibt auch für Oxynicotin (Nicotin-N-oxyd) einen charakteristischen Wert. E 1 und E 2 als Salzlösungen sind den üblichen Lösungsmittelsystemen so unähnlich, daß sie oft  $hR_f$ -Werte geben, welche von denen in anderen Solventien besonders stark abweichen. Mittelwerte der gefundenen  $hR_f$ -Werte gibt Tabelle 3.

Tabelle 3.  $hR_f$ -Werte der wichtigsten Tabakalkaloide und verwandter Verbindungen

	S 1	S 2	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	L 6	E 1	E 2
Nicotin .....	27	89	89	78	25	77	48	50	89	90
Nornicotin .....	26	47	40	76	04	73	10	16	86	85
Nicotinsäure .....	45	12	10	58	51	67	61	41	88	68
Anabasin .....	36	57	54	83	06	77	17	22	84	89
Anatabin .....	31	62	63	79	06	72	18	30	82	88
$\alpha, \beta'$ -Bipyridyl .....	86	92	93	96	95	95	92	94	45	41
Myosmin .....	58	90	91	90	90	85	90	91	60	69
Nicotyryl .....	94	95	96	97	96	97	97	97	40	40
Nornicotin .....	89	95	96	97	96	96	96	96	26	28
Nicotin-N-oxyd .....	33	36	22	77	17	76	37	35	94	88
Nicoton .....	86	93	95	95	95	95	93	90	83	77
m-Nicotin .....	—	54	64	86	06	81	21	14	75	84
Nicotinsäureamid .....	59	60	81	79	84	79	74	80	75	72
Nicotellin .....	—	84	93	96	94	97	96	98	12	—
Dihydro-m-nicotin .....	—	55	59	77	05	64	19	15	89	—
Methyl-m-nicotin .....	—	67	72	83	07	72	21	25	79	—
N-Methyl-anabasin .....	33	88	94	85	37	82	58	55	85	—
N-Methyl-anatabin .....	28	90	95	84	53	77	72	66	90	—
$\beta$ -Pyridyl-methylketon .....	79	86	92	94	96	91	97	96	77	—

Für zweidimensionale Chromatogramme empfehlen wir L 3 (in der ersten Richtung) und L 6. Ein Gemisch von 10 Alkaloiden (Nicotinsäure, Nicotin, Nornicotin, Anabasin, Anatabin, m-Nicotin,  $\alpha, \beta'$ -Bipyridyl, N-Methylanabasin und N-Methylanatabin sowie Nicotin-N-oxyd) gab damit tatsächlich 10 getrennte Flecke. Günstige Kombinationen sind auch 0,2 m Ammonchloridlösung (I. Dimension) und ein von Porter, Naghski und Eisner<sup>11</sup> angegebenes Solvens (wobei wir allerdings Isoamylalkohol statt des n-Pentanol verwendet): Methanol-Isoamylalkohol-Benzol-Acetatpuffer (0,2 m, pH 5,7) im Verhältnis 31 : 15 : 50 : 8; wir geben dafür keine  $hR_f$ -Werte an, weil wir zu wenig oft damit gearbeitet haben. Läßt man in I. Dimension 0,2 m Ammontaratlösung laufen, so kann man in 2. Dimension L 3 verwenden, oder das eben genannte Lösungsmittel nach Porter, Naghski und Eisner. Dieses Lösungsmittel kann für die 2. Dimension auch nach L 1 (auf acetatgepuffertem Papier) dienen.

Wir arbeiteten immer aufsteigend, ohne Temperaturkontrolle. Deshalb sind die  $hR_f$ -Werte zwar gut zur Orientierung, aber nur beim Mitlaufen

von Vergleichssubstanzen zur Identifizierung brauchbar, also nicht als reproduzierbare, absolute Werte aufzufassen. Die hier gegebenen  $hR_f$ -Werte weichen in manchen Fällen in den gleichen Lösungsmitteln erheblich von denen ab, welche sich in der Arbeit von *H. Kuhn* und *H. Bühn* (l. c.) finden. Dies ist vor allem auf die Menge der gesprühten Imprägnierungslösung zurückzuführen, die z. T. schwer konstant zu halten ist, z. T. bewußt variiert werden kann, um bestimmte Auftrennungseffekte zu verbessern.

Myosmin gibt eine viel weniger intensive Farbreaktion als die meisten übrigen Tabakalkaloide.

#### Untersuchung von Originalpräparaten von *Wenusch* und *Schöller*

Reines  $\gamma$ -Sokratinpikrolonat zeigte den Literaturschmp. und erwies sich papierchromatographisch als Nornicotin; der Schmp. des Pikrolonates des im Tabak vorkommenden (—)-Nornicotins stimmt mit dem des  $\gamma$ -Sokratins<sup>15c</sup> überein.

Das Gemisch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sokratinpikrolonat (Original *A. Wenusch*, Schmp. 120—132°) gab folgende Analysenzahlen:

Gef. C 55,35, H 4,45.

Ber.  $C_{10}H_8N_2 \cdot C_{10}H_8O_5N_4$  (Bipyridyl-monopikrolonat) C 57,14, H 3,05,

$C_{10}H_8N_2 \cdot 2 C_{10}H_8O_5N_4$  (Bipyridyl-dipikrolonat) C 52,63, H 3,53,

$C_{10}H_{10}N_2 \cdot C_{10}H_8O_5N_4$  (Nicotylin-monopikrolonat) C 56,87, H 4,29,

$C_{10}H_{10}N_2 \cdot 2 C_{10}H_8O_5N_4$  (Nicotylin-dipikrolonat) C 52,48, H 3,82.

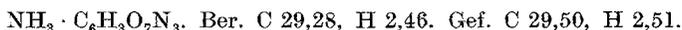
Zur präparativen Anreicherung der papierchromatographisch nachgewiesenen Komponenten diente die Säulenchromatographie an imprägnierten Cellulosepulversäulen. Die Zusammensetzung der dabei erhaltenen Fraktionen wurde laufend papierchromatographisch kontrolliert.

Das Cellulosepulver (Schleicher & Schüll Nr. 123) wurde mit Pufferlösung (Versuch I: 0,2 m Acetatpuffer, pH 5,7; Versuch II: 0,2 m Ammontartratlösung) angeteigt und auf einem Bogen Filtrierpapier an der Luft (nicht zu scharf) getrocknet. Dann wurde es in einem Mörser fein verrieben. Wichtig für eine saubere Trennung ist natürlich eine gleichmäßige Lagerung des Materials in der Säule (Durchmesser 15 mm, Länge 30 cm), weshalb das Cellulosepulver in möglichst kleinen Portionen eingebracht, durch Schütteln gleichmäßig verteilt und mit einem Stopfer festgestampft wurde. 0,5 g Probe wurden mit gepuffertem Cellulosepulver und einer kleinen Menge des verwendeten Solvensgemisches angeteigt, sorgfältig verrieben und auf die fertige Säule aufgebracht; auch hier geben Inhomogenitäten zu starken Störungen Anlaß. Über die Substanzschicht bringt man noch etwa 5 mm Cellulosepulver auf, stampft wieder fest und entwickelt mit dem gewählten Solvens. Je nach der verwendeten Substanzmenge und der Zahl der zu erwartenden Komponenten fängt man Fraktionen von 1 bis 10 ml auf, im Falle des Sokratinegemisches je 1 ml. Die Trennwirkung der Solvenssysteme ist ähnlich wie bei der Papierchromatographie, nahe benachbarte Flecke können in etwas veränderter Reihenfolge auftreten, wie dies auch bei der Papierchromatographie<sup>21c</sup> bei kritisch eingestellten Lösungsmitteln vorkommt, wenn man, wie wir, unter ganz einfachen Bedingungen arbeitet. Schwierigkeiten treten auch auf, wenn die Mengenverhältnisse sehr verschieden sind. Auch bei der Säulenchromatographie sind Stoffe mit niedrigen  $hR_f$ -Werten besser zu trennen als solche mit  $hR_f$  über 80; zweckmäßig trennt man die am raschesten laufenden Anteile nochmals an einer langen Säule nach.

Das Gemisch von  $\alpha$ - +  $\beta$ -Sokratinpikrolonat wurde mit verd. Salzsäure zersetzt, von etwas Pikrolonsäure filtriert und ausgeäthert. Dann wurde alkalisch gemacht, das Basengemisch ausgeäthert und im Vak. überdestilliert. Die papierchromatographische Prüfung der mit dem Lösungsmittel L 1 an der Säule getrennten Fraktionen gibt unsere Abb. 1 wieder, wobei die Mengenverhältnisse in den Fraktionen nach der Fleckengröße geschätzt wurden:

Aus Frakt. 1 sowie dem Gemisch der Frakt. 6 bis 8 wurden die Pikrate dargestellt und ihre Schmp. mit ähnlich zusammengesetzten Testgemischen verglichen (siehe S. 755).

Obelinpikrat wurde analysiert und als Ammoniumpikrat erkannt:



#### Wasserdampfdestillation eines technischen Tabakextrakts

5 kg Tabaklauge wurden mit NaOH bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt und unter Einleiten von Wasserdampf destilliert. Dabei wurden 80 Fraktionen zu je etwa 500 ml aufgefangen, jede Fraktion salzsauer gemacht, im Vak. eingengt, mit KOH alkalisch gemacht und 3mal mit je 10 ml Äther ausgezogen. Die einzelnen Fraktionen wurden mit L 1 papierchromatographisch untersucht. Über die Ergebnisse siehe oben (S. 758).

Der Destillationsrückstand (zirka 2 l) wurde alkalisch 5 Tage lang mit Äther extrahiert, der Ätherextrakt eingengt und der Rückstand im Vak. destilliert. Das so erhaltene Gemisch von mit Wasserdampf schwer flüchtigen Basen wurde zunächst an einer 30 cm langen Säule mit imprägniertem Cellulosepulver mit dem Lösungsmittelsystem L 1 vorgetrennt (siehe Abb. 3), die am schnellsten laufenden Anteile (Fraktion 1 bis 20) wurden vereinigt, im Vak. destilliert und auf einer 1 m langen imprägnierten Cellulosepulversäule nochmals getrennt. Jede zweite Fraktion wurde papierchromatographisch mit L 1 untersucht und dabei etwa ein Dutzend von Pyridinalkaloiden gefunden, unter denen Nicotin, Anatabin, Anabasin, Nornicotin und Nicotin-N-oxyd mit Sicherheit,  $\alpha, \beta'$ -Bipyridyl und vielleicht eine kleine Menge m-Nicotin erkannt wurden. Eine der schnell laufenden Fraktionen enthielt wahrscheinlich Nicotellin; für diese angenommene Identität sprach auch die charakteristische scheinbare Beweglichkeit bei der Papierelektrophorese nach *H. Michl*, *H. Kuhn* und *H. Bühn*<sup>27</sup>.

Diese Arbeit wurde von der Austria Tabakwerke A. G. (Österr. Tabakregie) durch ein Forschungsstipendium sowie durch Überlassung der benötigten Zigarren (Rositas), der Tabaklauge und der unersetzlichen Originalpräparate von *Wenusch* und *Schöller* entscheidend gefördert und unterstützt. Wir möchten der genannten Monopolfirma dafür auch an dieser Stelle unseren aufrichtigsten Dank aussprechen. Herrn Dr. *G. Kainz*, der an diesem Institut die Elementaranalysen ausgeführt hat, sind wir dafür zu bestem Dank verpflichtet.

<sup>27</sup> *H. Michl*, *H. Kuhn* und *H. Bühn*, *Fachl. Mitt. österr. Tabakregie* 1956/I/13.