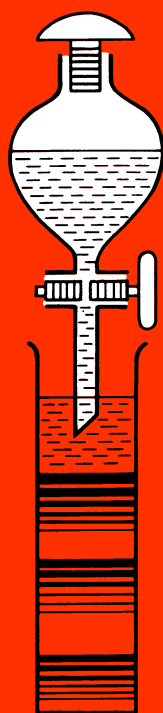
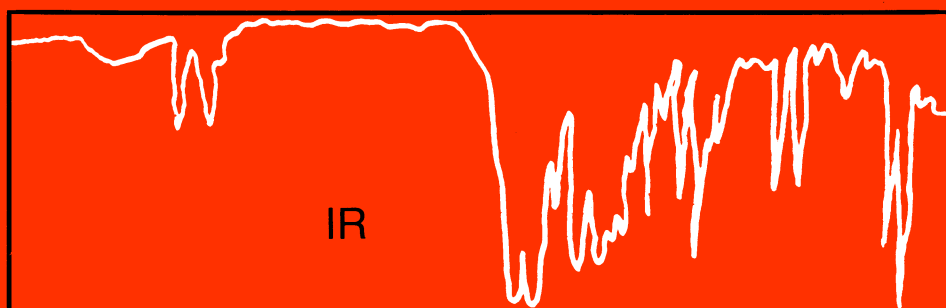
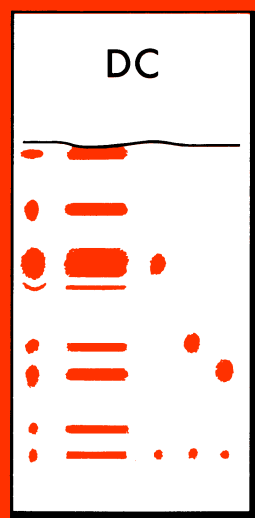


Egon Stahl · Werner Schild

Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen



SC



IR

Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · New York

Egon Stahl · Werner Schild

Isolierung und
Charakterisierung von Naturstoffen

Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen

Von
Egon Stahl und Werner Schild

26 Abbildungen
2 Tabellen
53 Formeln
53 Spektren

SCANNED BY MEPHISTO



Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · New York · 1986

Anschriften der Verfasser:

Professor Dr. Dr. h. c. mult. Egon Stahl
Friedrich-Ebert-Straße 29, 6930 Eberbach/Neckar

Dr. Werner Schild
Universität des Saarlandes, Fachrichtung 14.4
– Pharmakognosie und Analytische Phytochemie
6600 Saarbrücken 11

CIP-Kurztitelaufnahme der Deutschen Bibliothek

Stahl, Egon:

Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen /
von Egon Stahl u. Werner Schild. –
Stuttgart ; New York : Fischer, 1986.
ISBN 3-437-30511-5

NE: Schild, Werner:

© Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · New York · 1986
Wollgrasweg 49 · 7000 Stuttgart 70 (Hohenheim)

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt.
Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes
ist ohne Zustimmung des Verlags unzulässig und strafbar.
Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen
und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Satz: Fotosatz Jovanović, Neuhaus-Vornbach
Druck und Einband: Passavia-Druckerei, Passau
Printed in Germany

ISBN 3-437-30511-5

Vorwort

Sowohl in den Bereichen der Chemie, der Biochemie und der Pharmazie als auch in denen der Biologie und der Biotechnologie gehört das Isolieren von Reinsubstanzen aus den entsprechenden Biomassen zum Handwerkszeug. Es ist daher zweckmäßig, die Grundkenntnisse anhand ausgewählter Beispiele bereits während des Studiums zu erwerben. Hinzu kommt, daß Naturstoffisolierungen einen anschaulichen, praktischen Einblick in die Verfahrenstechniken geben und zu einer Wertschätzung derartiger Produkte führen.

Aus der großen Zahl an Möglichkeiten wurden nur solche Stoffe ausgewählt, die von praktischem Interesse sind und deren Gewinnung in ihrem Schwierigkeitsgrad, Aufwand und Zeitbedarf in einem Praktikum realisierbar sind. Von der nachstehenden Auswahl kann ein Anfänger zwei bis drei Isolierungen pro Woche ausführen. Man findet jeweils eine oder mehrere erprobte Isolierungsvorschriften aus den verschiedenen Naturstoffgruppen. Ferner wurde Wert darauf gelegt, die verschiedenartigen Isolierungstechniken zu zeigen und neben Beispielen aus dem Pflanzenreich auch solche aus der Tierwelt auszuwählen.

Da zur Zeit kein deutschsprachiges Werk über Naturstoffisolierungen vorliegt, glauben wir, mit dieser Sammlung von mehrfach erprobten Vorschriften zur Isolierung und Charakterisierung eine Lücke schließen zu können. Für weitere Anregungen und Verbesserungsvorschläge sind wir dankbar.

Saarbrücken, im Winter 1985

Egon Stahl und Werner Schild

Inhalt

1	Methoden	1
1.1	Extraktionsverfahren	3
	Mazeration	4
	Digestion	4
	Perkolatation	4
	Soxhlet-Extraktion	5
	Extraktion mit flüssigen oder überkritischen Gasen	5
	Verteilungsverfahren	6
	Schonendes Einengen der Extraktionsflüssigkeiten	7
1.2	Chromatographie, allgemein	8
	Die Verfahrensarten	8
	A. Adsorptionsverfahren	9
	B. Verteilungsverfahren	11
	C. Austauschverfahren	11
	1.2.1 Flüssigkeitschromatographie in gepackter Säule	11
	Auswahl der Trennsäule	12
	Füllen des Trennrohrs	12
	Probenaufgabe	13
	Elutionsvorgang	13
	Auffangen des Eluats	13
	Nachweis der Trennung im Eluat	14
	1.2.2 Weitere Chromatographie-Verfahren	15
	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	15
	Weiterführende Literatur	15
	Gaschromatographie	16
	Weiterführende Literatur	16
	1.2.3 Dünnschicht-Chromatographie	17
	Definition und Prinzip der DC	17
	Standardbedingungen	18
	A. Stationäre Phase (Schicht)	18
	Herstellung von DC-Schichten	18
	Imprägnierung der Schicht	20
	Industriell vorgefertigte Schichten	20
	B. Mobile Phase (Fließmittel)	21
	C. Kammer, Sättigung, Füllhöhe	21
	D. Start und Auftragemenge	22
	E. Entwicklung	23
	F. Vergleichslösung (Test- oder Standardgemisch)	23
	G. Untersuchungslösung (Herstellung ausgehend von der Droge)	23
	H. Nachweis der getrennten Substanzen	23
	UV-Lampen zur Fluoreszenzanregung	24
	Sichtbarmachung durch Aufsprühen von Reagentien	25
	I. Auswertung und Dokumentation der Chromatogramme	26
	R _f -Werte in der DC	26
	Visuelle Auswertung	27
	Dokumentation	27
	Weiterführende Literatur	27

1.3	TAS-Verfahren und Mikrosublimation	28
A.	Prinzip des TAS-Verfahrens	28
B.	Geräte zum TAS-Verfahren	28
C.	Weitere Fülltechniken und Treibmittel	30
D.	Notwendige Angaben für das TAS-Verfahren	32
1.4	Spektroskopische Methoden auf der Grundlage elektromagnetischer Strahlung	32
A.	Spektroskopie im sichtbaren und im UV-Bereich	32
B.	Infrarot-Spektroskopie	34
	Instrumentation und Meßmethodik	35
	Mikrotechnik	36
	Literatur zur Spektroskopie	37
2	Isolierung und Kennzeichnung von Naturstoffen	39
	Allgemeines	41
	Zur Stoffauswahl	41
	Zur Organisation (Zielvorstellung)	41
	Literatur	42
2.1	Isolierung von Aescin aus geschälten Roßkastaniensamen	42
2.2	und 2.3 Isolierung von Aesculin und Fraxin aus Roßkastanienrinde	45
2.4	Isolierung von Aleuritinsäure aus Schellack (Lacca)	49
2.5	Isolierung von Amygdalin aus bitteren Mandeln	51
2.6	und 2.7 Isolierung von Anethol und Fenchon aus Fenchelfrüchten	54
2.8	Isolierung von L-Arabinose aus Arabischem Gummi	57
2.9	Isolierung von Arbutin aus Bärentraubenblättern	59
2.10	Isolierung von Barbaloin (Aloin A) aus Kap-Aloe	63
2.11	Isolierung von Capsanthin aus Edelsüß-Paprika	65
2.12	Isolierung von Carminsäure aus Cochenille	68
2.13	Isolierung von (S)-(+)-Carvon aus Kümmelfrüchten	71
2.14	Isolierung von Cnicin aus Kardobenediktenkraut	73
2.15	Isolierung von Coffein aus schwarzem Tee	76
2.16	Isolierung von Colchicin aus Herbstzeitlosensamen	78
2.17	Isolierung von Cubebin aus Kubebenpfeffer	81
2.18	Isolierung von Didrovaltrat aus pakistanischen Baldrianwurzeln	84
2.19	Isolierung von L-Ephedrin (als Hydrochlorid) aus Ephedrakraut	87
2.20	Isolierung von Eugenol aus Gewürznelken	90
2.21	Isolierung von Fumarprotocetrarsäure aus isländischem Moos	92
2.22	Isolierung von Gallusgerbstoff (Tannin) aus Galläpfeln	95
2.23	Isolierung von Gelatine aus Schweineschwarte	97
2.24	Isolierung von 18 β -Glycyrrhetinsäure aus geschälter Süßholzwurzel	99
2.25	Isolierung von Hesperidin aus Orangenschalen	102
2.26	Isolierung von L-Hyoscyamin aus Belladonna-Blättern	104
2.27	Isolierung von Inulin aus Zichorienwurzel	107
2.28	und 2.29 Isolierung von Khellin und Visnagin aus Ammi visnaga-Früchten	110
2.20	Isolierung von Khellinin (= Khellolglucosid) aus Ammi visnaga-Früchten	114
2.31	und 2.32 Isolierung von Linalool und Linalylacetat aus Lavendelblüten	116
2.33	Isolierung von Liquiritin aus geschälter Süßholzwurzel	120
2.34	Isolierung von Malvinchlorid aus wilden Malvenblüten	122
2.35	Isolierung von Matricin aus Kamillenblüten	124
2.36	Isolierung von Myristicin oder Apiol oder Allyltetramethoxybenzol aus Petersilienfrüchten	127

2.37 und 2.38 Isolierung von Oleanolsäure und Crataegolsäure (= 2 α -Hydroxyoleanolsäure) aus Gewürznelken	131
2.39 Isolierung von Onocol (α -Onocerin) aus Hauhechelwurzel	135
2.40 Isolierung von Ouabain (g-Strophanthin) aus Strophanthus gratus-Samen	137
2.41 Isolierung von Paeoniflorin aus Pfingstrosenwurzel	139
2.42 Isolierung von Pepsin aus Schweinemagen	141
2.43 Isolierung von Piperin aus schwarzem Pfeffer	143
2.44 Isolierung von Rosmarinsäure aus Melissenblättern	145
2.45 Isolierung von Rutin aus Weinrautenkraut (Rutae herba)	148
2.46 Isolierung von α -Santonin aus Zitwerblüten	151
2.47 Isolierung von Sinalbin aus weißem Senf	153
2.48 Isolierung von β -Sitosterin (Sitosterol) aus Maiskeimöl	156
2.49 Isolierung von Spiraeosid aus Blüten der Spierstaude	159
2.50 und 2.51 Isolierung von Strychnin und Brucin aus Strychnos-Samen	161
2.52 Isolierung von Trimyristin aus Muskatnuß	165
2.53 Isolierung von Xanthorrhizol aus javanischer Gelbwurz	167
<hr/>	
3 Reagenzien-Verzeichnis	171
<hr/>	
4 Sachregister	177
<hr/>	

1 Methoden

1 Methoden

1.1 Extraktionsverfahren

Um aus einer «Biomasse» die niedermolekularen Inhaltsstoffe zu gewinnen, trennt man sie zu-
meist durch eine Lösungsmittel-Extraktion vom polymeren Trägermaterial (Zellulose, Lignin
etc.) ab. Die Auswahl des Lösungsmittels richtet sich nach der Polarität der zu extrahierenden
Stoffgruppe. Man kann entweder fraktioniert extrahieren und folgt dann der «Eluotropen
Reihe» (Tab. 1, S. 10) oder man strebt eine «Total-Extraktion» der löslichen Inhaltsstoffe an,
wie dies z.B. bei der Herstellung von Tinkturen und Extrakten geschieht.

Sowohl bei der Herstellung der «Untersuchungslösungen zur DC» als auch bei den Wertbestim-
mungsverfahren von Inhaltsstoffen bedient man sich geeigneter Extraktionsverfahren, aber
insbesondere bei den Isolierungsvorschriften (Teil 2) sind diese unumgänglich.

In all diesen Fällen können verschiedenartige Arbeitstechniken verwendet werden :

Mazeration

Digestion

Perkolation

Soxhlet-Extraktion

Perforation.

Eine Sonderstellung nimmt die Extraktion mit flüssigen oder mit überkritischen Gasen ein. –
Betrachtet man die Extraktionsverfahren als eine «Fest-Flüssig-Verteilung», dann gelten einige,
für alle Verfahren beachtenswerte Gesetzmäßigkeiten, die nachstehend in der einfachsten Form
zusammengefaßt sind.

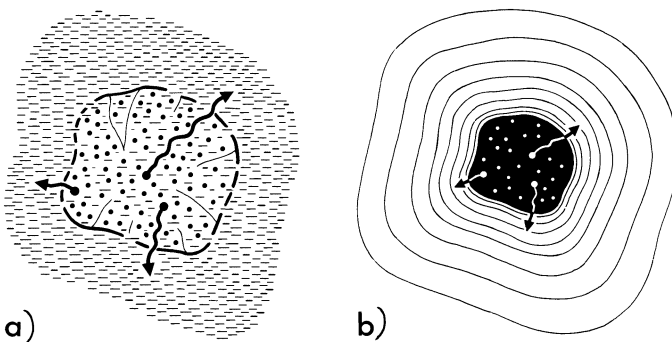


Abb. 1: a) symbolische Darstellung der unterschiedlich langen Diffusionswege aus einem Drogenteilchen;
b) symbolische Darstellung des sich ausbildenden Konzentrationsprofils der herausdiffundierten Inhalts-
stoffe um ein Drogenteilchen.

1. Die gelösten Stoffe gelangen aus dem «Festkörper», sprich: Drogenteilchen, durch Diffusion
in das Menstruum. Die Diffusionsvorgänge verlaufen langsam, und die Wegstrecke ist daher
ein zeitbestimmender Faktor (Abb. 1 a). Aus diesem Grund ist die Beachtung der Korngröße
(in μm) des Extraktionsmaterials wichtig, die bei den Vorschriften in Klammern angegeben
ist.
2. Bei einer einfachen Mazeration kann sich lediglich ein Gleichgewicht der Inhaltsstoffe im
Lösungsmittel und in dem Drogenmaterial einstellen. Deshalb führt nur eine Mehrfach-
Extraktion mit jeweils frischem Lösungsmittel zu einer «erschöpfenden» Extraktion (Ost-

WALDSches Auslaugungsgesetz). Bei einer Perkolation werden diese Voraussetzungen in einfacher und eleganter Art erfüllt.

3. Die Diffusionsvorgänge werden durch Wärme beschleunigt. Eine Digestion bringt also eine Verkürzung der Extraktionszeit.
4. Um jedes Drogenteilchen bildet sich bei der Extraktion ein Konzentrationsprofil aus (Abb. 1b). Es ist vorteilhaft, dieses fortlaufend zu zerstören, z. B. durch Rühren, Schütteln oder, wie bei der Perkolation, durch ständiges Vorbeifließen von neuem Lösungsmittel.

In der Pharmacopoea Helvetica VI (Arzneibuch der Schweiz) sind die darin verwendeten Extraktionsverfahren wie folgt charakterisiert:

Mazeration

Die Mazeration ist eine bei Raumtemperatur in nicht fließendem Lösungsmittel vorzunehmende, einmalige oder wiederholte Extraktion fester Arzneistoffe von vorgeschriebenem Zerkleinerungsgrad.

Die Mazeration wird unter häufigem, kräftigem Umrühren oder Umschütteln während der vorgeschriebenen Zeit in geeigneten, gut verschlossenen, vor Licht schützenden Gefäßen vorgenommen. Dann wird koliert und abgepreßt. Die vereinigten Auszüge (Kolatur und Preßflüssigkeit) werden, sofern nichts anderes vorgeschrieben ist, mindestens 8 Tage gut verschlossen unter Lichtschutz bei vorgeschriebener Temperatur stengelassen und hierauf bei derselben Temperatur filtriert. Das Filtrat wird auf den vorgeschriebenen Gehalt bzw. Verdampfungsrückstand eingestellt.

Digestion

Die Digestion ist eine bei 40–50° in nicht fließendem Lösungsmittel vorzunehmende Extraktion fester Arzneistoffe von vorgeschriebenem Zerkleinerungsgrad. Die Digestion wird unter häufigem, kräftigem Umrühren während der vorgeschriebenen Zeit in geeigneten, bedeckten, vor Licht schützenden Gefäßen vorgenommen. Nach dem Erkalten auf Raumtemperatur wird koliert und abgepreßt; dann werden die vereinigten Auszüge (Kolatur und Preßflüssigkeit) auf den vorgeschriebenen Gehalt bzw. Verdampfungsrückstand eingestellt.

Perkolation

Die Perkolation ist eine bei Raumtemperatur in fließendem Lösungsmittel kontinuierlich verlaufende Extraktion, die nach folgender allgemeiner Vorschrift auszuführen ist.

Die zur Perkolation bestimmte Arzneidroge von vorgeschriebenem Zerkleinerungsgrad wird mit der angegebenen Menge Extraktionsmittel gleichmäßig befeuchtet, durch Sieb 1400¹ geschlagen und in einem verschlossenen Gefäß 2 Stunden stengelassen. Hierauf wird die vorquollene Mischung nochmals durch Sieb 1400¹ geschlagen und so in einen an seinem Auslauf mit einem Wattepfropfen oder mit einer Sandschicht beschickten Perkulator (Abb. 2a) aus indifferentem Material gebracht, daß die Arzneidrogenmischung den Raum ohne Bildung von Hohlräumen gleichmäßig ausfüllt. Die obersten Schichten der Arzneidroge werden gleichmäßig festgedrückt und mit einem Filterpapier bedeckt. Hierauf gießt man langsam, ohne die Arzneidroge aufzuwirbeln, so viel vom vorgeschriebenen Extraktionsmittel auf, daß die Arzneidroge stets bedeckt ist. Sobald der Auszug aus dem Perkulator abzutropfen beginnt, wird der Auslauf verschlossen, der Perkulator bedeckt und 12 h stengelassen. Dann läßt man das Perkolat abtropfen, wobei die Abtropfgeschwindigkeit je nach der Arzneidrogenmenge reguliert wird. Bei Mengen bis zu 500 g läßt man 1 cm³ in der Minute, bei größeren Mengen pro kg Arzneidroge 3–5 cm³ in der Minute abfließen. Dabei muß das Arzneidrogenpulver durch Auf-

¹ Geändert, da ein Sieb 1600 nicht in Ph. Eur. (Europäisches Arzneibuch) aufgeführt ist.

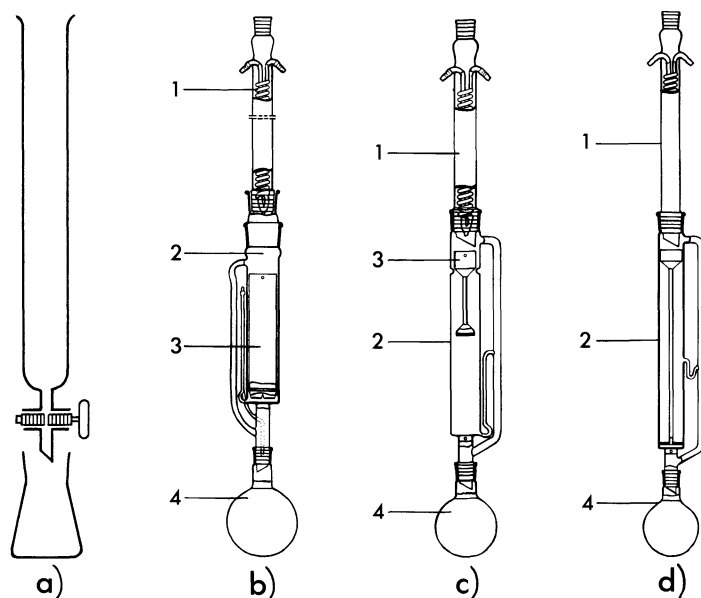


Abb. 2: Verschiedene apparative Möglichkeiten zur Extraktion.

a) Perkolationsrohr mit Auffangkolben; b) Soxhletapparatur: 1 Kühler, 2 eigentlicher Extraktionsteil, 3 Extraktionshülse, 4 Rundkolben; c) Perforator für spezifisch schwere Extraktionsmittel: 1 Kühler, 3 Trichter mit Fritte, 2 Mittelteil des Perforators, 4 Kolben; d) Perforator für spezifisch leichtere Extraktionsmittel: 1 Kühler, 2 Mittelteil des Perforators mit eingesetztem, langem Trichter mit Fritte, 4 Kolben.

gießen oder automatisches Zufließenlassen von Extraktionsmittel ständig bedeckt bleiben. Für die weitere Verarbeitung des Perkolates und der Preßflüssigkeit gelten die in den Monographien aufgeführten Vorschriften.

Soxhlet-Extraktion (Apparatur Abb. 2b)

Hier handelt es sich um ein kontinuierliches, wartungsfreies Extraktionsverfahren. Es schließt sich im Prinzip an eine Perkolation bei erhöhter Temperatur an. Nachteilig ist, daß die extrahierten Substanzen während der ganzen Laufzeit der Erhitzung und oft Überhitzung an der Kolbenwand ausgesetzt sind. Ein Problem ist auch die optimale Durchdringung des in eine Hülse gepackten Drogenmaterials durch das Lösungsmittel und das Abfließen. Bei einer Perkolation treten derartige Schwierigkeiten nicht auf, und sie ist daher oft effektiver.

Extraktion mit flüssigen oder überkritischen Gasen

Lipophile Stoffe lassen sich aus Drogen auch mit verflüssigten Gasen oder Gasen im überkritischen (gasförmigen) Zustand im Kreisprozeß extrahieren. Zumeist verwendet man hierzu das umweltfreundliche und kostengünstige Kohlendioxid. Interessant ist insbesondere die Verwendung des überkritischen Kohlendioxids (Temp. über 31,3 °C und Druck über 73 bar). Durch Drucksteigerung nimmt die Dichte und somit auch das Lösungsvermögen im Bereich zwischen 80 und 200 bar stark zu. Die Abscheidung der gelösten Stoffe erfolgt dann einfach durch Druckerniedrigung. Man kann sowohl die Extraktion als auch die Abscheidung fraktioniert vornehmen. Die Temperaturen liegen meist bei Verwendung von Kohlendioxid um 40 °C. Durch die notwendigen Druckbehälter, Armaturen und den Membrankompressor ist

die Anlage kostenaufwendig. Einzelheiten in: STAHL, E., K.-W. QUIRIN u. D. GERARD: Verdichtete Gase zur Naturstoffextraktion u. Raffination, Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York (1986).

Verteilungsverfahren

Befindet sich ein gesuchter Stoff nach der Extraktion in der flüssigen Phase (Extraktionslösung), kann oftmals eine weitere Anreicherung auf dem Wege einer Flüssig-Flüssig-Verteilung erreicht werden. Voraussetzung für dieses Verfahren sind zwei nicht miteinander mischbare Lösungsmittel, in denen die gesuchte Substanz unterschiedlich stark löslich ist und somit eine Verteilung erfolgt.

Es gelten dann folgende Gesetzmäßigkeiten:

Das Massenwirkungsgesetz für heterogene Gleichgewichte wird durch das NERNSTSche Verteilungsgesetz beschrieben.

$$\frac{c_{II}}{c_I} = K_T.$$

c_I = Konzentration des Stoffes A in Phase I.

c_{II} = Konzentration des Stoffes A in Phase II.

K_T = Verteilungskoeffizient bei gegebener Temperatur.

Das Verhältnis der Konzentrationen eines sich in zwei (unmischbaren) Phasen verteilenden Stoffes ist im Gleichgewicht bei gegebener Temperatur konstant.

Ist der Verteilungskoeffizient K_T bei gegebener Temperatur bekannt, läßt sich die Verteilung einer Stoffmenge auf zwei nicht mischbare Lösungsmittel berechnen.

c_0 = Konzentration in mol/l des ursprünglich in v_I l Lösungsmittel I gelösten Stoffes.

c_I = Konzentration in mol/l in v_I l Lösungsmittel I nach Durchmischen mit v_{II} l Lösungsmittel II.

c_{II} = Konzentration in mol/l in v_{II} l Lösungsmittel II nach Durchmischen.

Es gilt dann:

$$c_0 \cdot v_I = c_I \cdot v_I + c_{II} \cdot v_{II} \quad (A)$$

Daraus läßt sich dann der Stoffanteil $\alpha = \frac{c_I}{c_0}$ errechnen, der in der Phase I verbleibt.

$$(A): c_I \cdot v_I$$

$$\frac{c_0 \cdot v_I}{c_I \cdot v_I} = \frac{c_I \cdot v_I}{c_I \cdot v_I} + \frac{c_{II} \cdot v_{II}}{c_I \cdot v_I}$$

$$\frac{1}{\alpha} = 1 + K_T \cdot \frac{v_{II}}{v_I}$$

$$\alpha = \left[1 + K_T \cdot \frac{v_{II}}{v_I} \right]^{-1}$$

Nach n -maliger Extraktion ist der in v_I l des Lösungsmittels verbliebene Anteil:

$$\alpha_n = \left[1 + K_T \cdot \frac{v_{II}}{v_I} \right]^{-n}.$$

Da n als Exponent in der Gleichung steht, ergibt sich, daß mehrmalige Extraktion mit kleinen

Lösungsmittelmengen wirksamer ist als einmalige Extraktion mit großer Lösungsmittelmenge, wie an folgendem Beispiel gezeigt wird:

A: 5malige Extraktion von 10 cm^3 einer wäßrigen Lösung des Stoffes X mit je 10 cm^3 Chloroform.

B: 1malige Extraktion von 10 cm^3 einer wäßrigen Lösung des Stoffes X mit 50 cm^3 Chloroform.

Der Verteilungskoeffizient K_T sei 4

$$\text{A: } \alpha = \left(1 + 4 \cdot \frac{10}{10}\right)^{-5} = 5^{-5} = 3125^{-1} = 0,00032.$$

$$\text{B: } \alpha = \left(1 + 4 \cdot \frac{50}{10}\right)^{-1} = 21^{-1} = 0,0476.$$

Diese Berechnung zeigt, daß eine fünffache Ausschüttelung mit je 10 cm^3 Lösungsmittel (Beispiel A) um den Faktor 150 effektiver ist als eine einmalige Extraktion mit 50 cm^3 Lösungsmittel (Beispiel B).

Die einfachste und am meisten angewandte Vorrichtung, um eine Flüssig-Flüssig-Verteilung vorzunehmen, ist der Scheidetrichter, in dem das ein- oder mehrfache «Ausschütteln» vorgenommen wird. Um diesen Vorgang kontinuierlich zu gestalten, wurden die sog. Perforatoren (Abb. 4c, d) entwickelt und später z.B. nach dem Prinzip von Craig eine Verteilungsapparatur (Gegenstromverteilung). In jüngster Zeit gewinnt die Tropfen-Gegenstromchromatographie zumeist als Droplet-Counter-Current-Chromatography (DCCC) zur Isolierung polarer Naturstoffe, z.B. Glykoside, an Bedeutung.

Zum schonenden Einengen der Extraktionsflüssigkeiten

Im Hinblick auf die Thermolabilität zahlreicher Naturstoffe nimmt man generell das Einengen unter schonenden Bedingungen vor. Zumeist wird heute hierzu ein sog. Vakuum-Rotationsverdampfer (Abb. 3) verwendet. Er vereinigt 3 Vorteile; und zwar wird 1. durch das laufende Drehen des Kolbens (nur zur Hälfte füllen) ein Teil des Lösungsmittels als dünner Film über die ganze obere Kolbeninnenfläche verteilt und kann dann 2. durch das angelegte Wasserstrahlvakuum schonend entfernt werden und 3. werden Überhitzungen an der Kolbenwand vermieden.

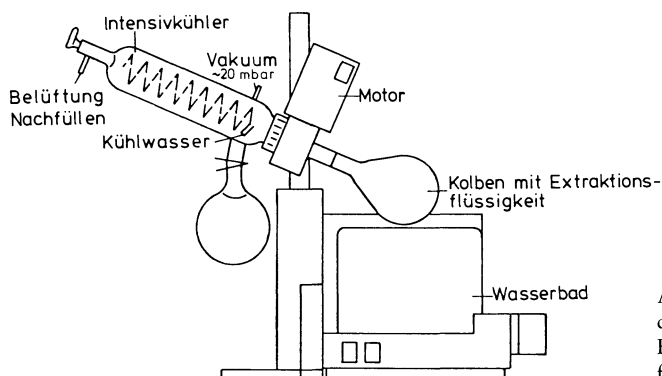


Abb. 3: Vakuum-Rotationsverdampfer (BÜCHI) zum schonenden Einengen von Extraktionsflüssigkeiten.

1.2 Chromatographie, allgemein

Die Chromatographie ist das meistverwendete physikalische-chemische Trennverfahren im analytischen Bereich. Das Gemeinsame bei den verschiedenen Arten der Chromatographie ist die Verfahrensweise: In einem mehr oder weniger langen Rohr befindet sich als *stationäre Phase* ein feinkörniger Stoff, das Sorbens¹. Es hat die Eigenschaft, die zu trennenden Stoffe vorübergehend festzuhalten. Der Transport erfolgt durch die *mobile Phase*, die ein geeignetes Lösungsmittel oder ein Gas sein kann. Gemeinsam ist ferner, daß es sich bei allen Arten der Chromatographie um ein Kopplungsverfahren handelt, das aus 3 Teilen besteht:

1. PROBENAUFGABE → 2. TRENNVORGANG → 3. DETEKTION.

Nach der verwendeten mobilen Phase gliedert man derzeit die verschiedenen Arten der Chromatographie wie folgt:

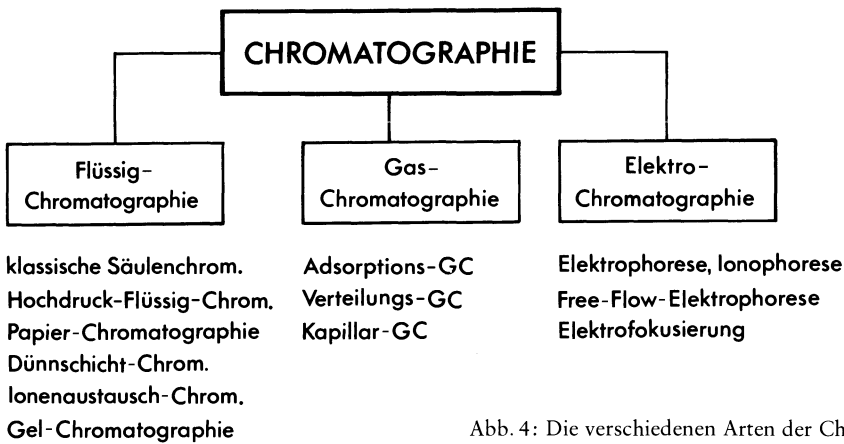


Abb. 4: Die verschiedenen Arten der Chromatographie.

Die Kunst des Chromatographierens besteht nun darin, 3 verschiedene Parameter so aufeinander abzustimmen, daß eine optimale Trennung erfolgt (Abb. 5). Dies ist in der Regel zeitaufwendig und setzt experimentelles Geschick voraus, und so wird auch verständlich, daß optimale Trennungen selten sind und oft über die Reproduzierbarkeit geklagt wird.

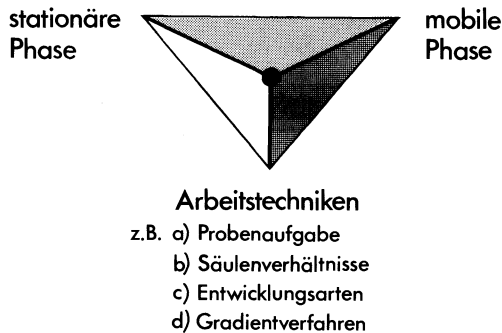


Abb. 5: Die drei Variablen, die man aufeinander abstimmen muß, um eine optimale Trennung zu erhalten. Man stelle sich die Pyramide auf der Spitze stehend ausbalanciert vor.

¹ Die stationäre Phase kann auch flüssig sein und an einem inerten Träger haften oder, wie bei der Kapillar-Gaschromatographie, an der Innenrohrwandung.

Die Verfahrensarten

A. Adsorptionsverfahren

1. Die *stationäre Phase*, d.h. das Füllmaterial für die Trennsäule, ist ein feinkörniges Adsorptionsmittel, wie z.B. Aluminiumoxid, Kieselgel, Kohle usw. Die Adsorptionsaktivität hängt von der Herstellung und dem Grad der Belegung der sog. aktiven Zentren mit polaren Stoffen ab. Bereits durch das in der Luft vorhandene Wasser kommt es bei ursprünglich aktiven Aluminiumoxid und Kieselgel schnell zu einer Inaktivierung. Hochaktives Aluminiumoxid hat nach BROCKMANN die Aktivitätsstufe I und inaktives die Stufe V. Zur Säulenchromatographie verwendet man häufig eine mittlere Aktivitätsstufe, z.B. II–III. Mit Hilfe von Farbstoffgemischen lassen sich die Aktivitätsstufen ermitteln (s. Chem. Ztg. 85, 371, 1961).

Zur Kennzeichnung der Adsorptionsmittel

Für die klassische Säulenchromatographie werden am häufigsten die feinporigen Kieselgele und die verschiedenen Aluminiumoxide verwendet. Der Korngrößenbereich liegt zumeist zwischen 0,05 und 0,2 mm, hierdurch ist eine normale Durchflußgeschwindigkeit bei Normaldruck gegeben. In den Trenneigenschaften unterscheiden sich die Produkte der verschiedenen Hersteller zumeist etwas, aber auch gelegentlich in den Herstellungschargen.

Die Adsorptionsmittel für die Dünnschicht-Chromatographie und für die Hochdruck-Flüssig-Chromatographie sind etwa um den Faktor 10 feiner vermahlen, d.h., die mittlere Teilchengröße liegt um 15 µm z. T. bei 5 µm.

Häufig verwendet wird ein Kieselgel 60, d.h. mit einem mittleren Porendurchmesser von 60 Å (= 6 nm) und einer spezifischen Oberfläche von 500 m²/g; der pH-Wert einer 10proz. wäßrigen Suspension liegt bei 7 (s. Tab. 2, S. 18).

Bei den Aluminiumoxiden gilt in bezug auf die Korngröße das gleiche. Hier muß man jedoch zwischen einem basischen (pH 10), neutralen (pH 7,5) und sauren (pH 4,5) Aluminiumoxid unterscheiden. Diese Produkte kommen zumeist mit der Aktivität I oder gar «Super I» in den Handel. Durch Zugabe einer entsprechenden Wassermenge (s. Hinweise auf den Packungen), kräftiges Durchmischen und mehrstündiges Stehenlassen in einem geschlossenen Gefäß nehmen sie die gewünschte Aktivität an, die jedoch kontrolliert werden sollte.

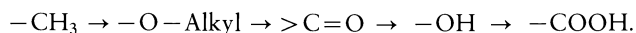
2. Die *mobile Phase*, d.h. das Lösungs- oder Elutionsmittel steht durch seine spezielle Eigenadsorption an das Adsorptionsmittel in enger Wechselwirkung mit letzterem. Die häufig in Betracht kommenden Lösungsmittel sind in Tab. 1 nach zunehmender Elutionswirkung geordnet. Einen Anhaltspunkt für die Polarität ergibt die Dielektrizitätskonstante (DK-Werte). Wichtig ist, daß man in der Adsorptionschromatographie nur reinste Lösungsmittel verwendet.

3. Grundregeln der Adsorptions-Chromatographie

- a) Gesättigte Kohlenwasserstoffe werden nicht oder nur gering adsorbiert und wandern daher am schnellsten. Ungesättigte Kohlenwasserstoffe werden um so stärker adsorbiert, je mehr Doppelbindungen sie enthalten und je mehr davon in Konjugation stehen.

Zur Trennung muß man daher ein aktives Adsorptionsmittel und ein weniger polares Fließmittel verwenden. Eine andere Möglichkeit ist die «Phasenumkehr»; die stationäre Phase ist hier mit einem Lipid imprägniert, und als mobile Phase dient ein hydrophiles Fließmittel.

- b) Werden funktionelle Gruppen in einen Kohlenwasserstoff eingeführt, so erhöht sich die Adsorptionsaffinität in nachstehender Folge:



Auf Aluminiumoxid- oder Kieselgelsäulen mittlerer Aktivität oder auf entsprechenden dünnen Schichten (s. DC) wandern z.B. mit Toluol, Benzol oder Methylenchlorid die Kohlenwasserstoffe am schnellsten,

Tab. 1: Eluotrope Reihe (Die Elutionswirkung nimmt von oben nach unten zu)

Lösungsmittel ¹	Siedepunkt in °C bei 760 Torr [= 1013 mbar]	Dielektrizitäts- konstante ε bei 20°	Viskosität in cP (= mPas) bei 20°
n-Hexan	68,7	1,890	0,326
Heptan	98,4	1,924	0,409
Cyclohexan	81,4	2,023	1,02
Tetrachlorkohlenstoff	76,8	2,238	0,969
Toluol	110,6	2,379 ²	0,590
Benzol ³	80,1	2,284	0,652
Dichlormethan	40,0	9,08	0,43
Chloroform	61,3	4,806	0,580
Ether (Diethylether)	34,6	4,34	0,233
Essigsäurethylester	77,1	6,02 ²	0,455
Pyridin	115,3	12,3 ²	0,974
Aceton	56,5	20,7 ²	0,316 ²
Ethanol	78,5	24,30 ²	1,2
Methanol	64,6	33,62	0,597
Wasser	100	80,37	1,002

¹ Weitere Lösungsmittel und ihre Eigenschaften im Biochem. Taschenbuch, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1964); Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio (1972).

² Bei 25°.

³ Benzol sollte aufgrund seiner Cancerogenität nicht verwendet werden.

d.h. im Frontbereich; danach folgen die Ester und Ether. Stärker zurückgehalten werden Ketone und Aldehyde und noch langsamer wandern die Alkohole. Die Säuren bleiben im Startbereich zurück. Die Reihenfolge der Trennung erfolgt also nach der Polarität der Verbindungen, maßgebend sind die Art und Zahl der funktionellen Gruppen.

Die Grundregeln der Adsorptions-Chromatographie und die Zusammenhänge lassen sich recht instruktiv in einem Dreiecks-Schema zusammenfassen (Abb. 6).

Man denke sich das schraffiert eingezeichnete Dreieck drehbar. Liegt nun z.B. ein Kohlenwasserstoffgemisch vor, so stelle man eine Spitze des Dreiecks auf «K.W.» ein (punktiert einge-

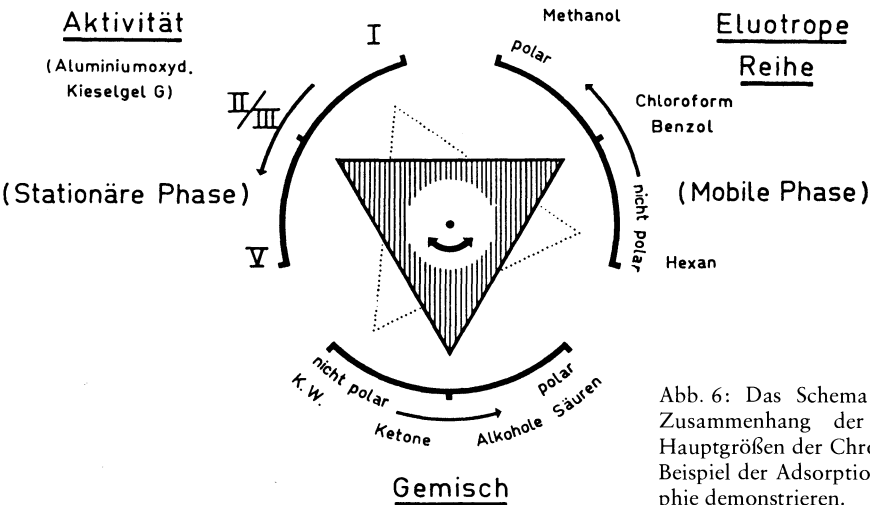


Abb. 6: Das Schema soll den engen Zusammenhang der drei variablen Hauptgrößen der Chromatographie am Beispiel der Adsorptions-Chromatographie demonstrieren.

zeichnet); die anderen beiden Spitzen (punktiert) zeigen dann, daß man ein nicht polares Fließmittel benötigt und ein aktives Sorptionsmittel. Bei der umgekehrten Einstellung, also in den Bereich der polaren Stoffgemische, zeigen die beiden freien Dreieckspitzen, daß man polare Fließmittel verwenden soll und keine hochaktive Sorptionsschicht benötigt.

Das Schema läßt sich zwanglos auch auf andere chromatographische Verfahren übertragen: Setzt man z.B. bei «Stationärer Phase» anstelle von «aktiv I» lipophil oder nicht polare und bei «nicht aktiv V» hydrophil oder polar, und vertauscht man bei der «Mobilen Phase» «polar» bzw. «hydrophil» gegen nicht polar bzw. lipophil usw., dann gilt das Schema für die Phasenumkehrverfahren in der PC und DC.

4. *Arbeitstechniken*: s. Säulenchromatographie (s. unten) und Dünnschicht-Chromatographie (S. 17)

B. Verteilungsverfahren

Eine Reihe organischer und anorganischer fester Stoffe lassen sich mit polaren Flüssigkeiten beladen (*stationäre Phase*) und halten diese auch fest, wenn eine damit nicht mischbare Flüssigkeit, die *mobile Phase*, vorbeifließt. Verteilungsvorgänge zwischen den beiden flüssigen Phasen bestimmen also die Trennung. Für jede Substanz ist ihr Verteilungsquotient maßgebend. Die beiden Flüssigkeiten sollten daher so gewählt werden, daß die NERNSTschen Verteilungskoeffizienten der zu trennenden Stoffe möglichst verschieden sind. – Das klassische, chromatographische Verteilungsverfahren ist die Papier-Chromatographie von Aminosäuren mit Butanol-Eisessig-Wasser (40 + 10 + 50). Hier findet die Verteilung zwischen der wassergesättigten Zellulose des Filterpapiers und der wassergesättigten, sauren Butanolphase statt.

Im Rahmen der dünn-schicht-chromatographischen Trennungen im Arzneibuch verwendet man für die Verteilung vorzugsweise *mikrokristalline Zellulose* als stationäre Phase. Einen Verteilungsvorgang hat man auch bei der sog. «Phasenumkehr-Methode». Hier wird ein «Träger», z.B. feinkörniges Kieselgur, mit flüssigem Paraffin imprägniert, und als mobile Phase dient dann z.B. Eisessig zur Auftrennung der Triglyceride nach ihrer C-Atomzahl.

C. Austauschverfahren

Das Merkmal dieses Verfahrens liegt darin, daß die *stationäre Phase* aus einem ionenaustauschenden Sorptionsmittel besteht. Es handelt sich hierbei um hochmolekulare Polyelektrolyte, die ihre gebundenen Ionen gegen solche gleicher Ladung aus dem umgebenden Medium (*mobile Phase*) austauschen können. Je nachdem, ob eine «Festsäure» oder eine «Festbase» vorliegt, spricht man von einem Kationen- oder Anionenaustauscher. Die wichtigste Eigenschaft eines Ionenaustauschers ist die *Kapazität*, da aus ihr quantitativ zu ersehen ist, wieviel Gegenionen ausgetauscht werden können (Milliequivalent pro Gramm). Die anorganischen Ionenaustauscher sind zumeist Alumo-Silikate, bei denen das Gerüst eine Überschußladung trägt. Auch die üblichen Aluminiumoxide sind bei der Verwendung wäßriger mobiler Phasen Ionenaustauscher, so z.B. ist das «basische Aluminiumoxid» ein Kationenaustauscher. Wichtige organische Ionenaustauscher sind spezielle Kunstharze, z.B. Dowex, Amberlite, Lewatit, ferner die speziell mit Ankergruppen versehenen Cellulosen und die z.T. entsprechenden Sephadex-Ionenaustauscher.

1.2.1 Flüssigkeits-Chromatographie in gepackter Säule

(kurz: Säulen-Chromatographie; im klassischen Sinn bezeichnet)

Bei dem im Teil 2 beschriebenen Isolierungen von Naturstoffen wird die Säulenchromatographie als Trenn- und Reinigungsverfahren häufig angewandt. Obwohl dieses Verfahren schein-

bar einfach ist, bedarf es einer Reihe von Informationen, um zu guten Trennungen zu kommen. Bereits HESSE, ein Altmeister dieser Methode, sagt: «Das gleichmäßige Füllen der Rohre mit der stationären Phase gehört zu den schwierigsten Handfertigkeiten in der Chromatographie.»

Auswahl der Trennsäule

Zumeist werden 20–150 cm lange und 1–5 cm dicke Glasröhren verwendet, die am unteren Ende verjüngt sind und einen Auslaufhahn haben (Abb. 7a). Für Vortrennungen bevorzugt man meist kürzere und dickere Säulen und für Feintrennungen längere und schmalere Rohre. Bei Verwendung tief siedender Elutionsmittel, wie z.B. Pentan, Dichlormethan oder Ether verwendet man sog. «Kühlsäulen», d.h. Glasröhren, die in Art eines Liebigkühlers mit einem Kühlmantel umgeben sind (Abb. 7b).

Die Dimensionen der Trennsäule richten sich nach der Menge des zu trennenden Gemischs und somit direkt nach der notwendigen Menge an Sorptionsmittel.

Es gilt die Faustregel:

1 Teil Gemisch erfordert die 100- bis 500fache Menge stationärer Phase und die 500- bis 5000fache Menge mobiler Phase.

Die Trennsäule ist so auszuwählen, daß der freie Raum über der stationären Phase mindestens 5–10 cm beträgt, um eine optimale Proben- und Elutionsmittelaufgabe zu gewährleisten. Anhand der Schüttdichten kann man sich die notwendige Menge Sorptionsmittel berechnen. Schüttdichte für das übliche Kieselgel zur SC 0,5 g/cm³ und für Aluminiumoxid zur SC 1 g/cm³.

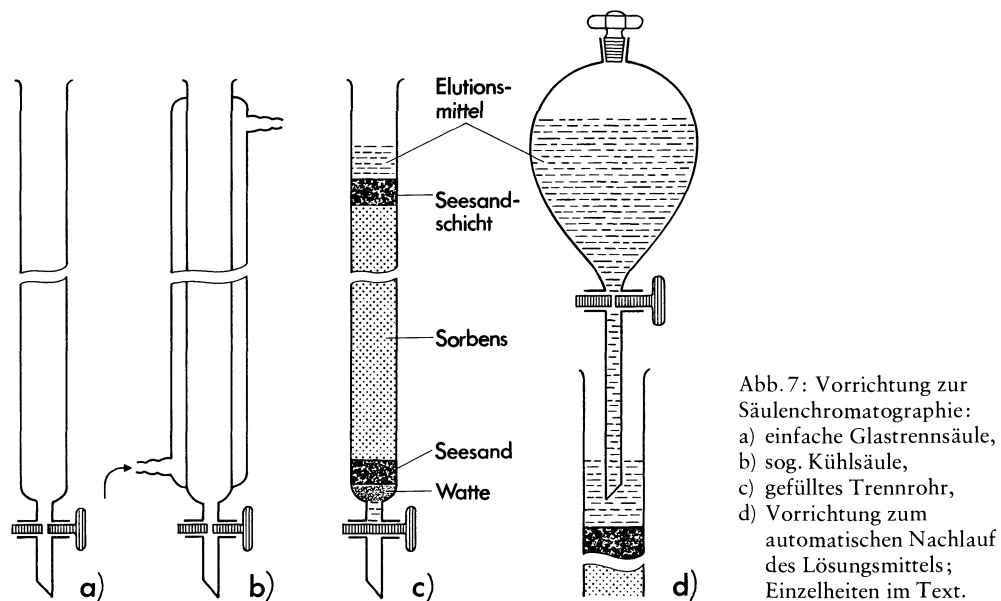


Abb. 7: Vorrichtung zur Säulenchromatographie:
a) einfache Glastrennsäule,
b) sog. Kühlsäule,
c) gefülltes Trennrohr,
d) Vorrichtung zum automatischen Nachlauf des Lösungsmittels; Einzelheiten im Text.

Füllen des Trennrohrs (Abb. 7c)

a) Man füllt bei geschlossenem Hahn das Rohr zu etwa einem Drittel mit dem zunächst zu verwendenden Elutionsmittel und drückt mit einem entsprechenden langen Glasstab einen entsprechend großen Glaswattebausch als porösen Abschluß luftblasenfrei (!) in die untere Verengung der Säule.

b) Auf den Glaswattestopfen gibt man dann eine ca. 1 cm hohe Schicht aus gereinigtem Seesand ($D = 1,5 \text{ g/cm}^3$), die Menge in Gramm errechnet man dann nach ($5 \cdot r^2$ in cm). Man entfernt nun erst den Glasstab und spült mit dem gleichen Elutionsmittel die an der Wand haften- den Seesandteilchen zur Hauptmenge.

c) Bereits einige Zeit vor dem Einfüllvorgang wird die erforderliche Menge Adsorbens in einem Becherglas mit der zweifachen Menge des 1. Elutionsmittels zu einer gießfähigen Suspension verrührt. Zum Abklingen der Wärmetönung läßt man sie mindestens 30 min stehen. Danach gießt man sie in das Trennrohr und öffnet dabei den Hahn. Das sich absetzende Adsorbens muß stets vom Elutionsmittel bedeckt sein; ein sog. «Trockenlaufen» darf nicht eintreten (Luftkanalbildung). Verliert die Suspension im Becherglas ihre Fließfähigkeit, so fügt man weiteres, bereits durchgelaufenes Elutionsmittel zu. Durch schwaches Klopfen, z.B. mit einem Korkring an die Rohrwandung kann man das gleichmäßige Absetzen des Adsorbens beschleunigen.

d) Nachdem sie Säule bis 10 cm unter dem oberen Ende gefüllt ist, und nach mindestens 2 h Absetzen gibt man wiederum eine ca. 1 cm hohe Schicht aus Seesand auf und läßt dann das Elutionsmittel bis ca. 1 mm über die Seesandschicht ab. Nun ist die Säule bereit für die Proben- aufgabe.

Probenaufgabe

Das möglichst konzentriert in einem möglichst wenig polaren Lösungsmittel gelöste zu trennende Gemisch wird vorsichtig, d. h. ohne den Seesand aufzuwirbeln, mit einer Pipette gleichmäßig aufgegeben. Durch langsames Öffnen des Hahnes läßt man es in die Seesandschicht einsickern und gibt vorsichtig 5–10 cm³ Elutionsmittel nach. Ein Trockenlaufen muß unbedingt vermieden werden. Danach wird weiteres Elutionsmittel (zunächst aus dem Durchlauf) bis nahe zum oberen Rand der Säule aufgegeben.

Elutionsvorgang

Die Tropfgeschwindigkeit des Eluats aus der Säule wird mittels des Hahnes auf etwa 1 Tropfen pro Sekunde eingestellt.

Zur Vereinfachung des an sich notwendigen dauernden Nachfüllens von Elutionsmittel hat sich folgendes Verfahren (Abb. 7d) bewährt: Man füllt einen entsprechend dimensionierten Scheidetrichter zu maximal $\frac{3}{4}$ mit dem 1. Elutionsmittel, verschließt ihn mit dem Stopfen und dreht ihn so, daß der Hahn mit dem Luftraum nach oben zeigt. Dann verbindet man das Auslaufrohr mit einem Wasserstrahlvakuum und evakuiert kurz, höchstens jedoch so lange, bis ein Sieden eintritt. Danach schließt man den Hahn. Man setzt nun den Scheidetrichter so auf die Säule, daß der Auslauf 2–3 cm in das Elutionsmittel der Säule eintaucht. Durch *vorsichtiges* Öffnen des Hahnes am Scheidetrichter wird das hydrostatische Gleichgewicht eingestellt. Danach läuft das Elutionsmittel wartungsfrei nach.

Soll nach einiger Zeit ein stärker polares Elutionsmittel verwendet werden, so geht man am zweckmäßigsten stufenweise vor und führt eine sog. Gradientelution durch. Es gibt auch einfache Vorrichtungen zur kontinuierlichen Gradientelution: Man schaltet hierbei 2 Vorratsgefäße mit den jeweiligen Lösungsmitteln kommunizierend hintereinander und sorgt durch einen Magnetrührer für eine gute Durchmischung der zulaufenden stärker polaren Phase.

Auffangen des Eluats

Zum Auffangen des Eluats dient in der Regel ein Fraktionssammler mit mindestens 100 Fraktionierungsmöglichkeiten, d. h. Reagenzgläsern. Man fängt zumeist 10–15-cm³-Fraktionen auf und kann dies je nach Art des Fraktionssammlers nach Zeittakten, nach der Tropfenzahl oder auch über ein Syphonsystem einstellen. Zweckmäßig sind für den Dauerbetrieb möglichst einfach gebaute, robuste, d. h. störungs- und wartungsfreie Geräte.

Nachweis der Trennung im Eluat (Detektion)

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die im Eluat befindlichen Substanzen nachzuweisen. Am elegantesten sind kontinuierliche, optische Verfahren mit sog. Durchlaufzellen und angeschlosssem Schreiber. Hiermit muß man jedoch z. T. erhebliche Einschränkungen in Kauf nehmen. Z.B. sind UV-Detektoren eben nur gut geeignet, wenn UV-absorbierende Substanzen nachzuweisen sind, und wenn das Elutionsmittel keine Eigenabsorption zeigt. Überlagerungen mit nicht UV-absorbierenden Fremdstoffen lassen sich nicht erkennen. Bei den erheblich unempfindlicheren Differentialfraktometern bereitet der Wechsel des Elutionsmittels Schwierigkeiten, da sich hierbei der Brechungsindex ändert.

Eine einfache und kostengünstige Lösung bietet die dünn-schicht-chromatographische Untersuchung der Fraktionen. Sie wird daher zur Kontrolle der Isolierungsschritte von Naturstoffen (Teil 2) bevorzugt angewendet. Man geht hierbei wie folgt vor:

Von jeder oder jeder zweiten oder dritten bzw. n-ten Fraktion trägt man im Abstand von 1 cm jeweils 10 mm³ punktförmig von links nach rechts nebeneinander auf die DC-Schicht auf. Auf den 1. Startpunkt links (Abb. 8, A) bringt man zum Vergleich 10 mm³ 0,5proz. Lösung des Ausgangsgemisches und auf den letzten Startpunkt rechts 5 mm³ einer 0,2proz. Lösung der zu isolierenden Substanz (Abb. 8, V).

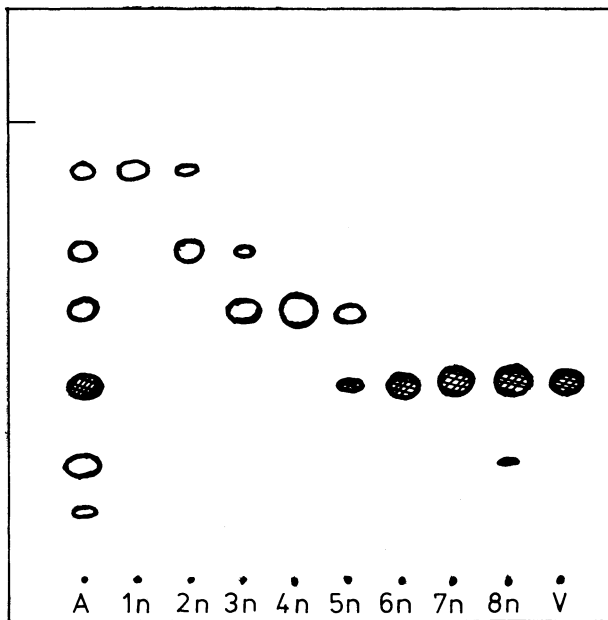


Abb. 8: Schema zur Untersuchung der SC-Fractionen (1n–8n).
A) 10 mm³ der 0,5proz. Lösung des Ausgangsgemisches und V) 5 mm³ der 0,2proz. Lösung der zu isolierenden Substanz.

Nach der Entwicklung und Sichtbarmachung wird anhand des Chromatogramms (Abb. 8) festgestellt, wie die Trennung verlaufen ist, und hierbei wird folgendes beachtet:

- Ist die gesuchte Substanz schon vollständig eluiert, kann eine weitere Elution unterbleiben (Lösungsmittleinsparung!)
- In welchen Fraktionen ist die Substanz rein, d. h. ohne Begleitzonen enthalten?

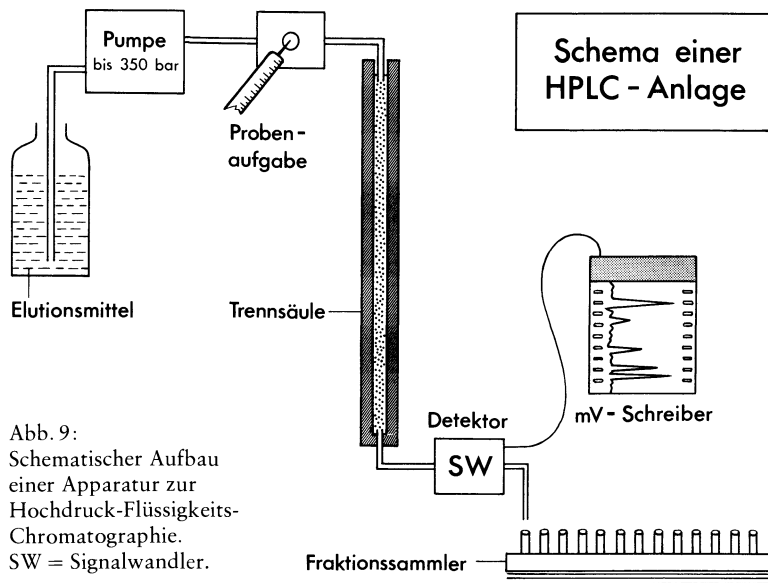
Anmerkung: Bei den Isolierungsvorschriften (Teil 2) ist zunächst nur vorgesehen, daß die anscheinend reinen Fraktionen vereinigt und schonend eingengt werden. Es ist jedoch rationell, auch diejenigen Fraktionen, die nur geringe Begleitzonen neben der gesuchten Substanz enthalten, entsprechend weiterzuverarbeiten. Aus derartigen Sammelfractionen kann die Aus-

beute oftmals nach Umkristallisation erhöht werden. In der Forschung werden derartige Mischfraktionen zumeist einer weiteren Säulenchromatographie unterworfen.

1.2.2 Weitere Chromatographie-Verfahren (HPLC und GC)

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (engl. HPLC)

Die Dünnschicht-Chromatographie zeigte, daß man durch Verwendung sehr viel feinkörnigerer und enger ausgesiebter Sorptionsmittel erheblich bessere Trennungen erhalten kann, als mit den vorstehend beschriebenen Sorptionsmitteln der klassischen Säulenchromatographie. Um nun Trennsäulen mit sehr feinkörnigem Material (z.B. von 5 µm) betreiben zu können, bedarf es eines Überdrucks der mobilen Phase von einigen bis 100 und mehr bar. Dies bringt nun einen erheblichen apparativen Aufwand mit sich, beginnend beim Pumpsystem, der Entgasung der Elutionsmittel, der Probenaufgabe, der druckfesten Säule und der Detektionssysteme usw. Den schematischen Aufbau einer Apparatur zur Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie zeigt Abb. 9.



Bei einer Kosten-Nutzungs-Analyse ergibt sich, daß die HPLC manche Vorteile bringt bei der Verwendung in der Routineanalyse, d. h., wenn es darum geht, eine große Zahl von Proben eines Produktes täglich unter genau gleichen Bedingungen zu analysieren. Die quantitative Bestimmung erfolgt nach Aufstellung einer Eichkurve durch Vergleich der Peakflächen. Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie ist jedoch zu aufwendig, wenn laufend verschiedene Produkte analysiert werden müssen oder wenn nur gelegentlich eine analytische Trennung anfällt.

Weiterführende Literatur

1. ENGELHARDT, H.: Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie; Bd. XIV der Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (2. Auflage 1977).
2. MEYER, V.: Praxis der Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie; in der Reihe Lehrbücher Chemie, Diesterweg, Otto Selle Verlag, Frankfurt-Berlin-München (3. Aufl. 1985).

Gaschromatographie (GC)

Bei der Gaschromatographie dient als *mobile Phase* ein Gas, zumeist Helium unter einem Druck zwischen 1 und 5 bar. Eine Voraussetzung für die Anwendung der GC ist die Flüchtigkeit resp. leichte Verdampfbarkeit der zu trennenden Substanzen des Gemischs. Gerade unter diesem Gesichtspunkt ist die Trennsäule in der Regel in einen genau thermostatisierbaren Ofen eingebaut. Dieser Ofen läßt sich bei modernen «Gaschromatographen» programmierbar aufheizen (= Chromatographie im Temperaturgradient).

Die Probenaufgabe erfolgt wie bei der HPCL unter Druck mit einer entsprechenden Mikroliter-spritze durch eine flexible Membran in den sog. Einspritzblock. Bei den Säulen, die zumeist noch aus Edelstahl, besser aus Glas, bestehen, unterscheidet man zwischen sog. gepackten Säulen (\varnothing 2–6 mm, Länge 0,5–4 m) und den spiralig aufgewickelten Kapillarsäulen (i. \varnothing 0,5–1 mm und Länge 25–100 m). Letztere sind auf ihrer Innenwandung mit einem dünnen Film der stationären Phase belegt. Bei den «gepackten» Säulen ist das poröse Trägermaterial, z.B. Kieselsgur, mit einer zumeist flüssigen stationären Phase imprägniert. Es gibt inzwischen eine große Zahl stationärer Phasen und fertig imprägnierter Säulenfüllmaterialien, die in der Regel unter speziellen Markenbezeichnungen gehandelt werden, auch bereits fertig gepackte Säulen sind handelsüblich.

In den meisten Fällen der Anwendung handelt es sich um ein Verteilungsverfahren (engl.: Gas-, Liquid-Chromatography, GLC), seltener um eine Adsorptions-Chromatographie (engl.: Gas-Solid-Chromatography, GSC). Den schematischen Aufbau eines einfachen «Gas-Chromatographen» zeigt die Abb. 10.

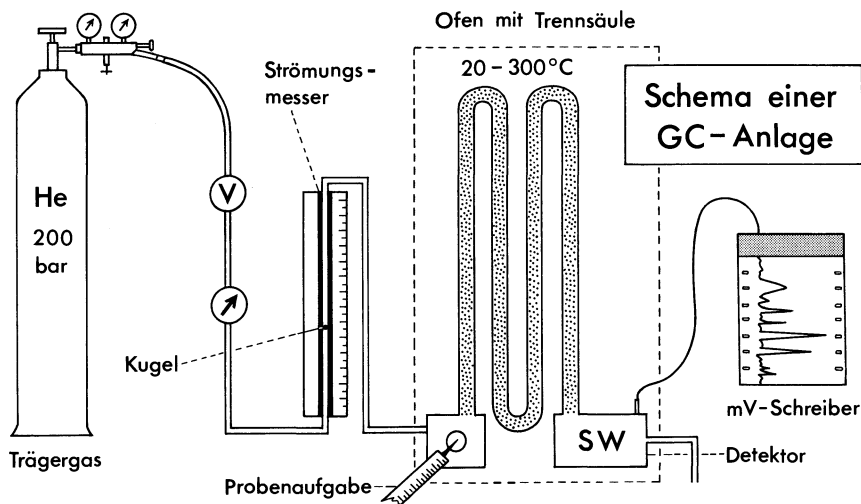


Abb. 10: Schematischer Aufbau einer Apparatur zur Gaschromatographie.
V = Feinreguliertventil und SW = Signalwandler.

Zum Nachweis der getrennten Substanzen am Ende der Säule dient ein Detektor (Signalwandler), der mit einem elektrischen Schreiber verbunden ist. Am meisten verwendet wird der hochempfindliche Flammenionisations-Detektor (FID), daneben aber auch der weniger aufwendige und unempfindliche Thermistor-Detektor (TD) oder der Wärmeleitfähigkeits-Detektor (WLD). Daneben gibt es eine Reihe weiterer, spezieller Detektoren, z.B. für N-, P- und halogenhaltige Verbindungen.

Weiterführende Literatur

SCHOMBURG, G.: Gaschromatographie; Taschentext 48. Verlag Chemie, Weinheim (1977).

BAYER, E.: Gaschromatographie, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-Göttingen (1962).

1.2.3 Dünnschicht-Chromatographie

Von den verschiedenen Arten der Chromatographie empfiehlt sich für die analytische Untersuchung der Naturstoffgemische vor allem die Dünnschicht-Chromatographie (Abkürzung: DC). Diese Methode erfordert einen geringen Aufwand an Geräten, wenig Zeit für die Durchführung der Analyse (15–60 min) und nur kleinste Mengen an Untersuchungsmaterial (ca. 0,1 g). Weiterhin ist die Störanfälligkeit durch Begleitstoffe gering, der Platzbedarf minimal und die Handhabung des Verfahrens einfach.

Definition und Prinzip der DC

Die Dünnschicht-Chromatographie (DC) ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren. Die dünne, aus feinkörnigem Material bestehende Trennschicht (stationäre Phase) befindet sich auf einer Trägerplatte aus Glas, Metall oder einer geeigneten Folie. Das zu trennende und in Lösung befindliche Gemisch wird punkt- oder bandförmig aufgetragen (Start). Nach dem Einstellen der Platte oder Folie in eine dichtschießende Kammer, die ein geeignetes Fließmittel (mobile Phase) enthält, erfolgt beim kapillaren Ausbreiten (Entwicklung) die Auftrennung (Abb. 11). Farblose Substanzen müssen anschließend sichtbar gemacht werden (Nachweis oder Detektion).

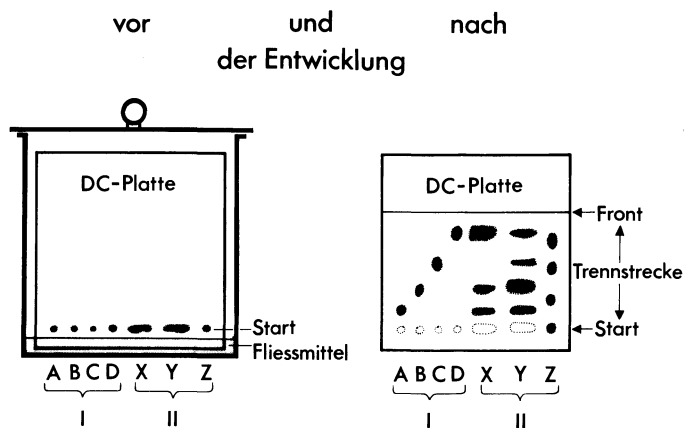


Abb. 11: Links: Kammer mit DC-Platte vor der Entwicklung. Rechts daneben fertiges Chromatogramm nach Sichtbarmachung der Substanzen.

I = Vergleichslösungen,
II = Untersuchungslösungen.

Bei einem unbekannten Gemisch müssen die Trennschicht (Art des Sorptionsmittels) und das Fließmittel aufeinander abgestimmt werden. Desweiteren ist es wichtig, die optimale Arbeitstechnik wie z.B. die Art der Entwicklung, Kammer-Atmosphäre usw. zu wählen. Den engen Zusammenhang zwischen den genannten Faktoren verdeutlicht die Abb. 6. Um nun vergleichbare Resultate bei der DC zu erhalten, ist es erforderlich, eine Reihe von Bedingungen einzuhalten. Diese sogenannten «Standardbedingungen» sind im folgenden zusammengestellt und durch eine Reihe von Hinweisen ergänzt.

STANDARDBEDINGUNGEN

A. Stationäre Phase (Schicht)

Die Schicht wird jeweils aus einem der von verschiedenen Firmen speziell für die DC hergestellten Sorptionsmittel bereitet; es ist bei Angaben zur DC erforderlich, neben der allgemeinen Bezeichnung des Sorptionsmittels auch den Typ und die Herstellerfirma zu nennen. Die trockene Schicht hat, im Auf- und Durchlicht betrachtet, ein gleichmäßiges Aussehen und haftet gut auf der Unterlage. Sie ist 200 mm lang und 200 oder 100 mm breit. Die Dicke der trockenen Schicht beträgt für analytische Trennungen 0,1–0,3 mm, zumeist um 0,2 mm. Bis zum Gebrauch werden die Schichten vor Labordämpfen und Feuchtigkeit geschützt aufbewahrt.

Häufig gebrauchte Sorptionsmittel sind Kieselgele (Silicagel), Aluminiumoxide, Kieselgure, Cellulose und deren Derivate, Polyamid usw. Darunter hat das Kieselgel zweifellos den größten Anwendungsbereich.

An die Sorptionsmittel für die DC muß man eine Reihe von Forderungen stellen, die z. T. nicht leicht zu erfüllen sind. Am wichtigsten ist die Korngröße, die zum Teil noch in dem viel zu weiten Bereich zwischen 5 und 40 µm liegt. Es gibt jedoch auch enger ausgesiebte und somit erheblich besser und schärfer trennende Kieselgele, bei denen die mittlere Korngröße relativ eng um 15 µm liegt. Es besteht der Wunsch, daß auch die für die fabrikationsmäßige Herstellung sog. HPTLC-Platten verwendeten Sorptionsmittel handelsüblich werden. – Derzeit werden die Kieselgele für die DC und SC gerne nach den in Tab. 2 von MERCK aufgeführten Kennzahlen charakterisiert. Vorzugsweise verwendet man ein mittelporiges Kieselgel mit einem mittleren Porendurchmesser von 60 Å (= 6 nm).

Tab. 2: Kennzahlen verschiedener Kieselgele «Merck»

Kennzeichnung durch	Kieselgel 40	Kieselgel 60	Kieselgel 100
Porenvolumen cm ³ /g	0,65	0,75	1,00
Spezifische Oberfläche m ² /g	650	500	400
Porendurchmesser Å (= 0,1 nm)	40	60	100
pH einer 10proz. wäßrigen Suspension	5,5	7,0	7,5

Ein recht anschauliches Bild von Trennverhalten der Kieselgele und anderer Sorptionsmittel erhält man durch die Chromatographie möglichst komplex zusammengesetzter Farbstoffgemische.

Schichten ohne Bindemittel sind relativ schwer zu handhaben, man setzt daher einen sog. Binder zu. Im einfachsten Fall ist dies ca. 10–15 % (Ph. Eur. 13 %) Gips (Abkürzung: G). Es gibt auch gipsfreie, haftende Sorptionsmittel, sie tragen die Zusatzbezeichnung H. Der Zusatz F₂₅₄ besagt, daß ein Fluoreszenzindikator (ca. 1,5 %) zugefügt ist, der mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) anzuregen ist (s. Nachweis S. 23). Wünscht man sog. abriebfeste Schichten, so setzt man eine geeignete organische Kunststoffdispersion zu, z. B. mit einem Acrylharz o. ä. (z. B. Acronal 250D der Fa. BASF).

Herstellung von DC-Schichten

Zur Herstellung von DC-Schichten werden, je nach Problem, verschiedenartige Sorptionsmittel verwendet. Es wird auf das «Aussehen der Schicht», auf ihre «Haftfestigkeit» und das «Trennvermögen» geprüft.

Im einzelnen werden folgende Sorptionsmittel zur DC häufig verwendet.

Kieselgel G
 Kieselgel GF₂₅₄
 Kieselgel H
 Kieselgel HF₂₅₄
 Kieselgel HF₂₅₄, silaniertes

Kieselgur G
 Kieselgur H
 Cellulose z. Chromatogr.
 Kieselgel z. Chromatogr. F₂₅₄

Schichten aus Kieselgel G, GF₂₅₄, H, HF₂₅₄ und Kieselgur G oder H:

Zur Herstellung von fünf 0,3 mm dünnen 20 × 20 cm Schichten werden zumeist 30,0 g Sorptionsmittel verwendet und hiermit eine wäßrige, luftblasen- und klumpchenfreie, gut streichfähige Suspension bereitet. Die notwendige Wassermenge ist von Produkt zu Produkt etwas verschieden und liegt zumeist zwischen 60 und 85 cm³. Man kann die Suspension entweder in üblicher Art in einer Reibschale anreiben oder auch in einem Weithals-Erlenmeyerkolben mit Schliff anschlütteln.

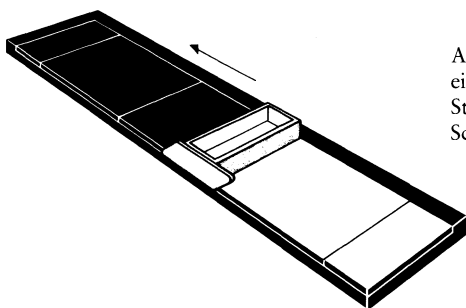


Abb. 12: Beschichten einer Reihe von Glasplatten mit einer Sorptionsmittelsuspension, die in ein entsprechendes Streichgerät eingefüllt ist. Die Glasplatten liegen auf einer Schablone.

Die als Träger dienenden 5 Glasplatten sollen sorgfältig gereinigt und frei von Fingerabdrücken sein. Die Einstellschichtdicke am Streichgerät beträgt 0,3 mm; beim Trocknen der Schicht tritt eine Schrumpfung auf ca. 0,25 mm ein. Das Ausstreichen soll gleichmäßig in einem Zug erfolgen, und zwar von der 5-cm-Startplatte zur 5-cm-Endplatte.

Zum *Trocknen* kann man die beschichteten Platten über Nacht (d.h. 8–12 Stunden) in einem trockenen Raum belassen und sie danach «lufttrocken» verwendet. Zumeist werden die nassen Schichten nach einer 15 min Vortrocknung mit einem Ventilator 30 min bei 100 °C im Trockenschrank in senkrechter Stellung in einem Trockengestell (Abb. 13) «aktiviert». Man bewahrt die trockenen Platten vor Feuchtigkeit und Labordämpfen geschützt, z.B. in einem Exsikkator über Blaugel, auf.

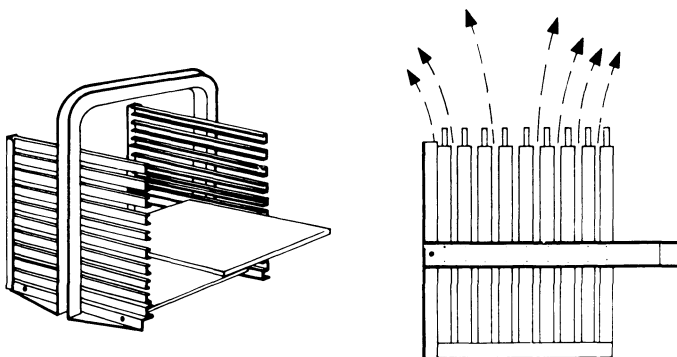


Abb. 13:
 Trockengestell n. STAHL
 für beschichtete DC-Platten.
 Die Schlußtrocknung erfolgt
 in senkrechter Stellung,
 damit die feuchte Luft
 abziehen kann.

Imprägnierung der Schicht

Zur Herstellung saurer, basischer oder gepufferter Schichten verwendet man anstelle von Wasser die entsprechende wäßrige Lösung einer Säure, Base oder eines Salzgemisches und verfährt sonst wie beschrieben. Zur lipophilen Imprägnierung wie dies z. B. zur Trennung der fetten Öle notwendig ist, geht man von einer fertigen trockenen Kieselgur-G-Platte (45 min bei 110° getrocknet) aus.

Die trockene Kieselgurplatte wird zum Imprägnieren in eine DC-Kammer gestellt, die anstelle des Fließmittels eine Mischung aus 5 cm³ Paraffinum subliquidum und 95 cm³ Benzin Kp. 40–60° enthält. Man läßt diese Imprägnierungslösung 15 cm hochsteigen. Danach beläßt man Platte 5–10 min an der Luft, und nun können die Untersuchungslösungen wie üblich aufgetragen werden.

Schichten aus Kieselgel HF₂₅₄, silanisiertes

30,0 g Substanz werden 2 min mit 60 cm³ einer Mischung von 2 Volumenteilen Wasser und 1 Volumenanteil Methanol kräftig geschüttelt. Danach wird ausgestrichen (0,25 mm dick) und 30 min im Trockenschrank bei 100–105° getrocknet (Abzug!). Im Hinblick auf die toxischen Methanoldämpfe ist es zweckmäßig, Ethanol zu verwenden.

Schichten aus Cellulose zur Chromatographie

Handelsüblich ist die native, faserförmige Cellulose in gepulverter Form und die «mikrokristalline» Cellulose (Avicel).

In der Regel erhält man auf den Schichten aus «mikrokristalliner» Cellulose die besseren Trennungen. Zur Herstellung der streichfähigen Suspension muß die Homogenisierungszeit genau eingehalten werden.

15 g Substanz werden in 100 cm³ Wasser suspendiert und 60 s (!) mit einem elektrisch betriebenen Gerät homogenisiert. Die sorgfältig gereinigten Platten werden mit einem Streichgerät mit einer 0,25 mm dicken Schicht versehen und an der Luft getrocknet.

Beim Trocknen tritt eine Schrumpfung auf etwa die Hälfte der Ausstreichschichtdicke ein.

Industriell vorgefertigte Schichten (sog. Fertigplatten und Folien)

Von den zumeist gebrauchten Sorptionsmitteln sind industriell vorgefertigte Schichten im Handel. Man erspart sich hierdurch die vorstehend beschriebene Herstellung. Durch die Notwendigkeit, die Schicht transportfest zu machen, müssen zumeist spezielle Bindemittel zugesetzt werden; hierdurch sind Abweichungen im Trenneffekt zu erklären. Sind die Laufzeiten zu lang, so werden die Zonen diffuser und die Trennungen schlechter. Für den Routinebetrieb und für die praktischen Übungen in der Ausbildung sind derartige Fertigplatten ohne Zweifel vorteilhaft.

Beachtenswert sind im Hinblick auf eine schmale Startzone die handelsüblichen DC-Fertigplatten mit «Konzentrierungszone». Diese bestehen aus zwei aneinander angrenzenden Schichten. Im Startbereich liegt eine ca. 2–2,5 cm breite (hohe) inaktive Schicht, auf die man die Substanzen wie üblich aufträgt. Daran schließt sich nahtlos die übliche aktive Kieselgel-Trennschicht an. Bei der Entwicklung wandert nun der Substanzfleck schnell durch die inaktive Zone und gelangt als schmaler Startstrich in die aktive Trennzone; dies verbessert die Trennschärfe (s. strichförmiges Auftragen S. 22). Am Rande sei erwähnt, daß die handelsüblichen 20 × 20 cm Fertigplatten aus Kostengründen gerne gevierteilt werden. Man verwendet entsprechend kleine Kammern zur Entwicklung und spart so Lösungsmittel.

B. Mobile Phase (Fließmittel)

Die mobile Phase ist das Transportmedium und besteht aus einem oder mehreren Lösungsmitteln. Sie wandert aufgrund der Kapillarkräfte in der stationären Phase, d.h. der porösen Schicht. – Als Fließmittel verwende man nur analysenreine Lösungsmittel und, wenn nötig, möglichst einfache Gemische mit maximal 3 Komponenten. Das Mischungsverhältnis wird in Volumenteilen angegeben, und zwar so, daß die Summe der Einzelvolumina 100 beträgt, z.B. Toluol-Chloroform-Essigsäure 96proz. (50 + 40 + 10). Bei der Adsorptionschromatographie lassen sich die Lösungsmittel nach ihrer eluierenden Wirkung zur sog. «Eluotropen Reihe» ordnen. Wie die Tab. 1 zeigt, nimmt die Elutionswirkung mit der Polarität des Lösungsmittels zu. So hat z.B. das nicht polare Hexan eine schwach eluierende Wirkung, das Chloroform eine mittelstarke und das polare Methanol eine stark eluierende Wirkung. Einen Anhaltspunkt für die Polarität einer Verbindung gibt die Dielektrizitätskonstante (= DK-Wert ϵ). Die Wanderungsgeschwindigkeit ist von der Viskosität des Lösungsmittels und natürlich auch von der Struktur der Schicht abhängig (z.B. Korngrößenbereich des Sorptionsmittels).

C. Kammer, Sättigung, Füllhöhe

Die Kammer soll geeignet sein, die 20 × 20 cm bzw. die 10 × 10 cm großen, beschichteten Trägerplatten aufzunehmen und dicht schließen. Die Füllhöhe für die mobile Phase beträgt 5–8 mm; das entspricht der Eintauchtiefe der Schicht. Zur Chromatographie bei «Kammersättigung» wird ein Streifen aus reinem Filterpapier u-förmig an die Innenwände der Kammer angelegt und mit der mobilen Phase befeuchtet.

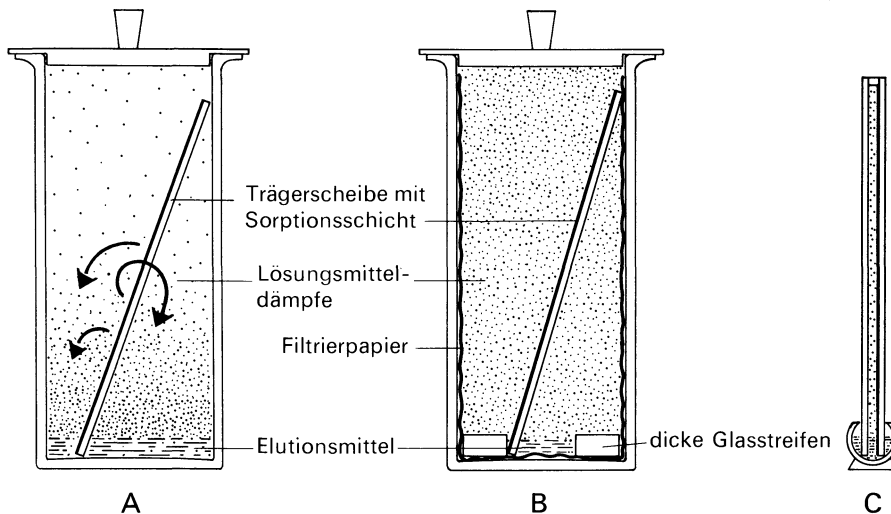


Abb. 14: Trennkammern und Sättigung,

- A) Kammer mit normaler Sättigung (= NS). Die Pfeile sollen das Abdampfen der Fließmittel von der Schicht und die Punktierung die Dampfdichte symbolisieren.
- B) Kammer mit Filterpapier-Auskleidung, mit dem Fließmittel gesättigt (= KS).
- C) S-Kammer mit dem verringerten Kammer-Volumen.

Der Sättigungszustand der Kammer mit den Dämpfen des Fließmittels hat einen erheblichen Einfluß auf die Trennung und die Lage der Substanzen auf dem Chromatogramm. Steigt das Fließmittel in der Schicht hoch, so dampft ein Teil im Bereich der Lösungsmittelfront ab. Bei

gleicher Laufstrecke ist demzufolge in einer Kammer ohne Filterpapiereinlage (= Normal-sättigung; Abkürzung = NS) der Fließmitteldurchlauf größer und die Substanzen liegen höher als in einer völlig mit Lösungsmitteldämpfen gesättigten Kammer (Kammersättigung = KS). Die Abb. 14 zeigt diese Unterschiede und rechts daneben eine sog. S-Kammer.

D. Start und Auftragsmenge

Die Startpunkte bzw. -bänder haben vom unteren Rand der Schicht einen Abstand von 15 mm. Der Abstand der max. 3 mm großen Startpunkte voneinander und von den seitlichen Rändern der Schicht beträgt mindestens 10 mm. Die Schicht soll beim Auftragen nicht verletzt werden. Von den 0,1- bis 1prozentigen Lösungen der Proben werden üblicherweise 1 bis 10 mm³ aufgetragen. Zum Auftragen verwendet man vorteilhaft spezielle Mikropipetten mit spitzem Konus, 1-mm³-Graduierung und einem Volumen von 10 mm³*. Das Auftragen schwerflüchtiger Lösungen oder größerer Mengen erfolgt portionsweise; man wartet dabei jeweils, bis das Lösungsmittel verdunstet ist.

Vorteilhaft sind auch die geeichten, selbstaufsaugenden Mikropapillaren mit Fassungsvermögen von 1 mm³; sie sind an sich nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Man kann hiermit gut kleine Startpunkte und Striche auftragen.

Beachte: Die häufig bevorzugte strichförmige Auftragung der Untersuchungslösung auf eine Länge von 20 mm ergibt zumeist bessere Trennungen als eine punktförmige Auftragung. Allerdings ist sehr darauf zu achten, daß der Startstrich möglichst dünn (max. 3 mm) ist. Man verwendet daher leichtflüchtige Lösungsmittel und punkte hierzu die Auftragslösung mit einer feinen Kapillarpipette nebeneinander auf, ohne die Schicht zu verletzen. Es gibt auch eine 10-mm³-Mikrobreitbandpipette (Mikroapplikator II), die das bandförmige Auftragen in einem Zuge möglich macht.

Eine gute Hilfe für das Auftragen und das spätere Auswerten ist die «Mehrzweckschablone» (Abb. 15). Sie wird brückenartig über die DC-Platte gelegt. Zum Auftragen soll die dicke Querlinie A mit der Unterkante der DC-Platte abschließen. Die rechte Hand mit der Auftragspipette ruht auf der Schablone, und man kann nun die einzelnen Proben in gleichen Abständen von 1,5 cm von der Unterkante der DC-Platte entfernt auftragen. Schiebt man die Schablone danach bis zur Linie B (Abb. 15, rechts) hoch, so kann man die spätere «Frontlinie» durch einige Einstiche markieren und außerdem auf dem freibleibenden oberen Teil eine Beschriftung anbringen. Hierzu kann ein spitzer Bleistift oder eine Präpariernadel dienen.

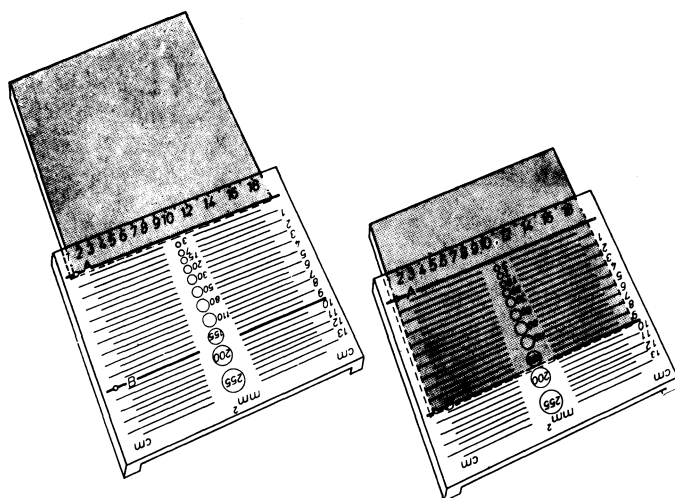


Abb. 15:
Mehrzweckschablone n. STAHL;
links: Auftragsstellung,
Linie A schließt mit dem unteren
Plattenrand ab.
Rechts:
Markierung der 10-cm-Lauf-
strecke,
Linie B schließt mit dem unteren
Plattenrand ab.

* 1 cm³ (= 1 ml) = 1000 mm³ (= 1000 µl).

E. Entwicklung

Den Vorgang des Auftrennens des Untersuchungsgemisches durch das Hochwandern des Fließmittels in der Schicht bezeichnet man als «Entwickeln». Die normale Trennstrecke, d.h. die Entfernung Start-Front, beträgt 100 mm (s. Abb. 11). Neben der *Einfachentwicklung*, d.h. also 1 × 10 cm hoch, verwendet man zur Verbesserung des Trenneffektes auch die *Mehrfachentwicklung*, z.B. die *Zweifachentwicklung*, d.h. 2 × 10 cm nacheinander. Dazwischen muß die DC-Schicht trocknen; diese Zwischentrocknung erfolgt durch 5–10 min Liegenlassen der Platte an der Luft.

Bei der *Stufenentwicklung* entwickelt man mit zwei verschieden stark eluierenden Fließmitteln unterschiedlich hoch, z.B. 1. Stufe 5 cm hoch mit einem stark polaren Fließmittel, um z.B. polare Glykoside zu trennen, und in der 2. Stufe entwickelt man 10 cm hoch mit einem schwächer polaren Fließmittel, um die Aglyka dieser Glykoside aufzutrennen.

F. Vergleichslösung (Test- oder Standardgemisch)

Neben der oder den Untersuchungslösung(en) wird immer ein sog. Vergleichsgemisch mitchromatographiert. Es besteht aus 1–5 definierten Substanzen in bekannter Konzentration. Diese Vergleichssubstanzen sollen möglichst Verbindungen sein, die in der Untersuchungslösung enthalten sind. Es können aber auch andere Substanzen sein, die bei den betreffenden chromatographischen Bedingungen ähnliche Wanderungseigenschaften wie die nachzuweisenden Substanzen haben. Wählt man die Mengenverhältnisse der Substanzen in der Vergleichslösung entsprechend der Zusammensetzung einer «normalen» Droge, so erhält man durch den Vergleich der Fleckengröße eine wertvolle zusätzliche Information.

Zur Herstellung von Vergleichs- und Untersuchungslösungen soll möglichst das gleiche Lösungsmittel verwendet werden.

In jedem Fall ist es vorteilhaft, zusätzlich ein entsprechendes Farbstoffgemisch mitzuchromatographieren. Bei lipophilen Fließmitteln ist z.B. ein Gemisch aus Buttergelb, Sudanrot und Indophenol (0,05proz. in Toluol) vorteilhaft und bei hydrophilen Fließmitteln ein Gemisch aus Fluorescein, Methylrot, Methylenblau und Malachitgrün. Diese Testgemische erlauben bei einer Auftragung von 2 mm³ eine sofortige visuelle Kontrolle, ob die Trennbedingungen erfüllt sind.

G. Untersuchungslösung (Herstellung ausgehend von der Droge)

Die Herstellung der Untersuchungslösung soll möglichst schnell und unkompliziert durchführbar sein und nicht länger dauern als die Chromatographie. Die Mengenverhältnisse der interessierenden Drogeninhaltsstoffe sollen in Droge und Untersuchungslösung gleich sein. Die Einwäge an gepulverter Droge soll klein sein und zwischen 0,1 und 1,0 g liegen. Wenn möglich, begnüge man sich mit einer einfachen Mazeration und verwende hierzu möglichst wenig Lösungsmittel (0,5 bis 5 cm³). Diese Extraktion kann dann in einem kleinen Reagenzglas ausgeführt werden. In manchen Fällen lassen sich die festen Bestandteile abzentrifugieren, in anderen Fällen filtriert man durch einen kleinen Trichter mit Filterpapier oder Watteeinlage in ein anderes Reagenzglas. Gelegentlich ist ein schonendes Einengen zur Trockne erforderlich. Anschließend wird dann in wenig Lösungsmittel, z.B. 0,1 cm³ aufgenommen. Wenn in seltenen Fällen zu viele Ballaststoffe die Chromatographie stören, muß man eine Zwischenreinigung durchführen. Sind die interessierenden Stoffe der Droge sublimierbar oder destillierbar, so ist das TAS-Verfahren das Mittel der Wahl zur schnellen Abtrennung und Auftragung.

H. Nachweis der getrennten Substanzen

Zur Erkennung farbloser Substanzen auf dem Chromatogramm gibt es verschiedene Möglichkeiten. Am einfachsten gelingt der Nachweis, wenn die Verbindungen eine Eigenabsorption im

kurzwelligem UV-Bereich (Schwerpunkt der Strahlung um 254 nm) haben oder wenn sie durch kurz- und/oder langwelliges UV-Licht (langw. = 365 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden können. Ist beides nicht der Fall, so muß eine Sichtbarmachung aufgrund einer chemischen Reaktion versucht werden (s. Reagenzienverzeichnis S.170), zunächst ohne und ggf. mit Erhitzen. In manchen Fällen ist ein biologischer Nachweis möglich.

Beachte: Verbindungen mit zwei und mehr Doppelbindungen sowie die aromatischen Verbindungen, z.B. Benzolderivate, haben eine mehr oder weniger starke Absorption im Bereich von 230–300 nm. Um sie nun auf der Trennschicht erkennen zu können, setzt man ihr einen sog. Fluoreszenzindikator (= F₂₅₄) zu, der im kurzwelligen UV-Bereich (um 254 nm) intensiv fluoresziert, z.B. ein Zinkcadmiumsulfid. Auf einer solchen «Fluoreszenzschicht» erkennt man nun die obengenannten Substanzen an einer Fluoreszenzminderung resp. Löschung, d.h. auf einer z.B. grüngelb-fluoreszierenden Schicht treten sie als «dunkle» Flecken hervor.

UV-Lampen zur Fluoreszenzanregung

a) Für den langwelligen Bereich um 365 nm ist die Verwendung eines Quecksilber-Hochdruckstrahlers mit Schwarzglaskolben und Vorschaltgerät (Philips, Osram) zu empfehlen. Er liefert eine erheblich höhere Strahlungsintensität als eine Schwarzglas-Leuchtstoffröhre.

Beachte: Der Hochdruckbrenner benötigt bis zur vollen Leistung 2–5 min Einbrennzeit, er wird relativ heiß und zündet nach dem Abschalten erst im abgekühlten Zustand. Schutzbrille tragen, da Explosionsgefahr.

b) Zur Fluoreszenzanregung im kurzwelligen UV-Bereich werden zumeist Quecksilber-Niederdruckleuchten aus Spezialglas mit scheibenförmigem Schwarzglasfilter, z.B. UG 5 Schott & Gen., verwendet. Recht vorteilhaft ist die kleine Sylvania «Germicidal»-Röhre mit dem genannten Vorschaltfilter.

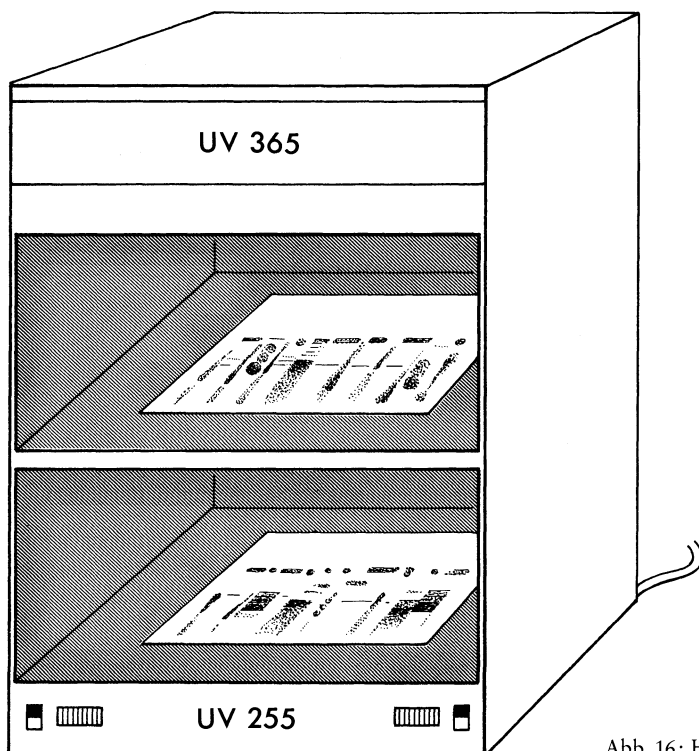


Abb. 16: HP-UVIS (DESAGA, Heidelberg)

Beachte: Die für den kurzwelligen Bereich verwendbaren Filter altern relativ schnell; d. h. daß sich die Strahlungsdurchlässigkeit bei häufigem Gebrauch erheblich vermindert.

c) Eine kleine Dunkecke oder ein mit schwarzen Gardinen abgetrennter kleiner Raum ist zum Betrachten vorteilhaft. Ein guter Behelf ist auch ein innen schwarz-getünchter Wellpappkarton (Größe ca. $30 \times 35 \times 45$ cm), in dem die entsprechende UV-Lampe steht. Er wird so aufgestellt, daß die Öffnungsklappen nach vorne zeigen und nicht, wie üblich, nach oben.

d) Unter der Bezeichnung HP-UVIS (DESAGA, Heidelberg) ist ein für das Laboratorium sehr geeignetes Kompaktgerät im Handel, das sowohl einen Hochdruck-UV-Brenner (UV 365 nm) enthält als auch kurzwellige UV-Leuchtstoffröhren (UV 254) und einen speziellen Dunkelraum überflüssig macht.

Sichtbarmachung durch Aufsprühen von Reagentien

Wichtig ist, daß das Reagenz in sehr fein verteilter Form – als «Nebel» und nicht als «Regen» – auf die DC-Schicht gelangt. Mit sog. «Mundsprühern» ist dies zumeist nicht möglich. Man betreibt die «Ganzglassprüher» (Abb. 17) mit Druckluft (Druckluftleitung, kleiner Kompressor oder N_2 -Bombe mit Reduzierventil).

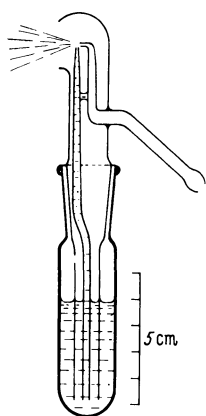


Abb. 17: Glas-Sprüher für Druckluft.

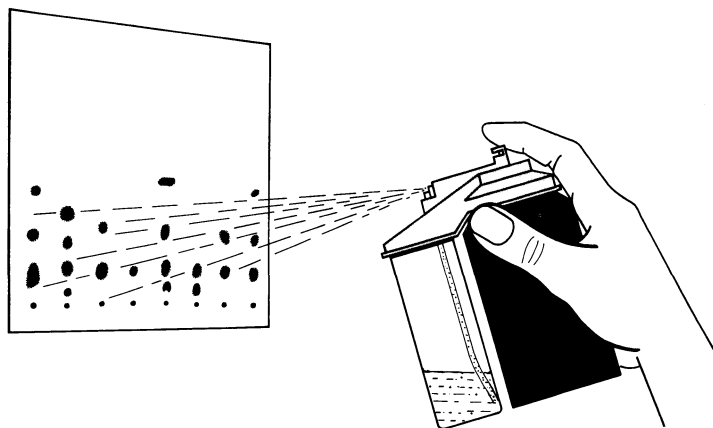


Abb. 18: Spray-Gun in Funktion mit davorgehaltener DC-Platte. Aerosol-Druckbehälter schwarz, Reagenz-Lösung in abschraubbarem Gefäß links.

Vorteilhafter, weniger aufwendig und daher zu empfehlen sind die handlichen dreiteiligen Sprüher vom Typ «Spray-Gun» (Abb. 18). Sowohl die Treibgasdose als auch der Glasbehälter für das Reagenz sind leicht auswechselbar. Anstelle des letzteren kann man ein entsprechendes Reagenzglas verwenden, in dem sich die 10-cm^3 Reagenz befinden, und man kann dieses direkt durch Einführen des Schlauches und Knopfdruck aufsprühen.

Den ersten Sprühstrahl richte man neben die DC-Platte und kontrolliere hierbei, daß ein gleichmäßig feiner Aerosol-Strahl austritt. Erst dann richtet man den Sprühstrahl auf die DC-Platte und führt ihn gleichmäßig über die Schicht (Abb. 18).

Sprühkabine: Insbesondere beim Sprühen mit aggressiven Reagenzien ist ein gutziehender Abzug erforderlich. Ist er nicht vorhanden, so kann man sich mit einem «Kleinabzug» nach Abb. 19 aus säurefestem Kunststoff (Trovidur o. ä.) gut behelfen. In das Entlüftungsrohr baut man einen säurebeständigen Ventilator ein. Dieser Abzug kann, wenn nötig, auf einem fahrbaren Tisch

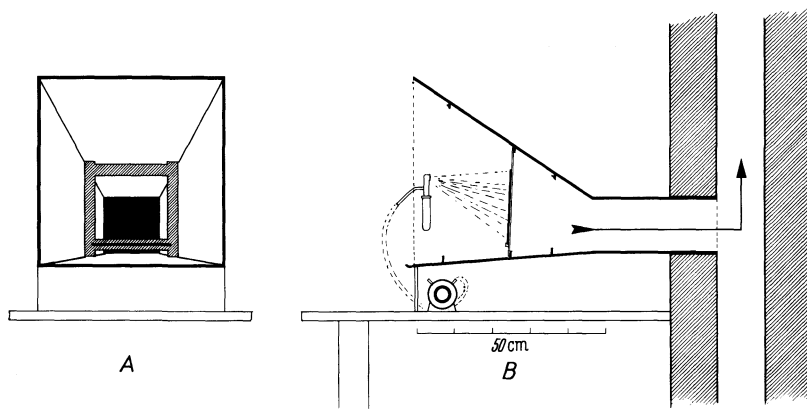


Abb. 19: Sprühkabine aus Trovidur, die an einen Abzugskamin angeschlossen ist.
A) Vorderansicht; der Halterahmen zum Einstellen der Chromatogramme ist schraffiert gezeichnet.
B) Seitenansicht.

direkt vor einer Fensteröffnung installiert werden. Sind alle diese Möglichkeiten nicht gegeben, nimmt man das Aufsprühen im Freien vor.

Erhitzen: Zur optimalen Farbausbildung sind in der Regel eine bestimmte Erhitzungstemperatur und -dauer notwendig. Oftmals wird auch vorgeschrieben, daß dieser Vorgang «unter Beobachtung» zu erfolgen hat. Aus verschiedenen Gründen sind Trockenschränke ein Notbehelf; man kann die Farbausbildung und den Farbwechsel nicht beobachten und, da oft flüchtige Bestandteile des Reagenz, z.B. Anisaldehyd, Säuren etc. in den Trockenschrank gelangen, ist dieser für andere Zwecke, z.B. Trocknen der DC-Schichten unbrauchbar. Zweckmäßig sind die speziell für die DC entwickelten Heizplatten mit genauer Temperatureinstellung und Kontrolle (Abb. 20) sowie einer konstanten Temperaturverteilung über die ganze Schichtfläche.

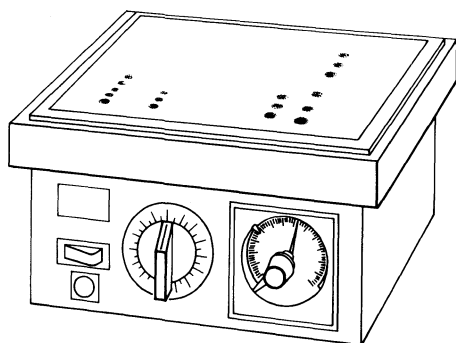


Abb. 20: HP-Thermoplatte zum kontrollierten Erhitzen von 20 x 20 cm DC-Platten. Rechts Temperatureinstellung und -kontrolle, links Zeitschaltuhr. Temperaturbereich 50–150 °C.

I. Auswertung und Dokumentation der Chromatogramme

R_f-Werte in der DC

Die Wanderungsweite der Substanzen auf dem Chromatogramm wird zumeist in R_f- bzw. hR_f-Werten angegeben.

$$R_f = \frac{\text{Entfernung des Fleckmittelpunktes vom Startpunkt}}{\text{Entfernung der Fließmittelfront vom Startpunkt}}$$

Die R_f -Werte liegen zwischen 0,00 und 1,00 und sind nur zwei Stellen nach dem Komma bestimmbar. Bei den hR_f -Werten multipliziert man den R_f -Wert mit dem Faktor 100 (= h) und bekommt so die Zahlen von 0 bis 100. Wählt man wie vorgeschlagen als Trennstrecke (Start-Front) 10 cm, so ergibt die Wanderungshöhe einer Substanz (Start-Fleckmittelpunkt in cm) $\times 10$ den hR_f -Wert. Da nun die R_f -Werte von einer Reihe von Faktoren abhängig sind, sollte man sie nur als «Richtwerte» betrachten. Das ist auch der Grund, daß man für die Lage einer Substanz auf dem Chromatogramm nur « hR_f -Bereiche» angeben sollte z.B. hR_f 60–70.

Erhält man aufgrund äußerer Bedingungen, z.B. zu geringer Luftfeuchtigkeit oder eines Sorptionsmittels mit etwas abweichenden Eigenschaften, Chromatogramme, bei denen die R_f -Werte der Substanzen generell tiefer oder auch höher liegen, so ändere man das Fließmittel in entsprechender Weise. Liegen die R_f -Werte höher als angegeben, so vermindere man die Polarität, liegen sie tiefer, so erhöhe man den polaren Anteil. Dies ist bei Mischungen, wie z.B. Toluol-Chloroform oder Chloroform-Methanol, in einfacher Weise möglich.

Beachte: Ein gleicher R_f -Wert zweier Substanzen besagt nicht, daß sie identisch sind.

Visuelle Auswertung

Bei der visuellen Auswertung eines Chromatogrammes (vgl. Abb. 11 rechts) ist folgendes zu vergleichen:

- Wanderungsweite der Substanzen der Untersuchungslösung mit denjenigen der Vergleichslösung. Beim Vorliegen mehrerer Untersuchungslösungen erfolgt auch der Vergleich untereinander (Abb. 11 rechts).
- Eigenschaften wie z.B. Fluoreszenz oder Fluoreszenzminderung und insbesondere der Ausfall der Farbreaktion. Bei den Farbreaktionen gibt oft auch der Vergleich der Farbänderungen beim Erhitzen und beim anschließenden Lagern der Platten Hinweise auf die Identität.
- Der Vergleich der Zonengröße gibt einen Anhaltspunkt über die Mengenverhältnisse. Allerdings ist zu bedenken, daß auch bei gleichen Mengen eine zunehmende Ausbreitung der Flecken vom Start zur Front hin erfolgt. Strenggenommen ist deshalb nur ein Vergleich von Zonen des gleichen hR_f -Bereiches zulässig. Die «Größe» der Zone ist auch von der Empfindlichkeit der Nachweisreaktion abhängig: «Bei unempfindlichen Nachweisen erhält man kleine, scheinbar gut getrennte Zonen, bei den hochempfindlichen Fluoreszenznachweisen oft zu große Flecken, die ineinander übergehen.»

Dokumentation

Hier gibt es verschiedene Verfahren; am einfachsten ist das direkte Nachzeichnen auf Transparentpapier. Es ist vorteilhaft, die Farbe ebenfalls festzuhalten und hierzu einen umfangreichen Satz von Farbstiften zu verwenden.

Die Mehrzweckschablone (Abb. 15) ist eine gute Hilfe beim Übertragen von mit Schwefelsäure besprühten Chromatogrammen auf Papier; man legt sie brückenartig als «Raster» über die DC-Platte. Die schnellste, aber auch kostspieligste Dokumentation von Dünnschicht-Chromatogrammen ist die Polaroid-Farbfotografie.

Weiterführende Literatur

STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch, 2. Auflage, Springer Verlag- Berlin-Heidelberg-New York (1967).

RANDERATH, K.: Dünnschicht-Chromatographie, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim (1965).

1.3 TAS-Verfahren und Mikrosublimation

«Zahlreiche organische und anorganische Substanzen sind bei höherer Temperatur flüchtig und lassen sich so aus Proben abtrennen.»

Seit über einem halben Jahrhundert führt man bei einigen Drogen eine Mikrosublimation durch und identifiziert anhand der Kristallform, des Schmelzpunktes und/oder des chemischen Verhaltens; ein klassisches Beispiel ist das Heraussublimieren von Coffein aus den Xanthindrogen. Hierzu werden im einfachsten Fall wenige mg der gepulverten Droge auf einem Objektträger erhitzt und das Sublimat auf einem im Abstand von ca. 1 mm darüber befindlichen zweiten Objektträger aufgefangen. Koppelt man nun eine solche Thermomikro-Abtrennung mit einem Transfer- und Auftrageverfahren und einer sich anschließenden Dünnschicht-Chromatographie, so kommt man zum TAS¹-Verfahren.

A. Prinzip des TAS-Verfahrens

Die zu untersuchende gepulverte Droge (4) wird in eine konisch verjüngte Glaspatrone (2) gegeben. Die am hinteren Ende mit einer Siliconmembran (1) dicht verschlossene Patrone steckt man nun in einen Heizblock (3), der eine bestimmte Temperatur hat, z. B. 220°. Die flüchtigen Substanzen verdampfen und treten durch die kapillare Öffnung der Patrone als Dampfstrahl aus. Unmittelbar, d. h. 0,5 mm vor dieser Austrittsöffnung wird nun eine DC-Platte (6) gehalten. Das flüchtige Gemisch kondensiert hierauf als «Startpunkt» und kann anschließend chromatographiert werden.

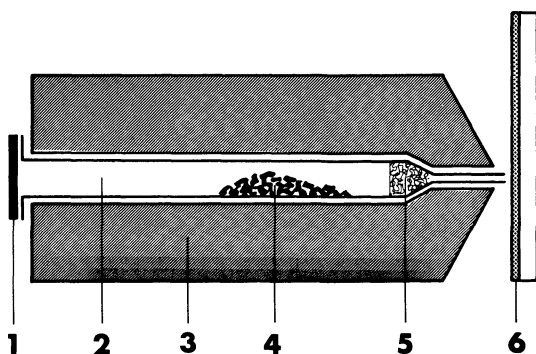


Abb. 21: Längsschnitt durch einen TAS-Ofen mit davor gehalterter DC-Platte.

- | | |
|----------------------|----------------|
| 1 = Abdichtung | 4 = Probe |
| 2 = Glaspatrone | 5 = Glaswolle |
| 3 = Heizblock (Ofen) | 6 = DC-Schicht |

B. Geräte zum TAS-Verfahren (Abb. 21)

So wie man zur Mikroskopie ein Mikroskop benötigt, ist beim TAS-Verfahren ein TAS-Ofen (Abb. 22) erforderlich. Bei diesem Gerätesatz sind die Einzelteile aufeinander abgestimmt, und es ist eine direkte Kopplung mit der DC möglich.

Handhabung des TAS-Ofens

a) *Temperatureinstellung*: Etwa 30 min vor Beginn des Versuchs sollte das Gerät eingeschaltet und die gewünschte Temperatur eingestellt werden. Eine Nacheichung durch Einstecken eines

¹ Abkürzung für: Thermomikro-Abtrenn-, Transfer- und Auftrage-Verfahren für Substanzen nach STAHL.

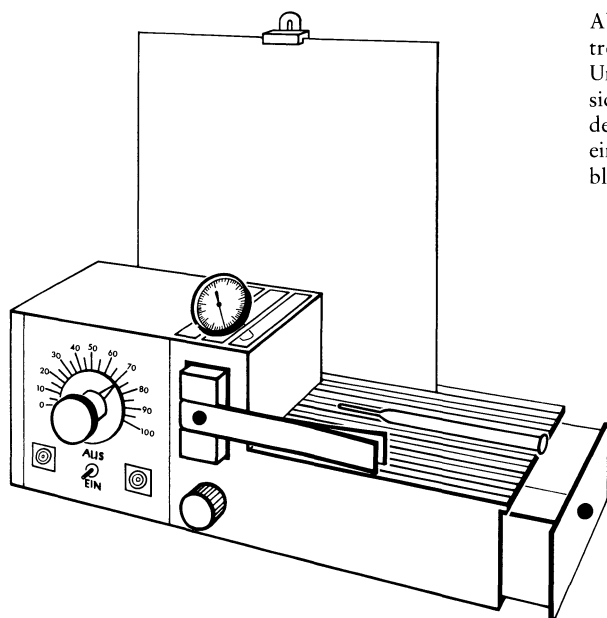


Abb. 22: TAS-Ofen mit eingesteckter Patrone. Schalter und Temperaturregler links. Unter dem Aluminiumheizblock befindet sich der Drehknopf zur Schnelleinstellung des Abstands zur DC-Platte. Diese ist mit einem Haltearm senkrecht hinter dem Heizblock gehalten.

üblichen Quecksilber-Laborthermometers in die Ofenbohrung ist bei einem neuen Gerät angezeigt. Beim üblichen Gebrauch genügt die Anzeige der Temperatur des schräg im Ofenblock gehaltenen Metall-Rundthermometers; man vermeide Temperaturen über 300°.

b) *TAS-Patronen*: Die TAS-Patronen sollen aus dünnwandigem schwerschmelzbarem Glas hergestellt werden. Sie müssen auf 0,1 mm genau in Länge und Dicke dimensioniert sein. Um bei verschiedenartiger Füllung Verwechslungen zu vermeiden, ist es vorteilhaft, zu markieren, z. B. mit Einbrennfarben.

Füllen im Normalverfahren. Zunächst wird etwas Quarzwolle als loser Pfropf in die Patrone eingeschoben (s. Abb. 21/5). Dies soll verhindern, daß Teilchen der Probe in die kapillare Austrittsöffnung gelangen und sie verstopfen.

Nun wird die abgewogene Probe, zumeist 5–50 mg, in die schräggehaltene Patrone eingefüllt. Zum Abwiegen und Einfüllen eignen sich die leicht und schnell herzustellenden «Wägeschiffchen» und «Kartuschen» aus Aluminiumfolie. Die Herstellung einer Kartusche und ihre Lage in der Patrone ist aus Abb. 24 ersichtlich.

Verschuß der Patrone: Zum Verschuß dient der sog. HD-Clip (= Halte- und Dichtungsklammer). Er drückt eine leicht auswechselbare Silikongummidichtung auf den Wulstrand der Patrone und verhindert so ein Austreten der Dämpfe¹. Es ist vorteilhaft, über diese Dichtung eine dünne Aluminiumfolie zu legen und diese bei jedem Versuch zu wechseln. Man hat dann die Garantie, daß von der Dichtung her keine Reste vorheriger Proben auf die DC-Schicht gelangen.

Der HD-Clip ist ferner zum Festhalten der Patrone und zum Einführen in den Ofen bestimmt. Er soll bei eingeschobener Patrone in der Nute (Fuge) des Ofens ruhen und der Griff soll nach rechts zeigen. Damit ist auch die Gewähr gegeben, daß sich die Patrone in der richtigen Lage befindet.

¹ Durch diese Dichtungsmembran kann man u. a. mittels einer Mikroinjektionsspritze Lösungsmittel in den Patronenraum injizieren.

Einführen und Herausziehen der TAS-Patrone: Beides soll jeweils in etwa 1 Sekunde beendet sein. Bei langsamem und zögerndem Vorgehen gelangen aus der Patrone Substanzdämpfe in den Ofen. Er muß dann im heißen Zustand mit einem Luftstrom durchgeblasen und so gereinigt werden.

Abstand TAS-Patrone zur Schicht: Wichtig ist der Abstand der Patronenspitze von der Oberfläche der DC-Schicht. Er sollte ca. 0,5 mm betragen; dies ist mittels des kleinen «Projektionsscheinwerfers» gut erkennbar. Die Patronenspitze wird dabei als Schattenriß auf die DC-Schicht projiziert (Abb. 23). Da der Außendurchmesser der Kapillare ca. 1 mm beträgt, hat man einen guten Anhaltspunkt.

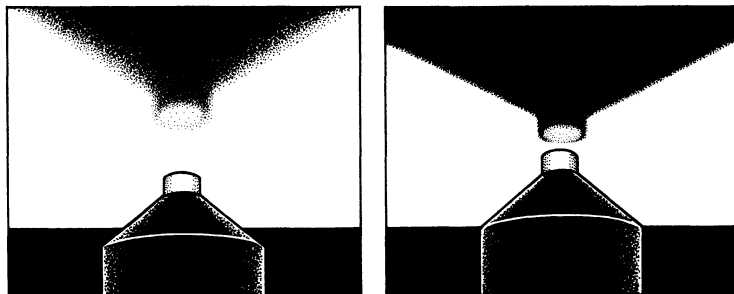


Abb. 23: Eingebaute Abstandsregulierung vom TAS-Ofen zur Schicht durch Schattenprojektion. Vorne: TAS-Ofen mit der 1 mm herausragenden Kapillare der Patrone, dahinter die weiße DC-Platte mit dem Schatten. *Links:* Schatten unscharf, da Abstand zu weit (3 mm). *Rechts:* Richtige Einstellung auf ca. 0,5 mm.

Die Abstandsregulierung wird in den ersten Sekunden nach dem Einführen der Patrone in den Ofen vorgenommen. Dies ist mit dem direkt unter dem Heizblock befindlichen Drehknopf möglich (Abb. 22).

Einschieben eines Objektträgers oder einer DC-Platte und Transport: Erst kurz vor dem eigentlichen Versuch wird der Objektträger² oder die DC-Platte in die Führungsschiene des TAS-Ofens von rechts nach links eingeschoben. Man beobachte hierbei die Spitze des Ofenblocks und den Abstand. Die Ofenspitze soll auf den künftigen Startpunkt zeigen. Die obere Halterung eines Objektträgers oder einer DC-Platte erfolgt mittels eines verstellbaren Haltebügels am Haltearm (Abb. 22). Das abstandsgerechte Andrücken bewirkt ein Federbügel. Nach jeder Auftragung verschiebt man die DC-Platte um 15–20 mm nach links zum nächsten Startpunkt.

Ist man sich über die optimale Dauer der Auftragszeit nicht im klaren, so verschiebt man die DC-Platte alle 30 Sekunden um 15 mm. Aus dem späteren Chromatogramm ergibt sich dann die notwendige Verweilzeit der Patrone im Ofen, d. h. die «Aufdampfzeit».

C. Weitere Fülltechniken und Treibmittel

Neben dem geschilderten Normal-Füllverfahren u. U. unter Zuhilfenahme eines Wägeschiffchens hat sich die Kartuschen-Füllung besonders bewährt.

² Das direkte Aufdampfen (Sublimieren, Destillieren) auf einen Objektträger dient zur anschließenden mikroskopischen, d. h. kristalloptischen Untersuchung oder zur Durchführung von Tüpfelreaktionen.

Kartuschen-Füllung: Zur Herstellung einer in die Glaspatrone passenden Kartusche aus Aluminiumfolie geht man in der Weise vor, wie dies Abb. 24 zeigt. Man wählt eine Aluminiumfolie im Format 40×40 mm und formt daraus eine Hülse. Diese wird an einem Ende flachgedrückt und durch Einrollen verschlossen. In diese Hülse füllt man dann die Probe ein und wenn erforderlich auch das Treibmittel. Die so gefüllte Kartusche schiebt man dann in die Patrone, und zwar so weit, bis sie an der vorderen Verjüngung der Glaspatrone anstößt.

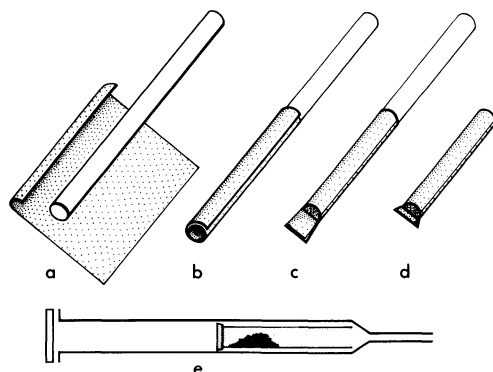


Abb. 24: Herstellungsstufen (a–d) einer Kartusche aus dünner Aluminiumfolie. e) TAS-Patrone mit gefüllter und eingeschobener Kartusche.

Treibmittel: Unter «Treibmittel» versteht man beim TAS-Verfahren eine Substanz, die zusätzlich in die Patrone eingefüllt wird. Sie gibt bei der Ofentemperatur eine bestimmte Menge Wasserdampf und/oder ein anderes Gas ab. Dieses bewirkt dann, daß die bereits verdampften Stoffe aus der eigentlichen Probe mitgerissen werden und sich am Startpunkt niederschlagen. In den meisten Drogen ist ein – je nach der Feuchtigkeit der Umgebung wechselnder – Gehalt an Wasser (5–15 %) vorhanden. Daher kann bei manchen Drogen auf den Zusatz eines Treibmittels verzichtet werden.

a) als **neutrale Treibmittel**, die Wasserdampf abgeben, haben sich bisher:

α) **Molekularsieb:** Eine gleichmäßige und kontinuierliche Wasserabgabe auch bei höheren Temperaturen erfolgt mit kugelförmigen 4 \AA ($= 0,4 \text{ nm}$) Molekularsieb ($\varnothing 3\text{--}4 \text{ mm}$), das mit 20–25 % Wasser beladen ist. Das handelsübliche Granulat benötigt in einer wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mindestens 24 h zur Wasseraufnahme. Es kann danach in dichtschießenden Gefäßen bis zum Gebrauch aufbewahrt werden.

β) **Rosagel:** Das üblicherweise zum Trocknen verwendete gekörnte «Blaugel» (= Silikagel mit einem Kobaltsalz als Feuchtigkeitsindikator) nimmt ebenfalls ca. 20 % Wasser auf und gibt es beim Erhitzen relativ schnell wieder ab. Es kann daher auch bedingt als Treibmittel verwendet werden.

b) **Basische Treibmittel**

Um z.B. saure Substanzen in der Probe festzuhalten und neutrale und basische auszutreiben, sind Treibmittel, die basische Dämpfe liefern, vorteilhaft. Ist ammoniakhaltiger Wasserdampf erwünscht, so verwendet man Ammoniumcarbonat. Vorteilhafter ist ein Calciumchlorid, das anstelle des Kristallwassers 8 NH_3 enthält. Man stellt es sich aus wasserfreiem Calciumchlorid durch Aufkondensieren von trockenem Ammoniakgas (Bombe) her und bewahrt es in geschlossener Flasche auf (NH_3 -Atmosphäre).

c) **Saure Treibmittel**

Als Treibmittel, das beim Erhitzen Säure abspaltet, kommt Malonsäure in Betracht; sie spaltet sich in Kohlendioxid und Essigsäure bei $T > 180^\circ$. Mit einem derartigen Treibmittel lassen sich Basen in der Droge als Salze fixieren bzw. Salze organischer Säuren überführen.

D. Notwendige Angaben für das TAS-Verfahren

Wie bei anderen analytischen Verfahren ist die Erprobung der optimalen Arbeitsbedingungen notwendig. Es ist zweckmäßig, die so ermittelten Daten etwa in folgender Form und Reihenfolge anzugeben:

1. die in die Patrone gegebene Drogenmenge in mg;
2. die Art und Menge des eventuell zugesetzten Treibmittels;
3. die eingestellte Ofentemperatur;
4. die Verweilzeit der gefüllten Patrone im Ofen.

Die Aufgabebedingungen für eine bestimmte Droge würden so z. B. lauten: TAS: 25 mg Droge XY gepulvert, 1 Molekularsieb 4 Å (= 0,4 nm), wassergesättigt, 220 °C; 60 s.

Mikrosublimation

Die Mikrosublimation im klassischen Sinne setzt kristalline Sublimate voraus, diese treten bei Drogen nur in wenigen Fällen auf, zumeist erhält man ölige Tröpfchen. Aus diesem Grunde bietet sich die Kopplung der Mikrosublimation, -destillation mit der DC, wie sie im TAS-Verfahren durchgeführt wird, an.

1.4 Spektroskopische Methoden auf der Grundlage elektromagnetischer Strahlung

Spektroskopische Verfahren sind für die Identifizierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen unerlässlich. Häufig gebraucht werden sie auch zur photometrischen Gehaltsbestimmung von Drogeninhaltsstoffen. Die wichtigsten Grundlagen der bei den Isolierungsvorschriften und den Gehaltsbestimmungen des Arzneibuchs aufgeführten Verfahren sind nachstehend in knapper Form behandelt. Ein tieferes Eindringen in diese Gebiete und in die weiteren spektroskopischen Verfahren ist anhand der am Ende des Kapitels aufgeführten Literatur möglich.

Wenn ein Molekül von elektromagnetischen Wellen durchstrahlt wird, können je nach Größe der Energie bzw. der Wellenlänge mehrere Wirkungen beobachtet werden. Insbesondere sind die Anregung des Elektronensystems des Moleküls und die Anregung von Molekülschwingungen für die Strukturaufklärung und für die Identitätsprüfung von Naturstoffen aus Drogen von Bedeutung. Die Elektronenanregung ist Grundlage der Spektroskopie im sichtbaren (VIS) und UV-Bereich, die Anregung von Molekülschwingungen die Grundlage der IR-Spektroskopie.

A. Spektroskopie im sichtbaren (400–800 nm) und im UV-Bereich (200–400 nm)

Bei der Elektronenanregung gehen die Elektronen in σ -, π - und n -Orbitalen aus dem Grundzustand in höhere Energiezustände über, die als σ^* und π^* -Orbitale bezeichnet werden. Folgende Übergänge sind im ultravioletten und sichtbaren Bereich möglich:

- 1). $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -Übergänge: Valenzelektronen, wie sie in C-C-Einfachbindungen vorkommen, benötigen eine sehr hohe Energie zum $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -Übergang. Die Absorption findet bei Wellenlängen unter 170 nm statt. Dieser Wellenlängenbereich liegt außerhalb des Meßbereichs der UV-Spektroskopie, Absorptionen treten daher im UV-Spektrum nicht auf.
- 2). $n \rightarrow \sigma^*$ -Übergänge: Eine geringere Energie (180–200 nm) ist zum Übergang von freien n -Elektronen notwendig, wie sie in gesättigten Verbindungen vorkommen, die ein Heteroatom enthalten, z. B. am Sauerstoff-, Stickstoff- oder Halogenatom.
- 3a). $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge: Eine etwas geringere Energie (190–215 nm) benötigen Übergänge von Elektronen (isolierten) in den angeregten π^* -Zustand, wie sie in C-C-Doppel- und Dreifachbindungen vorliegen.

Je mehr Mehrfachbindungen konjugiert sind, desto geringer ist die Überführungsenergie, d.h., die Absorption erfolgt bei längerwelligem Licht. Ist das konjugierte System lang genug, wird die Absorption in den Bereich des sichtbaren Lichtes verschoben, und die Verbindung erscheint farbig (z.B. Carotinoide).

3b). $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge: Übergänge von n -Elektronen bei Heteroatomen, die doppelt gebunden sind – z.B. =O in Ketonen und Aldehyden, –N= in Heterocyclen –, in den π^* -Zustand benötigen die geringste Energie (275–300 nm). Auch hier treten zusätzlich $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge auf, und zwar aufgrund der Doppelbindung, deren Absorption jedoch bei Wellenlängen < 200 nm auftreten. Teile des Moleküls, bei denen Elektronenübergänge im sichtbaren und im UV-Bereich (3a und 3b) möglich sind, werden als Chromophore bezeichnet. Substanzen mit mehreren Chromophoren, die nicht konjugiert sind, zeigen mehrere Absorptionsmaxima. Eine Verschiebung der Absorptionsmaxima durch Chromophore zu längeren Wellenlängen wird als *Bathochromie* oder Rotverschiebung bezeichnet. Eine Verschiebung der Absorptionsmaxima nach kürzeren Wellenlängen wird als *Hypsochromie* oder Blauverschiebung bezeichnet. Für die Intensität einer Absorption (\cong Extinktion) gilt bei $\lambda = \text{konst.}$ das LAMBERT-BEERSche Gesetz:

$$E_{\lambda} = \varepsilon \cdot c \cdot d.$$

E : Extinktion

ε : molarer Extinktionskoeffizient (Stoffkonstante).

d : Schichtdicke cm.

c : Konzentration mol/l.

Die Extinktion einer 1proz. Lösung [G/V] in einer Schichtdicke von 1 cm bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums bezeichnet man als *spezifische Extinktion* $E_{1\text{ cm}}^1\%$.

Die einzelnen Chromophoren haben unterschiedliche molare Extinktionskoeffizienten. Einfach konjugierte Chromophore, z.B. Diene und α, β -ungesättigte Ketone haben ε -Werte von 10000 bis 20000. Mit Zunahme des konjugierten Systems nimmt auch der ε -Wert zu, wobei gleichzeitig das Absorptionsmaxima nach höheren Wellenlängen verschoben wird.

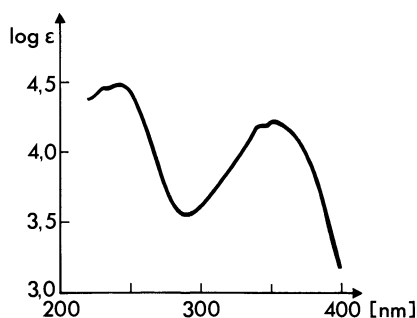


Abb. 25: UV-Spektrum von Colchicin.

240 nm: Benzolbande durch OCH_3 -Gruppe und Konjugation verschoben und in der Intensität verstärkt ($\pi \rightarrow \pi^*$) und NHCOCH_3 -Gruppierung.

350 nm: $\text{C}=\text{O}$ -Bande ($n \rightarrow \pi^*$) durch den Chromophor des Tropolonrings und des Benzolkerns verschoben und entsprechend verstärkt.

$n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge von Ketonen liefern Absorptionsbanden von sehr geringer Intensität im Bereich von 270–350 nm. Die ε -Werte liegen bei 10–100. Aromatische Systeme liefern Banden mit ε -Werten von 1000–10000. Substituenten am aromatischen Kern erhöhen diese Werte für die Hauptbanden über 10000.

Instrumentation und Meßtechnik

Die handelsüblichen Spektralphotometer umfassen zumeist den Wellenlängenbereich von 200–800 nm. Sichtbares Licht (400–800 nm) wird durch eine Glühlampe (W-Draht) und UV-Licht durch eine Wasserstoff- oder Deuteriumlampe erzeugt. Das Licht wird dann durch einen Monochromator (Prisma oder Gitter) in die einzelnen Wellenlängen zerlegt, welche die in Lö-

sung befindliche Probe durchstrahlen. Das «durchgelassene» Licht wird vom Empfänger (Photomultiplier) in ein elektrisches Signal umgewandelt. Neben dem Einstrahl-Photometer gibt es die Doppelstrahl-Photometer, bei denen das Licht in zwei Strahlen zerlegt wird, von denen der eine Strahl durch die Meßlösung, der andere durch die Vergleichslösung tritt. Die Absorption des Lösungsmittels (Vergleichslösung) wird von der der Meßlösung subtrahiert. Als Lösungsmittel kommen solche in Betracht, die oberhalb von 200 nm keine oder nur geringfügige Eigenabsorption besitzen. Meist werden Methanol, 96proz. Ethanol, Cyclohexan, Acetonitril, Hexan und Chloroform verwendet. Die Konzentration der Untersuchungslösung richtet sich nach den molaren Extinktionskoeffizienten. Durch Lösungsmittelleffekte kann die Lage des Absorptionsmaximums um geringe Beträge nach unten (hypsochrom) oder oben (bathochrom) verschoben sein. Da normales Glas UV-undurchlässig ist, müssen alle Messungen im UV-Bereich in Quarzküvetten durchgeführt werden.

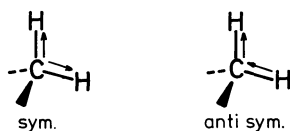
B. Infrarot-Spektroskopie (IR)

Zur Identitätsprüfung und zur Strukturaufklärung von Substanzen mit einem kleineren und mittleren Molekulargewicht ist die Infrarot-Spektroskopie von größerer Bedeutung. Der normale IR-Bereich umfaßt den Wellenlängenbereich 2,5 bis 15 μ entsprechend einem Wellenzahlenbereich von 4000–667 cm^{-1} , in dem die Absorptionen organischer Moleküle liegen.

Jedes Molekül besitzt unter festgelegten Meßbedingungen ein charakteristisches Infrarot-Spektrum, das sich vom Spektrum aller anderen Moleküle unterscheidet und durch Lage und Intensität der Absorptionsbanden zur Strukturaufklärung, Prüfung auf Reinheit und Identifizierung dienen kann.

Die Lage der Absorptionsbanden wird durch die Wellenlänge oder die reziproke Wellenlänge, die Wellenzahl wiedergegeben. Man unterscheidet zwei Schwingungsarten.

a) *Valenzschwingungen* («Streckschwingungen»), dies sind Schwingungen entlang der Bindungsachse der beteiligten Atome. Sie sind lokalisiert und auf funktionellen Gruppen beschränkt. Man unterscheidet ferner zwischen symmetrischen und anti- oder asymmetrischen Schwingungen.



Die Absorption liegt im Bereich von 4000–1500 cm^{-1} . An den entsprechenden Bandenlagen in diesem Bereich kann man bei Strukturaufklärungen funktionelle Gruppen erkennen.

Valenzschwingungen, an welchen Wasserstoffatome beteiligt sind (OH, NH, CH), liegen im Bereich von 4000–2800 cm^{-1} .

Valenzschwingungen dreifach gebundener Atomgruppen ($-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{C}\equiv\text{N}$) und von kumulierten Doppelbindungen liegen im Bereich von 2800–2100 cm^{-1} . Valenzschwingungen doppelt gebundener Atome (>C=C< , >C=O , >C=N-) liegen zwischen 2100 und 1500 cm^{-1} .

b) *Deformationsschwingungen*: Hierbei verändern sich nur die Bindungswinkel, aber nicht die Atomabstände. Sie betreffen das ganze Molekül. Hierbei handelt es sich einmal um Beugeschwingungen in der Ebene (in plane), die in Scherenschwingungen (scissor) und Schaukelschwingungen (rocking) untergliedert werden können, und zum anderen um Beugeschwingungen aus der Ebene (out of plane), die in Nickschwingungen (wagging) und Torsionsschwingungen (twist) untergliedert werden können.

Die Absorptionsbanden liegen im Bereich unterhalb 1500 cm^{-1} . Die Zuordnung einzelner Absorptionsbanden ist schwierig. Dieser Bereich ist aber charakteristisch für ein organisches Molekül und wird daher als «fingerprint»-Bereich bezeichnet.

Instrumentation und Meßmethodik

Die meisten IR-Geräte sind als Zweistrahngeräte ausgelegt. Als Strahlungsquelle dient zum Beispiel ein NERNST-Stift (Keramikstab aus 85 % Zirkoniumoxid und 15 % Yttriumoxid), dessen Licht einen hohen IR-Anteil aufweist. Sie arbeiten auf dem Doppelstrahlprinzip und vergleichen über einen rotierenden Spiegel automatisch Vergleichsstrahl und Meßstrahl miteinander. Die nacheinander auf dem Detektor auftreffenden Strahlenblitze des Vergleichs- und Meßstrahls mit den Intensitäten I_0 und I werden als Verhältnis $100 \cdot I/I_0$ (Durchlässigkeit) gegen die Wellenlänge registriert.

a) Feste Substanzen

werden häufig als Preßlinge (Standarddurchmesser 13 mm) untersucht. Als Einbettungsmittel eignen sich Natriumchlorid (Durchlässigkeit 650 cm^{-1}) und insbesondere Kaliumbromid (Durchlässigkeit 400 cm^{-1}). Hierzu verreibt man in einem Achatmörser zunächst 1–2 mg der zu untersuchenden Substanz und verreibt diese dann mit 200–300 mg Kaliumbromid weiter. Das Gemisch wird in eine evakuierbare Preßform gegeben. Die Mischung wird dann in der Preßform evakuiert und bei laufender Vakuumpumpe einem Druck von $0,6 \cdot 10^4 \text{ [kg/cm}^2\text{]}$ entsprechend $7,5 \cdot 10^8 \text{ Pa}$ ($= 7500 \text{ bar}$) ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen sintert das Kaliumbromid; zur Vervollständigung der Sinterung wird der maximale zur jeweilig benutzten Preßform zulässige Druck noch 2 min belassen. Durch die Sinterung ist das Kaliumbromid mit der darin fein verteilten Substanz glasartig, durchsichtig, geworden. Ist die Substanz nicht ausreichend verteilt, d. h. die Korngröße zu groß, so nimmt die 100 %-Linie mit abnehmender Wellenzahl zu, und die Bandenintensität im Bereich kleiner Wellenzahl ist relativ stärker als im Bereich großer Wellenzahlen. Dieser CHRISTIANSENEffekt tritt auch auf, wenn die Brechungsindicesunterschiede zwischen Probe und Einbettungsmittel zu groß sind.

Man beachte, daß Kaliumbromid und somit auch die Preßlinge hygroskopisch sind, und arbeite deshalb zügig.

b) Flüssige Substanzen

Am einfachsten werden flüssige Substanzen mit Siedepunkten $> 150^\circ$ als Film zwischen 2 Kaliumbromidpreßlingen ohne Füllung vermessen. Leichter flüchtige, flüssige Substanzen werden meist in zerlegbaren geschlossenen Flüssigkeitsküvetten gemessen. Diese bestehen aus 2 Kochsalzplatten, zwischen die eine Distanzscheibe aus Blei oder Teflon gelegt wird. Durch einen mit einem Teflonstopfen verschließbaren Einfüllstutzen wird die Flüssigkeit bei geöffnetem Ablassstutzen mit einer dicht schließenden Kolbenspritze in die Küvette gegeben. Danach werden Ablass- und Füllstutzen verschlossen. Die gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeiten in der Küvette erkennt man meist an der Transparenz des Küvettenraums.

c) Substanzen in Lösungen

Identitätsprüfungen und Strukturaufklärungen werden auf diese Weise selten vorgenommen. Die Messungen in Lösung erfolgen meist bei quantitativen Bestimmungen. Hierbei wird die Messung bei einer bestimmten Absorptionsbande durchgeführt. Daher wird ein Lösungsmittel gewählt, das in diesem Bereich keine Eigenabsorptionsbanden zeigt. Man kann andererseits die Absorptionsbande des Lösungsmittels kompensieren, indem man in den Vergleichsstrahl eine Flüssigkeitsküvette gleicher Schichtdicke mit dem gleichen Lösungsmittel stellt. Je nach Schichtdicken und Problemstellung beträgt die Substanzkonzentration 1–20 % (bei 2–0,1 mm Schichtdicke).

d) Festsubstanzen als Suspensionen in Öl

werden seltener vermessen. Die fein zerriebene Substanz wird in Paraffinöl (Nujol) oder ähnlichen Lösungsmitteln zerrieben. Der Nachteil dieser Methode liegt im Auftreten von Absorptionsbanden des Einbettungsmittels. Der Vorteil besteht darin, daß hygroskopische Substanzen problemlos vermessen werden können, ebenso Substanzen, die sich im polaren Kaliumbromid verändern. Außerdem sind keine aufwendigen Apparate (Preßform) erforderlich.

Mikrotechnik

Da das IR-Spektrum am besten geeignet ist, die Identität einer Substanz zu beweisen, ist es vorteilhaft, sie mit der DC zu kombinieren. Da jedoch die in der DC üblichen Substanzmengen von 10–20 µg zur Herstellung eines Standardpreßlings (1–2 mg in 300 mg Kaliumbromid) meist zu klein sind, wird die gleiche Substanzkonzentration im Preßling durch Reduzierung des Durchmessers des Kaliumbromidpreßlings erreicht. Durch die Reduzierung des Durchmessers des Preßlings geht ein Teil der Intensität der IR-Strahlung verloren. Dies kann in besseren Geräten durch Vergleichsstrahlabschwächung kompensiert werden. Falls nicht, wird durch ein Sammellinsensystem aus Kaliumbromidlinsen (Mikroilluminator) der IR-Strahl auf die Mikroprobe gebündelt. Zum mechanischen Transfer der zerstörungsfrei auf dem Dünnschicht-Chromatogramm markierten Substanz wurden mehrere Verfahren beschrieben. Ihnen liegt folgendes Prinzip zugrunde: Die Substanzzone wandert aus der transferierten Substanzzone mit Hilfe eines geeigneten Lösungsmittels durch eine Kaliumbromidzone (spitzdreieckig geformter Preßling oder durch ein mit Kaliumbromid gefülltes Röhrchen). An der Spitze der Kaliumbromidzone reichert sich die Substanz an und das Lösungsmittel verdampft. Aus der Spitze stellt man einen Mikropreßling her. Die untere Kaliumbromidzone dient als Filterhilfsmittel zur Zurückhaltung feinsten Sorptionsmittelpartikels.

Arbeitsanleitung für die SpectroTip®-Methode der Firma MERCK, bereits früher bekannt als WICK-STICK® der Firma Harshaw Chemical Co., Cleveland-Ohio (USA), Vertrieb: ORIEL GmbH., Darmstadt.

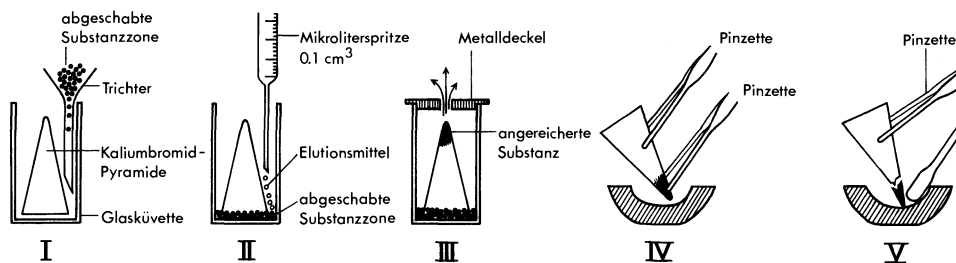


Abb. 26: DC-IR-Transfer, in Teilschritten dargestellt. Einzelheiten im nachstehenden Text.

Man entnimmt der Packung mittels einer Pinzette eine Kaliumbromid-Pyramide und stellt sie in eine der beigegebenen Glasküvetten (Abb. 26). Mit Hilfe des Trichters füllt man um die Basis der Pyramide das von der DC-Platte oder Folie abgeschabte Schichtmaterial mit der zu analysierenden Substanz (Abb. 26, I). Dabei ist darauf zu achten, daß der obere Teil der Pyramide nicht mit dem Schichtmaterial kontaminiert wird.

Mit einer Mikroliterspritze gibt man 0,1 cm³ (2–3 Tropfen) eines geeigneten spektralreinen Lösungsmittels dazu (Abb. 26, II) und bedeckt die Küvette mit einem der beiliegenden Edelstahldeckel im Mittelloch. Infolge Kapillarwirkung steigt das Lösungsmittel in der Kaliumbromid-Pyramide hoch, transportiert die Substanz in die Spitze und verdunstet in ca. 20–30 min (Abb. 26, III). Alle niedermolekularen und kolloidalen Anteile, die aus dem Schichtmaterial der DC-Platte besonders von polarem Lösungsmittel gelöst werden können, werden in der Kaliumbromid-Pyramide zurückgehalten. Um sicher zu sein, die gesuchte Substanz in der Spitze der Pyramide wiederzufinden, werden nach Verdunstung des Lösungsmittels noch 1–2 mal je 0,1 cm³ (2–3 Tropfen) Lösungsmittel nachgefüllt.

Nach vollständiger Verdunstung des Lösungsmittels bricht man ca. 1–2 mm der Pyramiden-spitze ab (Abb. 26, IV), verreibt sie gut in einem kleinen Achatmörser (Abb. 26, V) trocknet im Vakuum oder unter einer Infrarotlampe und verarbeitet sie zu einem Mikropreßling. Je nach

der zu erwartenden Substanzmenge (2 µg–20 µg) formt man aus etwa 0,5–0,6 mg Kaliumbromid einen Preßling mit 0,5 mm Durchmesser bzw. aus etwa 4–5 mg Kaliumbromid einen solchen mit 1,5 mm Durchmesser.

Literatur zur Spektroskopie

Kurze Einführungen

- LATSCHKA, H. P., H. A. KLEIN und J. KESSEL: Pharmazeutische Analytik. Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York (1979).
 ROTH, H. J., und G. BLASCHKE: Pharmazeutische Analytik. Thieme Verlag, Stuttgart (2., überarb. Aufl. 1981).
 WAGNER, H., et al.: Phytochemisches Praktikum. Selbstverlag (1974).

Ausführlichere Darstellungen

- BORSDOFF, R., und M. SCHOLZ: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie; WTB. Vieweg und Sohn, Braunschweig (1968).
 FAHR, E., und M. MITSCHKE: Spektren und Strukturen organischer Verbindungen. Verlag Chemie – Physik Verlag, Weinheim (1979).
 HESSE, M., H. MEIER und B. ZEEH: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1984).
 KEMP, W.: Organic Spectroscopy. The Macmillan Press, LTD London an Basingstoke (1975).
 PASTO, J., and C. J. JOHNSON: Organic Structure Determination. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J. (1969).
 PRETSCH, E., u. a.: Tabellen zur Strukturaufklärung organ. Verbindungen mit spektroskop. Methoden. Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York (1976).
 RÜCKER, G.: Spektroskopische Methoden in der Pharmazie, Band I und Band II. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1976).
 SCHEINMANN, F.: An Introduction to Spectroscopic Methods for Identification of Organic Compounds. Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford, Vol. 1 (1970), Vol. 2 (1974).
 SIMON, W., und T. CLERC: Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M. (1967).
 WILLIAMS, D. H., und I. FLEMING: Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung, 5. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1985).

Einzelne Spektroskopische Methoden

IR-Spektroskopie

- BELLAMY, L. J.: Ultrarot-Spektrum und chem. Konstitution. Dr. Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt (1966).
 DERKOSCH, J.: Absorptionsspektralanalyse im ultravioletten, sichtbaren und infraroten Gebiet. Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt (1967).
 GÜNZLER, H., und H. BÖCK: IR-Spektroskopie, Eine Einführung. Verlag Chemie – Physik Verlag, Weinheim (1975).
 HEDIGER, H. J.: Infrarot-Spektroskopie, Grundlagen, Anwendung, Interpretation; Methoden der chem. Analyse, Bd. 11. Akad. Verlagsgesellschaft, Frankfurt M. (1971).
 HILL, R. R., und D. A. E. RENDELL: The Interpretation of Infrared-Spectra, A Programmed Introduction. Heyden + Son Ltd., London–New York–Rheine (1975).
 NAKANISHI, K.: Infrared Absorption Spectroscopy. Holden Day Inc., San Francisco (1962).
 WEITKAMP, H., und R. BARTH: Infrarot Strukturanalyse. Thieme Verlag, Stuttgart (1972).

NMR-Spektroskopie

a) ¹H–NMR

- AULT, A., und G. O. DUDEK: Protonen-Kernresonanz-Spektroskopie; UTB. Steinkopf Verlag, Darmstadt (1979).
 BOVEY, F. A.: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Academic Press New York–London (1969).

- CLERC, T., und E. PRETSCH: Kernresonanzspektroskopie, 2. Aufl. Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M. (1977).
- FRIEBOLIN, H.: NMR-Spektroskopie, Eine Einführung mit Übungen. Verlag Chemie – Physik Verlag, Weinheim (1974).
- GÜNTHER, H.: NMR-Spektroskopie, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1983).
- HALPAPP, P., und H. SCHÜTZ: Anwendungen der ^1H –NMR-Spektroskopie, (TB 31). Verlag Chemie, Weinheim (1975).
- HAWS, E. J., R. R. HILL, and D. J. MOWTHORPE: The Interpretation of Proton Magnetic Resonance Spectra, A Programmed Introduction. Heyden + Son, Ltd., New York–Rheine (1973).
- JACKMAN, L. M., and S. STERNHELL: Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry. Pergamon Press, Oxford (1969).
- SUHR, H.: Anwendungen der Kernmagnetischen Resonanz in d. org. Chemie, Springer Verlag, Heidelberg–Berlin–New York (1955).
- ZSCHUNKE, A.: Kernmagnetische Resonanzspektroskopie in der org. Chemie, WTB Band 88. Akademie-Verlag, Berlin, Pergamon Press Oxford, Vieweg + Sohn, Braunschweig (1971).

b) ^{13}C –NMR

- BREITMAIER, E., und G. BAUER: ^{13}C -Spektroskopie. Thieme Verlag, Stuttgart (1977).
- BREITMAIER, E., und W. VOELTER: ^{13}C -Spectroscopy, 2. Auflage. Verlag Chemie, Weinheim (1978).
- CLERC, J. T., E. PRETSCH und S. STERNHELL: ^{13}C -Spektroskopie. Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt/M. (1973).
- KALINOWSKI, H. O., S. BERGER und S. BRAUN: ^{13}C –NMR-Spektroskopie. Thieme Verlag, Stuttgart (1984).
- LEVY, G. L., and G. L. NELSON: Carbon-13-Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists. Wiley Interscience New York–London–Sydney–Toronto (1972).

Massenspektrometrie

- BENZ, W.: Massenspektroskopie org. Verbindungen. Akad. Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M. (1969).
- BUDZIKIEWICZ, H., C. DJERASSI and H. D. WILLIAMS: Mass Spectroscopy of Organic Compounds. Holden Day Inc., San Francisco (1967).
- BUDZIKIEWICZ, H.: Massenspektrometrie, Eine Einführung. Verlag Chemie – Physik Verlag, Weinheim (1972).
- KIENITZ, H.: Massenspektroskopie. Verlag Chemie, Weinheim (1968).
- REMANE, H., und R. RITTERZSCHUH: Massenspektroskopie in der org. Chemie. Vieweg Verlag, Braunschweig (1977).
- SEIBL, J.: Massenspektrometrie, 2. Aufl. Akad. Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M. (1977).
- SPITELLER, G.: Massenspektroskopische Strukturanalyse org. Verbindungen. Verlag Chemie, Weinheim (1966).

2 Isolierung und Kennzeichnung von Naturstoffen

2 Isolierung und Kennzeichnung von Naturstoffen

Allgemeines

Naturstoffisolierungen geben einen anschaulichen, praktischen Einblick in die Verfahrenstechniken und führen zu einer Wertschätzung derartiger Produkte. Die Isolierung von Einzelsubstanzen bzw. Wirkstoffen ist in der Regel aufwendig, kostspielig und setzt praktische Erfahrungen voraus. Das gute Gelingen, d. h. die Höhe der Ausbeute an einer sauberen Substanz ist jedoch nicht nur von der Geschicklichkeit und Ausdauer des Bearbeiters abhängig. Es muß auch eine in bezug auf den Gehalt vollwertige Droge zur Verfügung stehen. Oftmals sind für das gute oder schlechte Gelingen Drogenbegleitstoffe mitverantwortlich. Auch die Lagerzeit und -art spielen neben dem optimalen Zerkleinerungsgrad eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang. Vielfach müssen dann auftretende Schwierigkeiten durch Änderungen der Arbeitsweise behoben werden.

Zur Stoffauswahl

Aus der großen Zahl an Möglichkeiten wurden nur solche Stoffe zur Isolierung ausgewählt, die von pharmazeutischem Interesse sind, und deren Gewinnung in ihrem Schwierigkeitsgrad, Aufwand und Zeitbedarf in einem Praktikum realisierbar ist. Hierbei mußten zahlreiche Kompromisse geschlossen und manche interessanten Isolierungen ausgeschlossen werden. Von der nachstehenden Auswahl kann ein Anfänger jeweils 2–3 Isolierungen pro Woche ausführen. Man findet jeweils eine oder mehrere erprobte Isolierungsvorschriften aus den verschiedenen Stoffgruppen (Alkaloide, Glykoside, Anthrachinone, ether. Öle usw.), es wurde ferner Wert darauf gelegt, die verschiedenartigen Isolierungstechniken zu zeigen.

Die Vorschriften lehnen sich z. T. an das Buch von IKAN an, an ein Manuskript von Prof. Dr. H. WAGNER (Institut für Arzneimittellehre, München), an eine ältere Auflage des Buches von WINTERFELD und an Untersuchungen, die im eigenen Arbeitskreise durchgeführt wurden. Sie wurden alle mehrfach überarbeitet und den speziellen Forderungen angepaßt. Weitere Verbesserungen sind sicher möglich.

Zur Organisation (Zielvorstellung)

1. Zu jedem Präparat sollte ein kompletter Geräte- und Chemikaliensatz in einem Kunststoffstapelkasten zur Verfügung gestellt werden, der nach Gebrauch wieder zurückgegeben wird. Meßgeräte (Waagen, Meßzylinder, Pipetten), Rotationsverdampfer, Fraktionssammler und optische Geräte sollten gesondert zur Verfügung gestellt werden.
2. Je 2 Studierende sollten 2–3 Isolierungen gemeinsam in *einer* Arbeitswoche bearbeiten. Bei der Abgabe der Präparate mit beigefügten Protokollen erfolgt zweckmäßigerweise eine Besprechung der aufgetretenen Schwierigkeiten.
3. Neben dem Kursleiter sollte pro 10 Studenten ein Betreuer vorgesehen werden, der über Erfahrungen auf dem Gebiet der Naturstoffisolierungen verfügt, damit er ständig beraten, Fehler korrigieren und Anregungen zu evtl. notwendigen Änderungen geben kann.

Anmerkung: Eine abschließende DC soll die Hinführung zum reinen Naturstoff zeigen, daher sind von den «DC-Lösungen ...» jeweils mindestens 0,5 cm³ für die entsprechende DC aufzubewahren.

Literatur:

IKAN, R.: Natural Products. (Israel Universities Press, Jerusalem (1969)).

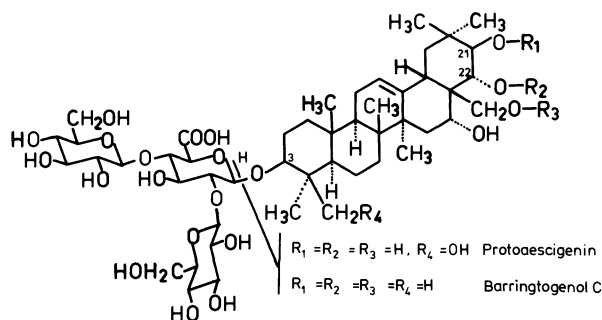
WAGNER, H., und H. GLASL: Phytochemisches Praktikum, 4. verbesserte und ergänzte Ausgabe SS 1974, Manuskript des Instituts für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

WINTERFELD, K.: Einführung in die organisch-präparative Pharmazeutische Chemie, 2. Aufl. Steinkopff, Dresden u. Leipzig (1947).

2.1 Isolierung von Aescin aus geschälten Roßkastaniensamen

Prinzip: Die grobgepulverten, lufttrockenen und geschälten Samen der Roßkastanie (*Aesculus hippocastanum* L.) werden mit Dichlormethan entfettet und anschließend mit verdünntem Methanol mazeriert. Aus dem eingeeengten Extrakt fällt nach Ansäuern und Aufkochen das Aescin aus. Es wird durch Umkristallisation gereinigt.

Strukturformel: Aescin ist ein Gemisch verwandter Saponine, deren Aglyka hauptsächlich diacylierte Derivate von Protoaescigenin und Barringtonenol-C darstellen. Am C-21- β -OH ist der Tiglin- bzw. Angelicasäurerest und am C-22- α -OH ein Acetylrest esterartig gebunden. Die Kohlenhydratkomponente am C-3 wird von einer mit zwei Mol D-Glucose substituierten D-Glucuronsäure gebildet.



R_1 = Angelica- oder Tiglin- oder i-Butter- oder α -Methylbuttersäure-Reste.

R_2 = Acetyl; R_3 = H; R_4 = H bzw. OH.

R_1 = Tiglin- oder Angelica- oder α -Methylbuttersäure-Reste.

R_2 = H; R_3 = Acetyl; R_4 = H bzw. OH.

β -Aescin

Kryptoaescin

Smp: 235°C (ohne Verkohlung).

Chemikalien

Hippocastani semen excoct. pulv. (300),
100 g

Dichlormethan, 700 cm³

Methanol 65proz. (V/V), 550 cm³

Ether, peroxidfrei, 50 cm³

Ethanol 70proz. (V/V), 20 cm³

n-Butanol, 50 cm³

Essigsäure 98proz., 10 cm³

Schwefelsäure 1 N, 50 cm³

Kieselgel DC-Schicht, 20 × 20 cm

Saponin (Merck), 10 mg (Vergleich)

Aescin, 10 mg (Vergleich)

Primulae radix pulv. (300), 1 g

Polygalae radix pulv. (300), 1 g

Geräte

1 Extraktionsapparat nach Soxhlet,
250 cm³ mit Rundkolben, 1000 cm³,

NS 29 und pass. Rückflußkühler

Rundkolben, NS 29, 1000 cm³ (1), 100 cm³ (1)

1 Glasstab, 5 × 300 mm

Bechergläser, 250 cm³ (1), 100 cm³ (1)

1 Erlenmeyer-Kolben, NS 29, 1000 cm³ mit

1 Schliffstopfen, NS 29

1 Glasfiltertrichter, D3, Ø 5 cm

mit pass. Guko zu Saugflasche, 250 cm³

Trichter, Ø 5 cm (2), Ø 10 cm (1)

1 Kristallisierschale, Ø 5 cm

1 Spezialindikatorpapier (pH 0-2,5)

Allgemeine GeräteHeizpilz, 1000 cm³

Magnetrührer mit Heizung und Rührstäbchen

Rotationsverdampfer

DC-Grundausrüstung

Schüttelmaschine

Scheidetrichter, 100 cm³**Reagenzien**

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Durchführung

100 g Hippocastani semen excort. pulv. (300) werden in einer Soxhlet-Extraktionsapparatur 48 h mit 700 cm³ Dichlormethan entfettet. Die Extraktlösung (= DC-Lösung a) wird verworfen. Der Drogenrückstand wird an der Luft getrocknet und anschließend 24 h mit 500 cm³ 65proz. (V/V) Methanol unter häufigem Umschütteln mazeriert. Die überstehende honiggelbe Lösung wird dekantiert und über ein Faltenfilter filtriert. Das klare Filtrat wird am Rotationsverdampfer bis auf 100 cm³ eingengt (= DC-Lösung b). Um ein zu starkes Schäumen beim Einengen zu verhindern, gibt man vor dem Einengen des Filtrates noch die gleiche Menge Methanol hinzu und reguliert das Vakuum entsprechend. Die eingengte Lösung wird in ein Becherglas überführt und tropfenweise mit 1 N-Schwefelsäure auf pH 1,5–2 (Spezialindikatorpapier) gebracht.

Die Lösung wird anschließend langsam unter Rühren zum Sieden erhitzt, wobei sich ein farblos-er Niederschlag von Roh-Aescin bildet. Die Lösung wird 5 min aufgeköcht und *langsam* abkühlen gelassen und schließlich über Nacht bei 4° aufbewahrt. Das ausgefallene Roh-Aescin wird über einen Glasfildertiegel D3 abgesaugt (Mutterlauge = DC-Lösung c) und in 20 cm³ Methanol wieder gelöst. Zu dieser Lösung gibt man so viel Ether, bis gerade eine Trübung entsteht, die beim Aufkochen im Wasserbad wieder verschwindet. Die warme klare Lösung wird abgekühlt und bei 4° über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Das ausgefallene Aescin wird abgesaugt (Mutterlauge = DC-Lösung d) und 12 h im Vakuumexsikkator über Blaugel getrocknet. Gallertartig ausgefallenes Aescin wird in der gleichen Weise getrocknet und wird hierbei zu einem farblosen amorphen Pulver.

Ausbeute: 0,8–1,2 g.*Zeitdauer:* 4–5 Tage.**Auswertung****1. Dünnschicht-Chromatographie***I. Standardmethode:* Ja; Abweichung: Laufstrecke 12 cm.*II. Schicht:* Kieselgel F₂₅₄.*III. Fließmittel:* Oberphase eines Gemisches aus n-Butanol-Eisessig-Wasser (40 + 10 + 50), KS, 12 cm.*IV. Nachweis:* Nach Abdampfen des Fließmittels bei 100–105°:a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren.b) UV₃₆₅: Fluoreszierende Zonen markieren.

c) Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3), 5–10 min auf 105–110° erhitzen.

V. Untersuchungslösung: Bandförmige Auftragung 10 × 3 mm.a) DC-Lösung a 10 mm³.b) DC-Lösung b 10 mm³.c) DC-Lösung c 10 mm³.d) DC-Lösung d 10 mm³.e) Roh-Aescin: 5 mg werden in 0,5 cm³ 70proz. (V/V) Ethanol gelöst, davon 10 mm³ auftragen.

f) Rein-Aescin: wie e)

g) Extrakt von *Primulae radix*: 0,5 g gepulverte Droge (300) werden mit 0,5 cm³ 70proz. (V/V) Ethanol versetzt, von dem Filtrat 10 mm³ auftragen.

h) Extrakt von *Polygalae radix*: wie g).

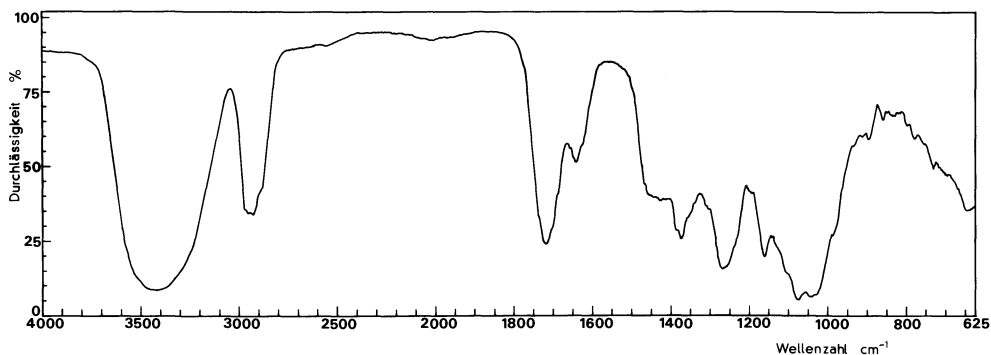
VI. Vergleichslösung

1) 5 mg Saponin (Merck) werden in 0,5 cm³ 70proz. (V/V) Ethanol gelöst.

2) 5 mg Aescin, Handelsprodukt, werden in 0,5 cm³ 70proz. (V/V) Ethanol gelöst.

Von den Lösungen 1 und 2 werden je 10 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) aufgetragen.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Aescins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Aescin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3420	–OH	OH-Streckschwingung
2960–2920	–CH ₃ , >CH ₂ und $\begin{array}{c} \\ -C-H \end{array}$	CH-Streckschwingung
1720	>C=O	C=O-Streckschwingung
1390–1370	–CH ₃ und –OH	sym. CH-Beugeschwingung und assoz. OH-Beugeschwingung
1265	Ester (Acetat) und –OH	CO-Streckschwingung und C–CO–O-Gerüstschwingung freie OH-Beugeschwingung
1160, 1070–1020	$\begin{array}{c} \\ -C-OH \text{ und Ether} \end{array}$	CO-Streckschwingung

3. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Aescins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

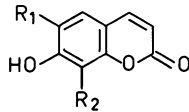
- Welche Grundtypen von Saponinen unterscheidet man und wozu gehört das Aescin?
- Welche Eigenschaften sind für Saponine zumeist typisch?
- Nenne weitere Saponindrogen und ihre Verwendung.
- Was versteht man unter α - und β -Aescin?
- Welche Wertbestimmungsmethoden für Saponin-Drogen gibt es?

2.2 und 2.3 Isolierung von Aesculin und Fraxin aus Roßkastanienrinde

Prinzip: Gepulverte Roßkastanienrinde (*Aesculus hippocastanum* L.) wird zunächst zur Entfernung der lipophilen Inhaltsstoffe mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Drogenrückstand wird dann zur Gewinnung der Hauptmenge an Aesculin und Fraxin mit Aceton ausgezogen. Aus dem eingeeengten Acetonextrakt wird durch Umkristallisation ein Feststoffgemisch erhalten, das hauptsächlich aus Aesculin und Fraxin besteht. Aus diesem Gemisch werden die beiden Cumarine säulenchromatographisch getrennt.

Gehalt: Aesculin 3 % Fraxin 0,8 %

Strukturformel



$R_1 = -\beta\text{-Glucosyl}$

$R_2 = \text{H}$

Aesculin

$R_1 = \text{OCH}_3$

$R_2 = -\beta\text{-Glucosyl}$

Fraxin

Aesculin (6,7-Dihydroxycoumarin-6- β -glucosid)

$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_9$ MG 340,29

Smp: 1,5 H_2O : 152–154°C

Smp. der danach erstarrten Schmelze: 213°C

Fraxin (6-Methoxy-7,8-dihydroxycoumarin-8- β -glucosid)

$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ MG 370,32

Smp: wasserhaltig: 150°C

wasserfrei: 207°C

Chemikalien

Hippocastani cortex pulv. (350), 30 g

Essigsäureethylester, 1200 cm^3

Aceton, 250 cm^3

Methanol, 500 cm^3

Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 180 g

Seesand, 20 g

Aktivkohle, 200 mg

DC-Schichten, Kieselgel F_{254}

Allgemeine Geräte

Rotationsverdampfer

Fraktionssammler mit Zubehör

Vakuumpistole

Wasserbad

DC-Grundausrüstung

Geräte

1 Extraktionsapparat nach Soxhlet,

150 cm^3 mit Rundkolben, NS 29, 250 cm^3

3 Rundkolben, NS 29, 250 cm^3

Bechergläser, 150 cm^3 (2),

100 cm^3 (2), 50 cm^3 (2)

Trichter, Ø 6 cm und 5 cm, je 2

1 Büchnertrichter, Ø 5 cm mit Saugflasche,

100 cm^3 und passendem Guko

2 Glasfiltertrichter, D3, Ø 5 cm, mit pass.

Guko zu 2 Saugflaschen, 250 cm^3

1 Chromatographiesäule, $l = 120$ cm,

Ø_i = 2,5 cm

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Durchführung

a) *Isolierung des Rohprodukts, eines Gemischs aus Aesculin und Fraxin*

30 g Hippocastani cortex pulv. (350) werden mit 200 cm^3 Essigsäureethylester in einer Soxhlet-apparatur 1 h extrahiert. Der Essigsäureethylesterextrakt (= DC-Lösung a) wird verworfen, obwohl schon darin Aesculin und Fraxin in geringen Mengen enthalten sind.

Menge des eingeeengten Extrakts: 400–500 mg

Der Drogenrückstand wird in der gleichen Apparatur mit 200 cm^3 Aceton 5 h weiter extrahiert.

Der Acetonextrakt (= DC-Lösung b) wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt.

Man erhält einen braungelben, sirupartigen Rückstand von ca. 6 g^{*)}. Dieser Rückstand wird mit

^{*)} Dieser Extrakt kann auch direkt zur SC verwendet werden.

gerade so viel eines Gemischs aus Essigsäureethylester-Wasser-Methanol (75 + 10 + 15) (ca. 20–30 cm³) versetzt, bis er sich im siedenden Wasserbad gerade auflöst. Zur Entfernung der Siedesteine wird die heiße Lösung über einen Glaswattebausch filtriert. Schon beim Abkühlen der Lösung scheidet sich ein bräunlich-gelber, kristalliner Niederschlag aus, der nach ca. 3 h Stehenlassen bei Zimmertemperatur über einen Büchnertrichter abgesaugt wird (Niederschlag: 2 mg in 1 cm³ Methanol = DC-Lösung c). Aus der Mutterlauge (Verdünnung 1:10 in Methanol = DC-Lösung d) scheiden sich nach längerem Stehenlassen weitere Kristalle aus.

Ausbeute: 1,3–1,7 g

b) Säulenchromatographie

Allgemeine Durchführung: siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 2,5$ cm

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 180 g

Elutionsmittel: Essigsäureethylester-Methanol-Wasser (75 + 15 + 10), 1000 cm³

Essigsäureethylester-Methanol-Wasser (60 + 25 + 25), 200 cm³

Aufgabemenge: 1,4 g des Cumaringemischs werden in 20 cm³ Methanol unter leichtem Erwärmen auf dem Wasserbad gelöst und auf die stationäre Phase gegeben. – Eine Suspensionsbildung der Auftragslösung beim Abkühlen beeinflusst die sc Trennung nicht –. Hat sich ein Niederschlag auf der Seesandschicht abgesetzt, wird dieser mit einer weiteren Seesandschicht von ca. 0,5 cm abgedeckt, bevor mit der Elutionsmittelaufgabe begonnen wird.

Tropfgeschwindigkeit: 1–2 Tropfen/s.

Fraktionen: ca. 15 cm³

Ungefähr ab der 30. Fraktion läßt sich Aesculin als Hauptkomponente und in den folgenden 10 Fraktionen nachweisen. Aus diesen fällt es z. T. als farblose Kristalle aus. Nach ca. 5-stündigem Stehenlassen der Fraktionen wird das ausgefallene Aesculin über einen Glasfiltertrichter abgesaugt, mit ca. 2 cm³ Essigsäureethylester gewaschen und anschließend mit 5 cm³ Ether nachgewaschen und an der Luft getrocknet.

Ausbeute: ca. 200 mg

Die vereinigten Mutterlaugen dieser Fraktionen werden am Rotationsverdampfer bis zu einem Volumen von ca. 30 cm³ eingeeengt, daraus scheidet sich beim Stehenlassen weiteres Aesculin ab.

Ausbeute: ca. 250 mg

Auch aus den folgenden Fraktionen, die neben der Hauptkomponente Aesculin schon Fraxin in geringen Mengen enthalten, scheidet sich Aesculin ab, das über einen Glasfiltertrichter abgesaugt wird.

Ausbeute: ca. 50 mg

Die Mutterlauge wird nicht weiter aufgearbeitet.

Fällt ein bräunliches Produkt aus den oben eingeeengten Mutterlaugen an, so kann eine Umkristallisation erfolgen: 100 mg des Produkts werden mit 6 cm³ Methanol auf dem siedenden Wasserbad aufgelöst. Nach Abkühlen wird die Lösung mit ca. 50 mg Aktivkohle versetzt und aufgekocht. Das Filter und der Filtrückstand werden mit 1 cm³ siedendem Methanol nachgespült. Das farblose Filtrat wird mit 5 cm³ Essigsäureethylester versetzt und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach ca. 2 h beginnt die Kristallisation von Aesculin. Nach 8 h wird über einen Glasfiltertrichter abgesaugt, mit Ether (s. o.) nachgespült und an der Luft getrocknet.

Mischfraktionen, in denen beide Substanzen, der Zonengröße nach zu urteilen im Verhältnis von 9:1 bis zu 1:9, vorliegen (ca. 10 Fraktionen), werden nicht weiter aufgearbeitet.

Ungefähr ab der 55. Fraktion ist Fraxin die Hauptkomponente neben wenig Aesculin. Diese Fraktionen (ca. 20) werden am Rotationsverdampfer eingeeengt. Es wird eine gelbliche Festsubstanz erhalten, die fast ausschließlich aus Fraxin besteht.

Ausbeute: ca. 500 mg

Durch Umkristallisation aus ca. 7 cm³ Methanol und Abkühlenlassen der Lösung im Kühlschrank bei 4°C wird kristallines, dc-reines Fraxin erhalten.

Ausbeute: 120 mg (nach 3 h).

Aus der Mutterlauge kristallisiert noch weiteres Fraxin aus. Dieses noch lösungsmittelhaltige Produkt wird in der Vakuumpistole 6 h bei 110°C getrocknet (0,2 Torr). Eine Trocknung von Aesculin gelingt auf diese Weise nicht.

Zeitbedarf: 3–4 Tage

c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode:* ja

II. *Schicht:* Kieselgel F₂₅₄

III. *Fließmittel:* Essigsäureethylester-Methanol-Wasser (75 + 15 + 10), KS, 10 cm

IV. *Nachweis:*

a) UV₃₆₅: Fluoreszierende Zonen markieren; Aesculin im mittleren R_f-Bereich fluoresziert hellblau, Fraxin liegt direkt darunter und fluoresziert türkisfarben.

b) Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr.3), 5–10 min auf 110°C. Aesculin und Fraxin färben sich graublau an.

V. *Untersuchungslösung* (SC-Trennung)

a) DC-Lösung b, 5 mm³ bandförmig (10 × 2 mm)

b) Ab Fraktion 10, von jeder 2. Fraktion 3 mm³ punktförmig

VI. *Vergleichslösung:* Je 2 mg Aesculin und Fraxin werden in je 1 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 5 mm³ bandförmig (10 × 2 mm) oder 2 mm³ punktförmig auf.

Auswertung

1. *Abschließende DC*

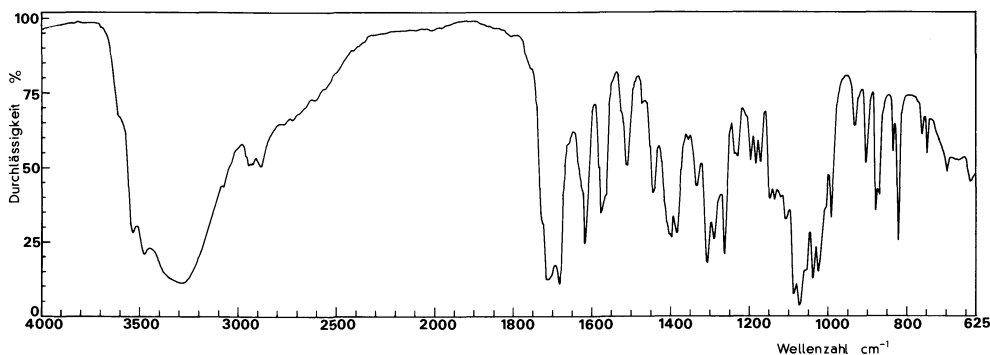
I–IV und VI wie bei c)

V. *Untersuchungslösung:* bandförmige Auftragung (10 × 2 mm)

a–d) Von den DC-Lösungen a–d je 5 mm³

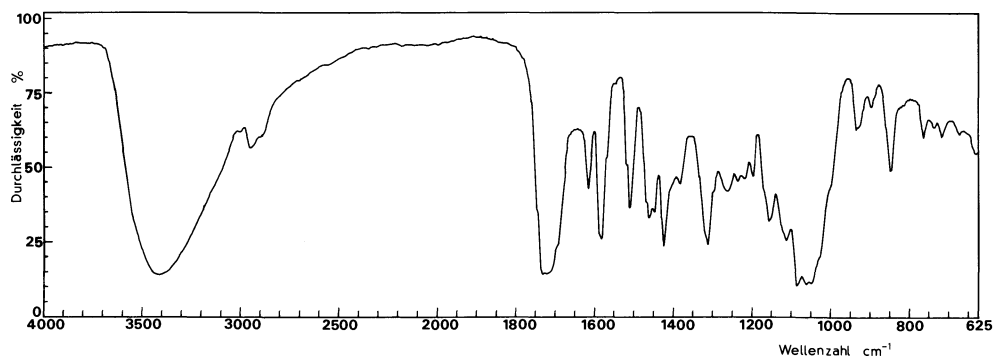
e–f) Von jeder Charge Aesculin und Fraxin werden je 2 mg in je 1 cm³ Methanol gelöst. Von den anfallenden Mutterlaugen werden 0,1 cm³ mit Methanol auf 1,0 cm³ verdünnt und davon je 5 mm³ aufgetragen.

2. Die *IR-Spektren* des isolierten Aesculins und des Fraxins sind aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Aesculin (1,5 mg/200 mg Kaliumbromid)

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3410	–OH des Zuckerrests	OH-Streckschwingung
2900	CH	CH-Streckschwingung
1690–1730 (Dublett)	$>\text{C}=\text{O}$ in conj. δ -Lactonring	C=O-Streckschwingung
1620	–C=C-konj. zu C=O	C=C-Streckschwingung
1580, 1520	Aromat	CC-Streckschwingung



IR-Spektrum von Fraxin (1,5 mg/200 mg Kaliumbromid)

Vergleiche die Daten von Aesculin!

3. Die *UV-Spektren* von Aesculin und Fraxin sind aufzunehmen (je 2 mg Aesculin und Fraxin) werden in je 100 cm^3 Methanol gelöst.

Aesculin $\lambda_{\text{max}} = 227 \text{ nm}$ ($\epsilon = 16.000$)
 $\lambda_{\text{max}} = 251 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5.500$)
 $\lambda_{\text{max}} = 298 \text{ nm}$ ($\epsilon = 7.400$)
 $\lambda_{\text{max}} = 338 \text{ nm}$ ($\epsilon = 14.500$)

Fraxin $\lambda_{\text{max}} = 231 \text{ nm}$ ($\epsilon = 14.100$)
 $\lambda_{\text{sh}} = 310 \text{ nm}$ ($\epsilon = 6.100$)
 $\lambda_{\text{max}} = 347 \text{ nm}$ ($\epsilon = 10.000$)

4. Die *Schmelzpunkte* der isolierten Substanzen sind zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

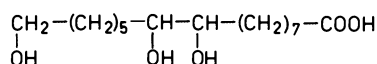
- Geben Sie Naturstoffe an, die eine Furanocumarinstruktur aufweisen. In welchen Pflanzen sind diese enthalten; welche Eigenschaften weisen Furanocumarine in Kontakt mit der Haut und unter Lichteinwirkung auf?
- Welche Pyranocumarine kommen in welcher Pflanze vor?
- Warum werden Hydroxy- und Methoxycumarine, insbesondere das Aesculin, Sonnenschutzpräparaten zugesetzt?
- Welche Struktur hat Dicumarol und welche pharmakologischen Eigenschaften weist die Substanz auf?
- Begründen Sie das Auftreten des Cumaringeruchs beim Trocknen von Gras («Heugeruch»)!
- Nennen Sie weitere Naturstoffe mit einer Cumarinteilstruktur, die nicht zu a) und b) gehören, z. B. ein Antibiotikum und hochtoxische Substanzen aus Schimmelpilzen.

2.4 Isolierung von Aleuritinsäure aus Schellack (Lacca)

Prinzip: Gepulverter Schellack (= das durch Raffination gereinigte, ausgeschiedene Sekret der weiblichen Schildlaus *Tachardia lacca* KERR (Synonym: *Lakschadia indica* MADIHASSAN) wird mit Kaliumhydroxid verseift. Aus der danach angesäuerten Lösung fällt Aleuritinsäure aus, die aus Essigsäureethylester unter Aktivkohlezusatz umkristalliert wird.

Gehalt: ca. 30 %

Strukturformel



Aleuritinsäure (9,10,16-Trihydroxy-palmitinsäure)
C₁₆H₃₂O₅, MG 304,4; Smp: 100–102 °C

Chemikalien

Lacca, pulv. (300), 5 g
Methanol, 20 cm³
Essigsäure, 20proz. (G/V), ca. 5 cm³
Essigsäureethylester, 80 cm³
n-Hexan, 1 cm³
Kaliumhydroxidlösung, ca. 2 N, 20 cm³
Natriumsulfat, sicc.
Aktivkohle
DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄ 20 × 20 cm
Toluol, 85 cm³
n-Propanol, 15 cm³
Eisessig, 1 cm³

Geräte

Rundkolben, NS 29, 100 cm³
Rückflußkühler, NS 29
Büchnertrichter, Ø 5 cm mit pass. Guko
zu Saugflasche, 100 cm³
1 Glasfiltertrichter, D3 Ø 5 cm mit pass.
Guko zu Saugfinger, 20 cm³
Bechergläser: 50 cm³ (2), 100 cm³ (2), 20 cm³ (1)
Trichter Ø 4 cm (2)

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Allgemeine Geräte

Wasserbad
Magnetrührer mit Stäbchen (5 cm)
Rotationsverdampfer
DC-Grundausrüstung
pH-Spezialindikatorpapier

Durchführung

5 g gepulverter (300) Schellack werden in einem 100 cm³-Rundkolben mit 20 cm³ Methanol unter Schwenken auf dem Wasserbad versetzt und erwärmt, bis eine klare Lösung entstanden ist (= DC-Lösung a). Diese Lösung wird mit 20 cm³ einer ca. 2 N Kaliumhydroxid-Lösung versetzt und auf dem Wasserbad 15 min unter Rückfluß gekocht (= DC-Lösung b). Anschließend wird unter Erhitzen auf dem Wasserbad das Methanol vollständig verdampft (ca. 1–2 h). Die **erkaltete** Lösung wird langsam mit 20proz. (G/V) Essigsäure neutralisiert und mit 40 cm³ Wasser verdünnt (= DC-Lösung c).

Danach säuert man tropfenweise weiter mit 20proz. Essigsäure an, bis zum pH von 5,5 (= DC-Lösung d), gibt 1 g Aktivkohle hinzu und kocht unter Rühren auf dem Wasserbad kurz auf. Die heiße Lösung wird über ein hartes Filterpapier durch einen Büchnertrichter abgesaugt. (Vorsicht, eventuell Schaumbildung!) Das Filtrat (= DC-Lösung e) wird in ein 100 cm³-Becherglas überführt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Spätestens nach 2 Tagen setzt sich am Boden des Becherglases eine geringe Menge Harz ab und darüber bildet sich eine milchig-trübe Masse von Aleuritinsäure. Die trübe Suspension wird über einen

Büchnertrichter abgesaugt. Der Filtrerrückstand wird auf dem siedenden Wasserbad mit gerade so viel Essigsäureethylester versetzt, bis er sich gerade auflöst; man gibt ca. 200 mg Aktivkohle und 1–2 g wasserfreies Natriumsulfat hinzu, kocht kurz auf und filtriert über ein hartes Filterpapier. Zum klaren Filtrat gibt man einige Tropfen n-Hexan hinzu. Beim Stehenlassen bei Raumtemperatur fällt reine Aleuritinsäure aus. Gegebenenfalls muß noch einmal umkristallisiert werden. Die ausgefallene Aleuritinsäure wird über einen Glasfiltertrichter D3 abgesaugt, mit wenig n-Hexan gewaschen und an der Luft getrocknet. Mutterlauge (= DC-Lösung f).

Ausbeute: ca. 250 mg

Zeitbedarf: 3 Tage

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. *Standardmethode*: ja, Abweichung: Zweifachentwicklung

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄

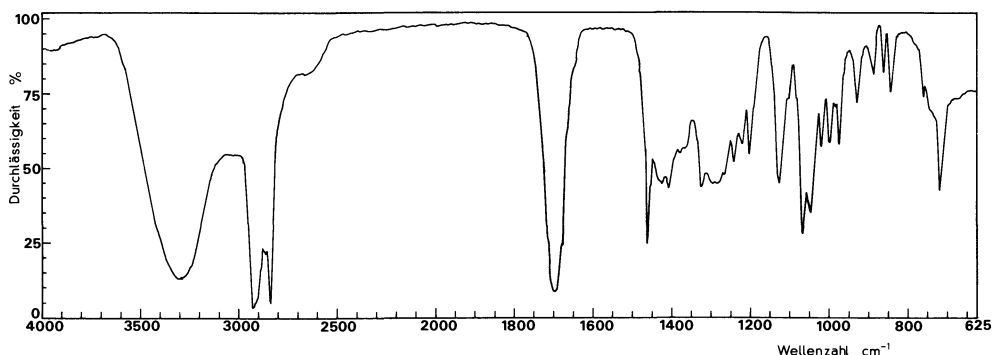
III. *Fließmittel*: Essigsäureethylester-Chloroform-Methanol-Eisessig (60 + 32 + 8 + 1), KS, 2 × 10 cm

IV. *Nachweis*: Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) 5–10 min auf 105 °C erhitzen (Aleuritinsäure im mittleren R_f-Bereich färbt sich grau-violett-braungrau an)

V. *Untersuchungslösung*: Je 5 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) DC-Lösungen a–f

VI. *Vergleichslösung*: 5 mm³ einer 0,2proz. (G/V) Lösung von Aleuritinsäure in Essigsäureethylester

2. Das IR-Spektrum der isolierten Aleuritinsäure ist aufzunehmen und mit dem abgebildeten Spektrum zu vergleichen.



IR-Spektrum von Aleuritinsäure (2 mg/200 mg Kaliumbromid)

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3300	–OH	OH-Streckschwingung
2920 u. 2840	>CH ₂	CH-Streckschwingung
2670	–OH	gebundene OH-Streckschwingung
1700	>C=O	C=O-Streckschwingung
1465	>CH ₂	CH-Beugeschwingung
1400	–OH	OH-Beugeschwingung
1300	C–O	CO-Streckschwingung

3. Der *Schmelzpunkt* der isolierten Aleuritinsäure ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

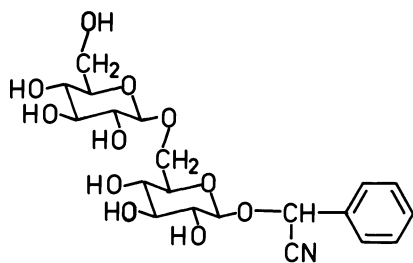
- Was ist Schellack, woraus wird er gewonnen?
- Wie ist Schellack chemisch aufgebaut?
- Wozu wird Schellack verwendet?

2.5 Isolierung von Amygdalin aus bitteren Mandeln

Prinzip: Gepulverte bittere Mandeln (*Prunus amygdalus* BATSCH var. *amara* (DC.) FOCKE) werden mit Dichlormethan entfettet; aus dem Drogenrückstand wird das Amygdalin mit heißem Ethanol extrahiert und aus dem eingeeengten Extrakt mit Ether ausgefällt.

Gehalt: 3–5%.

Strukturformel



Amygdalin (D(-)-Mandelsäurenitril-(=Benzaldehydcyanhydrin)- β -gentiobiosid)
 $C_{20}H_{27}O_{11}N$ MG 457,4 Smp: 125–130°C $[\alpha]_D^{11} = -41^\circ$ ($c = 1$, in Wasser)

Aus wäßrigen Lösungen auskristallisiertes und wasserfreies Amygdalin zeigt einen Schmelzpunkt von 215–220°C, der nach dem Wiedererhitzen der erstarrten Schmelze auf 125–130°C fällt.

Chemikalien

Amygdalae amarae semen, pulv. (710), 50 g
 Dichlormethan, 500 cm³
 Ethanol, 96proz. (V/V), 750 cm³
 Ether, wasser- und peroxidfrei, 100 cm³
 Aceton, 100 cm³
 Essigsäure, 10 cm³
 n-Butanol, 40 cm³
 2N-Schwefelsäure, 2 cm³
 Natriumhydrogencarbonat, 5 g
 Natriumsulfat, wasserfrei, 5 g
 Kaliumhydrogensulfat, 5 mg
 DC-Schichten: Kieselgel F₂₅₄
 10 × 20 und 20 × 20 cm
 Amygdalin, 5 mg (Vergleich)
 Gentiobiose, 5 mg (Vergleich)
 Glucose, 5 mg (Vergleich)
 Benzaldehyd, 10 mm³ (Vergleich)

Geräte

Extraktionsapparatur nach Soxhlet,
 150 cm³, mit Rundkolben NS 29; 500 cm³
 1 Zweihals-Rundkolben, NS 29, 500 cm³
 Calciumchlorid-Rohr, NS 29
 Rundkolben, NS 29: 250 cm³ (1), 100 cm³ (1)
 1 Rückflußkühler, NS 29
 Bechergläser, 150 cm³ (1), 100 cm³ (1)
 1 Büchner-Trichter, Ø 12 cm mit
 pass. Guko zu Saugflasche, 500 cm³
 1 Glasfiltertrichter, D 3, Ø 4 cm,
 mit pass. Guko zu Saugrohr, 20 cm³
 Trichter: Ø 5 cm (1), Ø 4 cm (1)
 1 Kristallisierschale, Ø 4 cm

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)
 o-Dianisidin (Reag. Nr. 6)

Allgemeine Geräte:Heizpilze, 500 cm³, 100 cm³

Wasserbad

KPG-Rührer mit Motor

Rotationsverdampfer

pH-Papier

Exsikkator

TAS-Ofen mit Zubehör

DC-Grundausrüstung

Durchführung

50 g bittere Mandeln werden unzerkleinert 3 h im Trockenschrank auf 105 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden die Samen pulverisiert (710) und mit 400 cm³ Dichlormethan in einer Soxhlet-Apparatur 24 h extrahiert. Die Extraktlösung (= DC-Lösung a) wird verworfen. Zur Entfernung des anhaftenden Dichlormethans wird der Drogenrückstand auf einer Wärmeplatte bei 50 °C (Abzug!) ausgebreitet. Der lufttrockene Drogenrückstand wird in einem 500 cm³ Zweihals-Rundkolben mit 300 cm³ 96proz. (V/V) Ethanol 2 h unter Rückfluß gekocht. Die noch heiße Suspension wird durch einen Büchner-Trichter abgesaugt (Vorsicht: Schäumen) und das Filtrat (= DC-Lösung b) portionsweise in einem 250 cm³ Rundkolben am Rotationsverdampfer bis zu einem Volumen von ca. 10 cm³ eingengt. – Zur Erhöhung der Ausbeute an Rohamygdalin kann der Drogenrückstand in der gleichen Weise noch einmal mit 300 cm³ 96proz. (V/V) Ethanol extrahiert werden. – Nach dem Erkalten setzt man dem eingengten Filtrat ca. 5 cm³ Ether hinzu. Das ausgefallene Rohamygdalin wird über einen Glasfiltertrichter abgesaugt und mehrmals mit wenig Ether gewaschen (Mutterlauge = DC-Lösung c).

Ausbeute an Rohamygdalin: ca. 2 g.

Das gelbliche Rohamygdalin wird in ca. 50 cm³ 96proz. (V/V) Ethanol unter Erhitzen auf dem Wasserbad gelöst. Die klare, gegebenenfalls filtrierte Lösung wird über Nacht in den Kühlschrank bei 4° gestellt. Danach wird das ausgefallene fast farblose Amygdalin über einen Glasfiltertrichter abgesaugt. – Aus der Mutterlauge kann durch Stehenlassen im Tiefkühlfach eines Kühlschranks die Ausbeute an Amygdalin erhöht werden.

Ausbeute der 1. Kristallisation ca. 1 g; *Ausbeute* der 2. Kristallisation ca. 0,4 g. Enthält das Produkt nach der dc Analyse noch geringe Mengen an Glucose und Gentiobiose, wird erneut in der gleichen Weise umkristallisiert (Herstellung einer bei 75 °C gesättigten Lösung vom isolierten Produkt in 96proz. (V/V) Ethanol). Das ebenfalls über einen Glasfiltertrichter abgesaugte Produkt der 2. Umkristallisation wird mit ca. 5 cm³ Ether gewaschen und anschließend im Vakuumexsikkator getrocknet.

Ausbeute: 0,7 g.

Zeitbedarf: 1,5 Tage.

Auswertung**1. Dünnschicht-Chromatographie**

I. *Standardmethode*: Ja.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: Oberphase von Wasser-n-Butanol-Essigsäure (50 + 40 + 10), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis*: Nach Abdampfen des Fließmittels, besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) und anschließend 5–10 min auf 110° erhitzen (Amygdalin hRf = 30, Glucose hRf = 20, Gentiobiose hRf = 5 färben sich graublau an).

V. *Untersuchungslösung*: bandförmige Auftragung (10 × 3 mm)

a) DC-Lösung a, 10 mm³.

b) DC-Lösung b, 10 mm³.

c) Roh-Amygdalin: 5 mg werden in 0,5 cm³ Ethanol-Wasser (1:1) gelöst, davon werden 5 mm³ aufgetragen.

d) DC-Lösung c: 5 mm³.

e) Rein-Amygdalin: wie Roh-Amygdalin.

f) DC-Lösung d (= Hydrolysat, siehe: Hydrolyse 2, Va).

VI. *Vergleichslösung*: bandförmige Auftragung (10 × 3 mm).

a) Amygdalin, 5 mg	} werden in je 1,0 cm ³ Ethanol-Wasser (1 + 1) gelöst, davon werden je 5 mm ³ aufgetragen.
b) Gentiobiose, 5 mg	
c) Glucose, 5 mg	

2. Hydrolytische und thermische Spaltung von Amygdalin (Nachweis von Benzaldehyd)

DC-Bedingungen

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Dichlormethan, KS.

IV. Nachweis

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren; Benzaldehyd im oberen Drittel des Chromatogramms zeigt Fluoreszenzminderung.

b) Besprühen mit o-Dianisidin (Reag. Nr. 14). Die Benzaldehydzone färbt sich gelb.

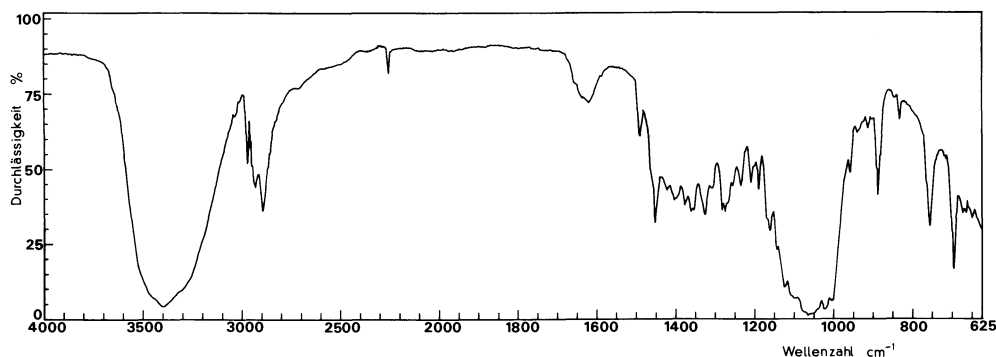
V. Untersuchungslösung:

a) Hydrolyse: 20 mg Amygdalin werden mit 2 cm³ 2N-Schwefelsäure in einem Reagenzglas 10 min auf dem Wasserbad erhitzt. Die Lösung wird mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und danach dreimal mit je 2 cm³ Ether ausgeschüttelt. Die überstehenden Etherphasen werden jeweils abpipettiert, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und auf dem Wasserbad auf ca. 0,2 cm³ eingengt, davon werden 10 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) aufgetragen. (= DC-Lösung d, vgl. Auswertung Punkt 1).

b) TAS-Verfahren: 5 mg Amygdalin und 10 mg Kaliumhydrogensulfat werden gut gemischt, 1 Kügelchen Molekularsieb, 4 Å (0,4 nm), wasserdampfgesättigt, 250°, 90 s.

VI. Vergleichslösung: 1 mm³ Benzaldehyd wird in 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man 5 mm³ bandförmig auf (10 × 3 mm).

3. Das IR-Spektrum des isolierten Amygdalins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Amygdalin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3400	–OH	OH-Streckenschwingung
2965–2890	>CH_2 und $\text{–}\overset{ }{\text{C}}\text{–H}$	CH-Streckschwingung
2250	–CN	CN-Streckschwingung
1652–1616	Aromat	CC-Streckschwingung
1490	Aromat	CC-Streckschwingung
1450–1360	Aromat und –OH	CC-Streckschwingung und assoz. OH-Beugeschwingung
1235	–OH	freie OH-Beugeschwingung
1105	Ethergruppen	asym. CO-Streckschwingung
1080–988	$\text{–}\overset{ }{\text{C}}\text{–OH}$	CO-Streckschwingung
758–700	monosubst. Aromat	CH-Beugeschwingung

4. Das *UV-Spektrum* des isolierten Amygdalins ist aufzunehmen (15 mg Amygdalin in 25,0 cm³ Ethanol-Wasser (1 + 1).

$$\lambda_{\max} = 252 \text{ nm } (\epsilon = 1852).$$

$$\lambda_{\max} = 258 \text{ nm } (\epsilon = 2700).$$

$$\lambda_{\max} = 263 \text{ nm } (\epsilon = 2845).$$

$$\lambda_{\max} = 269 \text{ nm } (\epsilon = 1945).$$

5. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Amygdalins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

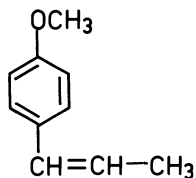
- Wie sind die natürlichen Blausäureglykoside chemisch aufgebaut? – Nenne die verschiedenen Blausäureglykoside; in welchen Pflanzen (Stammpflanze, Familie) kommen sie vor?
- Welches ist die biogenetische Ausgangssubstanz der Benzaldehydcyanhydringlykoside?
- Welche Gefahr bilden «bittere Mandeln»? – Nenne die Zusammenhänge.
- Welche Disaccharide kennen Sie, die aus 2 Molekülen Glucose aufgebaut sind? – Geben Sie die unterschiedlichen Verknüpfungen an.

2.6 und 2.7 Isolierung von Anethol und Fenchon aus Fenchelfrüchten

Prinzip: Gewinnung des etherischen Öls aus zerkleinerten Fenchelfrüchten (*Foeniculum vulgare* MILLER var. *vulgare*) durch Wasserdampfdestillation, anschließend säulenchromatographische Auftrennung des etherischen Öles an Kieselgel als stationärer Phase.

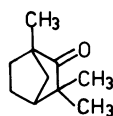
Gehalt: Eth. Öl 4–6 % (V/G), darin: 50–60 % Anethol und 10–20 % Fenchon

Strukturformeln



Anethol

C₁₀H₁₂O, MG 148,1, Smp: 21–23 °C;



Fenchon

C₁₀H₁₆O, MG 152,2, Smp: 5–6 °C

Sdp: 195 °C

d – [α]_D²⁰ = +72°, l – [α]_D²⁰ = –67°
(c = 1 in Ethanol)

Chemikalien

Foeniculi fructus, pulv. (710), 50 g
Pentan, 20 cm³
Petrolether (40–60°), 500 cm³
Dichlormethan, 700 cm³
Essigsäureethylester, 300 cm³
Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 100 g
Seesand, 20 g
DC-Schichten: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
Anethol, 10 mm³ (Vergleich)
Fenchon, 10 mm³ (Vergleich)

Geräte

Apparatur zur Gehaltsbestimmung von eth. Ölen in Drogen nach Ph. Eur.
Rundkolben, NS 29: 1000 cm³ (1) 250 cm³ (2)
2 Spritzkolben, NS 14,5, 10 cm³
mit Stopfen NS 14,5
2 Trichter, Ø 5 cm
2 Mikrofilternutschen, 2 cm³
1 eth. Ölkölbchen, 5 cm³
1 Chromatographiesäule, l = 120 cm, Ø_i = 1,5 cm

Reagenzien

Molybdätosphorsäure (Reag. Nr. 21).

Kaliumpermanganat-Schwefelsäure (Reag. Nr. 19)

Allgemeine GeräteHeizpilz, 1000 cm³

Wärmeplatte bis 60 °C

Rotationsverdampfer

Fraktionssammler mit Zubehör

DC-Grundausrüstung

Durchführung**A. Gewinnung des etherischen Öles**

50 g frisch gepulverte Fenchelfrüchte werden mit 600 cm³ Wasser versetzt und 4 h einer kontinuierlichen Wasserdampfdestillation unterzogen. Als Vorlage werden 2 cm³ Pentan eingesetzt. Das etherische Öl-Pentan-Gemisch wird wasserfrei abgelenkt und auf einer Wärmeplatte bei 50 °C vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 2–3 g.

B. Säulenchromatographie

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 1,5$ cm.

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC, 0,063–0,2 mm, 100 g.

Elutionsmittelfolge

200 cm³ Petrolether (40–60 °)

200 cm³ Petrolether (40–60 °) – Dichlormethan (75 + 25).

100 cm³ Petrolether (40–60 °) – Dichlormethan (50 + 50).

100 cm³ Petrolether (40–60 °) – Dichlormethan (25 + 75).

200 cm³ Dichlormethan.

200 cm³ Dichlormethan-Essigsäureethylester (75 + 25).

Aufgabenmenge: 1,5 g eth. Öl.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Fraktionen: ca. 10 cm³.

C. Dünnschicht-Chromatographie

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Dichlormethan, KS, 10 cm.

IV. Nachweis:

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Anethol ist im oberen Drittel des Chromatogramms als fluoreszenzmindernde Zone zu erkennen).

b) Besprühen mit Molybdätosphorsäure (Reag. Nr. 21) bis der Untergrund deutlich gelb ist, 5–10 min bei 110 °C erhitzen (Zonen markieren) und auf die heiße DC-Schicht Kaliumpermanganat-Schwefelsäure (Reag. Nr. 19) nachsprühen. (Die Anethol-Zone im oberen Drittel des Chromatogramms färbt sich schon nach kurzem Erhitzen blau auf gelbem Untergrund. Nach dem Nachsprühen wird der Untergrund farblos, und es tritt im mittleren R_f-Bereich die sich hellblau anfärbende Zone des Fenchons auf.)

V. Untersuchungslösung: Punktförmige Auftragung

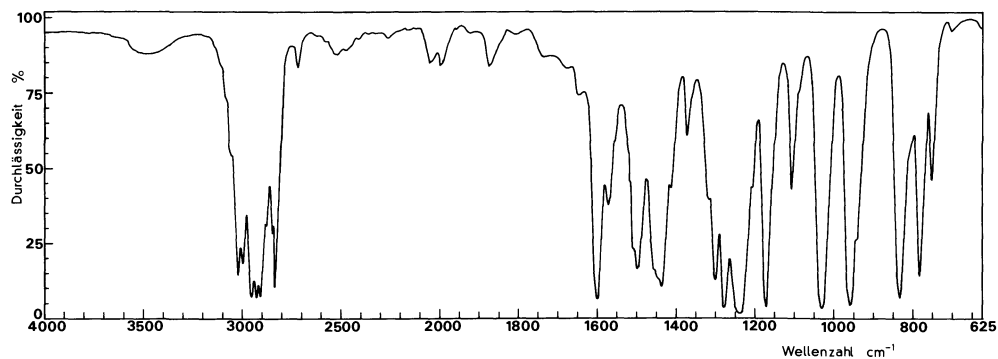
a) 10 mm³ eth. Öl werden in 2,0 cm³ Chloroform gelöst, davon 5 mm³

b) Ab Fraktion 10 von jeder Fraktion 5–10 mm³.

VI. Vergleichslösung: Je 2 mm³ Anethol und Fenchon werden in je 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man je 5 mm³ punktförmig auf.

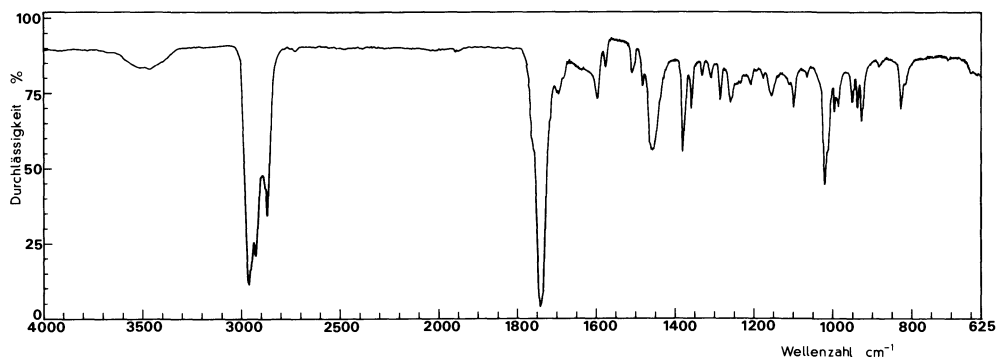
Auswertung

1. Es sind die *IR-Spektren* des isolierten Anethols und des isolierten Fenchons aufzunehmen, mit den abgebildeten Spektren und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen:



IR-Spektrum von Anethol (als Film zwischen Kaliumbromid-Preßlingen).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3020, 3000	$-\text{C}=\text{C}-$ und Aromat	CH-Streckschwingung
2960–2910	$-\text{CH}_3$	CH-Streckschwingung
2835	$-\text{OCH}_3$	CH-Streckschwingung
1600, 1500	Aromat	CC-Streckschwingung
1450	$-\text{CH}_3$	asym. CH-Beugeschwingung
1430	$-\text{OCH}_3$	asym. CH-Beugeschwingung
1232	aromat-aliphat. Ether	asym. CO-Streckschwingung
1040	aromat-aliphat. Ether	sym. CO-Streckschwingung
960	disubst. Doppelbind.	CH-Beugeschwingung
835	Subst. am Aromat, para	CH-Beugeschwingung



IR-Spektrum von Fenchon (als Film zwischen Kaliumbromid-Preßlingen).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
2980–2870	$-\text{CH}_3$, $>\text{CH}_2$, $-\overset{\textstyle }{\text{C}}-\text{H}$	CH-Streckschwingung
1740	$>\text{C}=\text{O}$ (cycl. Keton)	C=O-Streckschwingung
1460	$-\text{CH}_3$, $>\text{CH}_2$	CH-Beugeschwingung
1383, 1360	gem. Dimethyl	sym. CH-Beugeschwingung

2. Das *UV-Spektrum* des isolierten Anethols ist aufzunehmen:

10 mg Anethol werden in 100,0 cm³ Chloroform gelöst, davon wird 1,0 cm³ zu 25,0 cm³ mit Chloroform aufgefüllt.

$\lambda_{\text{max}} = 263 \text{ nm}$ ($\epsilon = 19630$).

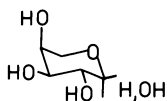
Weitere Aufgaben

- In welchen Drogen ist Anethol ebenfalls enthalten (Stammpflanze, Familie)?
- Welche Varietäten unterscheidet man bei *Foeniculum vulgare*? – Worin besteht der Unterschied?
- Welche anderen bicyclischen Terpenketone kommen als Bestandteile etherischer Öle vor?
- Welche Isomeriemöglichkeiten bestehen bei Anethol?

2.8 Isolierung von L-Arabinose aus Arabischem Gummi (Acaciae gummi, syn. Gummi arabicum)

Prinzip: Die Polysacchariddroge Acaciae gummi (*Acacia senegal* (L.) WILLDENOW) wird sauer hydrolysiert. Aus dem entstandenen Gemisch von Monosacchariden, vor allem Arabinose, Galaktose und Rhamnose, und oligomeren Sacchariden wird die Arabinose durch die unterschiedliche Löslichkeit und Kristallisierbarkeit in Ethanol isoliert.

Strukturformel



L-Arabinose (Pyranoseform)

C₅H₁₀O₅, MG 150,3; Smp: 157–160 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +105,5^{\circ}$ (Endwert in Wasser) (bestimmt an einer 5proz. (G/V)-Lsg.)

Chemikalien

Acaciae gummi pulv. (180), 25 g
Schwefelsäure, konz., 6,5 g
Calciumcarbonat, 7 g
Aktivkohle, 2 g
Ethanol, 96proz. (G/V), 450 cm³
Methanol, 110 cm³
n-Butanol, 1 cm³
Eisessig, 35 cm³
Dichlorethan, 54 cm³
DC-Schicht: Kieselgel
Arabinose, 5 mg (Vergleich)
Rhamnose, 5 mg (Vergleich)
Galaktose, 5 mg (Vergleich)

Reagenzien

Aminohippursäure (Reag. Nr. 2)

Geräte

Rundkolben, NS 29, 1000 cm³ (1), 250 cm³ (1)
1 Rückflußkühler, NS 29
1 Büchnertrichter, Ø 110 mm mit passendem Guko zu Saugflasche, 1000 cm³
Bechergläser, 1000 cm³ (2), 100 cm³ (2),
Trichter, Ø 10 cm (1), Ø 4 cm (1)
1 Glasfiltertrichter, D 3, mit passendem Guko zu Saugflasche, 250 cm³
Glasstab, 6 × 250 mm

Allgemeine Geräte

Wasserbad
Magnetrührer mit Heizung
und Rührstäbchen und Wassertopf
Rotationsverdampfer
DC-Grundausrüstung

Durchführung

25 g Acaciae gummi pulv. (180) werden in einem 1000-cm³-Rundkolben mit 300 cm³ dest. Wasser unter leichtem Umschwenken versetzt und 15 min zum Aufquellen stehengelassen. Danach

wird eine Mischung von 6,5 g konz. Schwefelsäure in 10 cm³ Wasser hinzugegeben, und diese Mischung wird 6 h auf dem Wasserbad bei 85 °C unter Rückfluß erhitzt. Danach wird durch portionsweise Zugabe von Calciumcarbonat neutralisiert. Ein Übersäumen kann durch Zugabe von einigen Tropfen n-Butanol verhindert werden. Zur Vervollständigung der Neutralisation wird eine weitere Stunde unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird das Calciumsulfat über ein hartes Filterpapier abgesaugt und mit 100 cm³ heißem Wasser nachgespült. Das gelbliche Filtrat (= DC-Lösung a) wird mit 2 g Aktivkohle versetzt und 1 h lang gerührt und danach filtriert. Das klare Filtrat (= DC-Lösung b) wird am Rotationsverdampfer auf ca. 100 cm³ eingengt, nach dem Abkühlen werden unter Rühren 200 cm³ Ethanol hinzugesetzt. Es fällt ein farbloser Niederschlag aus, von dem nach einem Tag abdekantiert wird. Die ethanolische Lösung (= DC-Lösung c) wird aufbewahrt, und der Rückstand wird dreimal mit je 30 cm³ Methanol unter Rühren mit einem Glasstab ausgezogen. Die methanolische Lösung (= DC-Lösung d) wird nach Absetzen des Niederschlags abdekantiert. Anschließend wird der Rückstand nochmals mit 20 cm³ Wasser verrieben und danach 40 cm³ Ethanol hinzugefügt und wieder abdekantiert (= DC-Lösung e). Die ethanolischen und methanolischen Auszüge werden in einem 1000-cm³-Becherglas vereinigt, über ein hartes Filterpapier klar filtriert und am Rotationsverdampfer portionsweise bis zu einer sirupartigen Konsistenz eingengt. Der «Sirup» wird unter Erwärmen auf dem Wasserbad mit 50 cm³ Ethanol versetzt und die Mischung in ein 100-cm³-Becherglas überführt. Man läßt diese Lösung bei Zimmertemperatur zur Kristallisation stehen. Von dem nach einem Tag gebildeten Niederschlag (= Roharabinose) wird abdekantiert. Nach weiteren 2–3 Tagen ist aus der abdekantierten Lösung Arabinose auskristallisiert, die über einen Glasfiltertrichter abgesaugt wird (Mutterlauge = DC-Lösung g)

Ausbeute: 1–1,5 g

Zeitbedarf: 10 Tage

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. *Standardmethode:* Ja

II. *Schicht:* Kieselgel

III. *Fließmittel:* Dichlorethan-Eisessig-Methanol-Wasser (54 + 28 + 11 + 7); KS, 10 cm (Die Volumina sind genau abzumessen, da sonst eine Entmischung auftritt.)

IV. *Nachweis:* Besprühen mit Aminohippursäure-Reagenz (Nr. 2) und anschließend 5 min bei 110 °C erhitzen. (Arabinose im mittleren R_f-Bereich färbt sich rötlich-braun an, oberhalb tritt die gelbe Zone der Rhamnose auf und unterhalb die ebenfalls sich gelb anfärbende Zone der Galaktose). Beim anschließenden Betrachten im langwelligen UV-Licht zeigen die Zonen entsprechend farbige Fluoreszenzen.

V. *Untersuchungslösung:* Bandförmige Auftragung (10 × 2 mm) im Warmluftstrom.

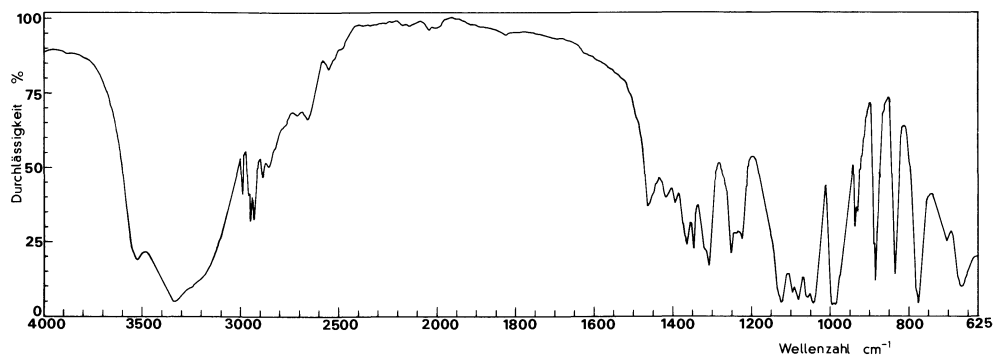
Von den DC-Lösungen a–e je 5 mm³.

DC-Lösungen f und g werden mit Ethanol 1 : 5 verdünnt, davon je 5 mm³

Roharabinose und die isolierte Arabinose: Je 5 mg werden in 1 cm³ Wasser-Methanol (1 + 9) gelöst, davon werden je 5 mm³ aufgetragen.

VI. *Vergleichslösung:* Bandförmige Auftragung (10 × 2 mm). Je 5 mg Arabinose, Galaktose und Rhamnose werden in je 1,0 cm³ Wasser-Methanol (1 + 9) gelöst, davon werden je 5 mm³ aufgetragen.

2. Das *IR-Spektrum* der isolierten L-Arabinose ist aufzunehmen und mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von L-Arabinose (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3540–3340	–OH	OH-Streckschwingung
2900–3000	$>\text{CH}_2$, $>\text{CH}$ –	CH-Streckschwingung
1460–1350	$>\text{CH}_2$ und –OH	asym. CH-Beugeschwingung asoz. OH-Beugeschwingung
1130	–C–O–	asym. CO-Streckschwingung
940	–C–O–C–	sym. Streckschwingung

3. Der *Schmelzpunkt* der isolierten L-Arabinose ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

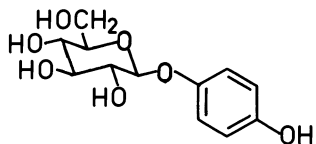
- Welche weitere Pentose ist im Pflanzenreich als Baustein polymerer Kohlenhydrate bekannt?
- Welche Hexosen können als Zuckerkomponenten in Glykosiden vorkommen?
- Geben Sie Beispiele für a) 6-Desoxyzucker und b) 2-Desoxyzucker sowie deren Vorkommen an?
- Welche weiteren wichtigen pflanzlichen Polysaccharid-Drogen sind handelsüblich?

2.9 Isolierung von Arbutin aus Bärentraubenblättern

Prinzip: Aus grob gepulverten Bärentraubenblättern (*Arctostaphylos uvae-ursi* (L.) SPRENGEL) wird Arbutin bei Zimmertemperatur mit Wasser extrahiert; die mitextrahierten Gerbstoffe und Flavonoide werden mit Bleiacetat ausgefällt. Aus dem eingengten Filtrat fällt Arbutin aus, gegebenenfalls muß eine säulenchromatographische Abtrennung erfolgen, oder eine Extraktion mit Essigsäureethylester.

Gehalt: 3–12 %

Strukturformel



Arbutin (4-Hydroxyphenyl- β -D-glucopyranosid)

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$, MG 272,3; Smp: ca. 200°C , 165°C instabile Form aus Essigsäureethylester,
 $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 63,5^\circ$ (c = 2proz. in Wasser)

Chemikalien

Uvae ursi folium, pulv. (700), 20 g
Ether, 500 cm³
Ameisensäure, 10 cm³
Blei(II)acetat, 5 g
Ammoniumsulfat, 5 g
Aktivkohle, 2 g
3 DC-Schichten: Kieselgel F₂₅₄ (20 × 20 cm)
Arbutin, 10 mg (Vergleich)
Essigsäureethylester, 400 cm³
(SC oder Perforation)
Methanol, 150 cm³ (SC)
Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 100 g (SC)

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 500 cm³
Magnetrührer mit Heizung und
Rührstäbchen, 30 mm
DC-Grundausrüstung
Wasserbad
Thermometer 0–100 °C
Rotationsverdampfer
Fraktionssammler mit Zubehör (SC)

Geräte

Rundkolben, NS 29: 500 cm³ (1), 1000 cm³ (1),
50 cm³ (1)
Bechergläser: 1000 cm³ (1), 600 cm³ (1),
100 cm³ (2), 50 cm³ (3)
1 Büchner-Trichter, Ø 10 cm mit pass.
Guko zu Saugflasche, 1000 cm³
1 Glasfiltertrichter D 3, Ø 5 cm mit pass.
Guko zu Saugflasche, 100 cm³
Trichter, Ø 8 cm (1), Ø 4 cm (1)
1 Chromatographiesäule, *l* = 50 cm,
Ø_i = 2,5 cm (SC) oder 1 Perforator
für spez. leichtere Extraktionsmittel 100 cm³
(Abb. 2, d, S. 5)

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)
2,6-Dichlorchinonchlorimid (Reag. Nr. 7)

Durchführung

20 g Uvae ursi folium, pulv. (700) werden in einem 600-cm³-Becherglas mit 200 cm³ dest. Wasser versetzt und mit einem Magnetrührer bei Zimmertemperatur 30 min lang gerührt, oder in einem 1000-cm³-Rundkolben geschüttelt. Danach wird der wäßrige Extrakt über einen Büchnertrichter abgesaugt – gegebenenfalls ist das Filterpapier zu wechseln. Der Drogenrückstand wird abermals mit 100 cm³ dest. Wasser 15 min lang bei Zimmertemperatur gerührt oder geschüttelt und danach wieder über einen Büchnertrichter abgesaugt. Die vereinigten Filtrate (= DC-Lösung a) werden unter Rühren auf 60–70 °C erwärmt und mit ca. 30 cm³ einer 15proz. (G/V) Blei(II)acetat-Lösung versetzt. Der Niederschlag wird abgesaugt. Das klare Filtrat wird mit einem Tropfen gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung in Wasser versetzt, falls eine Trübung durch ausfallendes Bleisulfat auftritt, wird erneut filtriert und zum Filtrat wiederum ein Tropfen gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung gegeben, bis die freien Bleiionen möglichst vollständig aus der Lösung entfernt sind, wobei jedoch auch ein Überschuß an Ammoniumsulfat zu vermeiden ist. Falls keine Trübung auftritt, wird ein Tropfen der 15proz. (G/V) Bleiacetat-Lösung hinzugegeben und von der entstandenen Trübung abfiltriert. Zu dem klaren Filtrat gibt man wiederum einen Tropfen der Bleiacetat-Lösung, bis kein Niederschlag mehr auftritt. Auch in diesem Falle ist ein Überschuß an Bleiacetat zu vermeiden.

Das klare, leicht gelbliche Filtrat (= DC-Lösung b) wird in einem zuvor gewogenen 1000-cm³-Rundkolben, der zur Vermeidung von stärkerer Lichteinwirkung mit Aluminiumfolie ummantelt wird, am Rotationsverdampfer bei Wasserbadtemperaturen von 50–60 °C bis zu einem Gewicht von 15–20 g eingengt wird. Eine bei der Konzentrierung möglicherweise auftretende Trübung rührt von ausgefallenem Bleisulfat her. Die eingengte, möglicherweise trübe Lösung wird mit 250 mg Aktivkohle aufgekocht und heiß filtriert. Der Filtrerrückstand wird mit ca. 5 cm³ Waschwasser des Rundkolbens nachgespült. Das klare, honiggelbe Filtrat wird in einem zuvor gewogenen 50-cm³-Rundkolben, der mit Aluminiumfolie ummantelt ist, am Rotationsverdampfer bei Wasserbadtemperaturen von 50–60 °C bis zu einem Gewicht von ca. 10 g eingengt und in ein Becherglas von 50 cm³ überführt, wobei der Kolben mit höchstens 1 cm³ Wasser nachgespült wird.

Die Lösung wird über Nacht in den Kühlschrank bei 4 °C gestellt. Die danach ausgefallenen

Kristalle von Arbutin werden über einen Glasfiltertrichter abgesaugt und mit ca. 20 cm³ Ether gewaschen.

Falls aus dem ersten eingengten Filtrat der Bleiacetatfällung über Nacht kein Arbutin ausgefallen ist, ist zunächst zu testen, ob in der Lösung überhaupt Arbutin enthalten ist, wenn ja, kann eine säulenchromatographische Trennung erfolgen oder eine Extraktion mit Essigsäureethylester (Kontinuierliche Perforation)

a) Säulenchromatographie

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 50$ cm, $\varnothing_i = 2,5$ cm.

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 100 g.

Elutionsmittel: Essigsäureethylester-Methanol-Wasser (75 + 15 + 10), 500 cm³.

Aufgabemenge: eingengter wäßriger Extrakt.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Fraktionen: ca. 15 cm³.

Ausbeute: ca. 600 mg.

DC-Bedingungen: Siehe *Auswertung* Punkt 1.

V. Untersuchungslösung

1) 5 mm³ des eingengten Extraktes werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 5 mm³ punktförmig auf.

2) Ab Fraktion 10 von jeder 3. Fraktion 10 mm³.

b) Kontinuierliche Extraktion mit Essigsäureethylester

Die wäßrige Lösung wird mit einem Trichter in einen 100-cm³-Perforator für spez. leichtere Lösungsmittel gegeben und mit ca. 10 cm³ Wasser nachgespült. Der Perforator wird mit einem Rückflußkühler und einem 500-cm³-Rundkolben, in dem sich 400 cm³ Essigsäureethylester befinden, verbunden. Der Rundkolben wird auf einem Wasserbad erhitzt und die ganze Apparatur vor direktem Lichteinfall geschützt. Die Extraktionsdauer beträgt 8 h. Beim Abkühlen der Extraktlösung können Arbutinkristalle sich an der Kolbenwandung als nadelförmige Büschel abscheiden. Der Essigsäureethylesterextrakt wird bis zu einem Volumen von ca. 50 cm³ eingengt und auf 4 °C abgekühlt. Das ausfallende Arbutin wird über einen Glasfiltertrichter abgesaugt und mit ca. 20 cm³ Ether gewaschen und im Vakuumexsikator bei 60 °C (= «Trockenpistole») getrocknet.

Der Schmelzpunkt des so gewonnenen Arbutins liegt bei 165 °C (instabile Kristallform des Arbutins). Kristallisiert man das so gewonnene Arbutin in Wasser (siehe oben) um, so wird ein Schmelzpunkt von ca. 200 °C erhalten.

Ausbeute: 1 g

Zeitbedarf: 2 Tage

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. *Standardmethode:* Ja; Abweichung: Laufstrecke 15 cm.

II. *Schicht:* Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel:* Essigsäureethylester-Ameisensäure-Wasser (88 + 6 + 6), KS, 15 cm.

IV. *Nachweis:* Nach Abdampfen des Fließmittels bei 110 °C

1. UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Arbutin im unteren Drittel des Chromatogramms zeigt Fluoreszenzminderung).

2. a) Anisaldehyd-Schwefelsäure [Reag. Nr. 3] (Arbutin färbt sich graublau).

b) Nur für phenolische Komponenten: 2,6-Dichlorchinonchlorimid, 1proz. (G/V) in Methanol, anschließend mit Ammoniak bedampfen (Arbutin färbt sich blau).

V. *Untersuchungslösung:* Bandförmige Auftragung (10 × 3 mm)

a) DC-Lösung a, 10 mm³.

b) DC-Lösung b, 10 mm³.

c) Isoliertes Arbutin, 5 mg werden in 2,0 cm³ Methanol gelöst, davon 10 mm³.

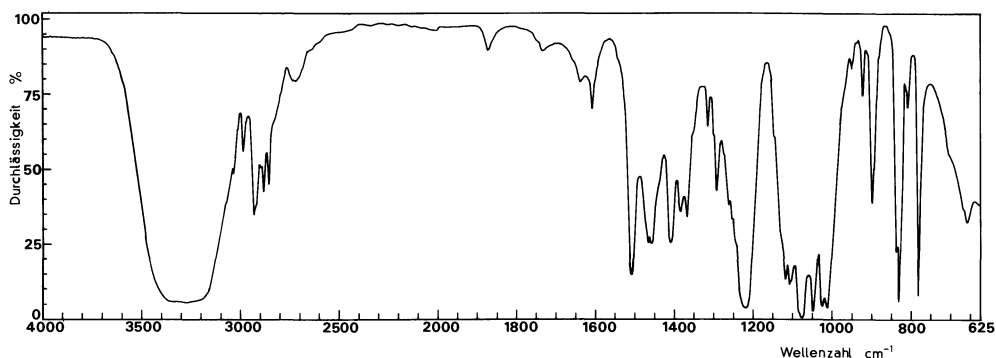
Thermische Spaltung des Arbutins im TAS-Ofen

TAS-Bedingungen: a) 5 mg gepulverte Droge und b) 0,5 mg Arbutin auf Quarzwolle, 250°. 90 s, 2 Kügelchen wasserdampfgesättigtes Molekularsieb 4 Å (0,4 nm).

DC-Bedingungen s. oben. Es erfolgt eine glatte Spaltung zu Hydrochinon. Methyларbutin liefert Hydrochinonmonomethylether.

VI. *Vergleichslösung*: 5 mg Arbutin werden in 2,0 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) auf. 5 mg Hydrochinon werden in 2,0 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 2 mm³ punktförmig auf.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Arbutins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Arbutin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl in cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3300	–OH am Aromat und Glucose	OH-Streckschwingung
2942–2897	>CH_2 und $-\text{C}-\text{H}$	CH-Streckschwingung
1510	Aromat	CC-Streckschwingung
1440	>CH_2	asym. CH-Beugeschwingung
1372	–OH am Aromat	OH-Beugeschwingung
1240–1195	Aliph.-arom. Ether und –OH	CO-Streckschwingung
1110	Ethergruppe der Glucose	CO-Streckschwingung
1070–1060	Aliph.-aromat. Ether	CO-Streckschwingung
1020–1000	–OH der Glucose	CO-Streckschwingung
834	Aromat, p-disubst.	CH-Beugeschwingung

3. Das UV-Spektrum des isolierten Arbutins ist aufzunehmen (2 mg Arbutin in 25 cm³ Methanol).
 $\lambda_{\text{max}} = 287 \text{ nm}$ ($\epsilon = 2620$).

4. Der Schmelzpunkt des isolierten Arbutins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

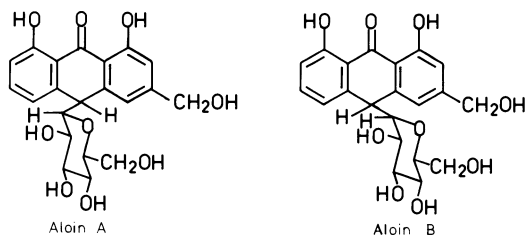
- In welchen anderen Drogen bzw. Pflanzen ist Arbutin enthalten?
- Welche anderen Phenolglykoside kennen Sie? In welchen entsprechenden Drogen sind diese enthalten?
- Wie kann man Arbutin in *Uvae ursi folium* quantitativ bestimmen? – Geben Sie das Prinzip dieser Methode an!
- Auf welcher Reaktion beruht der dc Nachweis von Arbutin mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid? Welche andere Sprühreagenzien kann man gleichfalls einsetzen?

2.10 Isolierung von Barbaloin (Aloin A) aus Kap-Aloe

Prinzip: Aus gepulverter Kap-Aloe (*Aloe ferox* MILLER und deren Hybriden) werden die Glykoside und Aglyka durch Auskochen mit Wasser von den Harzbestandteilen abgetrennt. Aus dem wäßrigen Extrakt wird Barbaloin durch kontinuierliche Extraktion mit Essigsäureethylester abgetrennt. Aus diesem eingengten Extrakt wird Aloin A durch Umkristallisation aus einem Gemisch von Chloroform und Methanol erhalten.

Gehalt: 18–20 %

Strukturformel



Barbaloin [= 1,8-Dihydroxy-3-hydroxymethyl-10-β)-D-(glucopyranosyl)anthron]

C₂₁H₂₂O₉, MG 418,4; Smp: 147–148 °C (Aloin A), $[\alpha]_D^{30} = +10,2^\circ$ (in Methanol)

Smp: 138–140 °C (Aloin B), $[\alpha]_D^{30} = -73,0^\circ$ (in Methanol)

Chemikalien

Kap-Aloe, pulv. (18), 10 g
Essigsäureethylester, 500 cm³
Chloroform,
bzw. Dichlormethan 150 cm³
Methanol, 50 cm³
DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄

Reagenzien

10proz. (G/V) methanolische
Kaliumhydroxidlösung

Allgemeine Geräte

Magnetrührer mit Heizung und Stäbchen
Wasserbad
DC-Grundausrüstung

Geräte

Bechergläser: 250 cm³ (3), 100 cm³ (2)
1 Büchnertrichter, Ø 8 cm
mit Guko zu Saugflasche 250 cm³
1 Glasfiltertrichter, D 3, Ø 5 cm
Rundkolben, NS 29: 500 cm³ (1)
1 Trichter mit langem Auslauf, Ø 8 cm
1 Extraktionsapparatur, 100 cm³
zur kontinuierlichen Extraktion
für spez. leichtere Lösungsmittel
(s. S. 5)

Durchführung

10 g gepulverte Kap-Aloe (180) werden mit 100 cm³ Wasser versetzt und unter Rühren 10 min auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wird über einen Büchnertrichter abgesaugt – wobei gelegentlich das Filterpapier gewechselt werden muß. – (Filtrat = DC-Lösung a). Das Filtrat wird in einem Perforator (für leichtere Lösungsmittel) mit 400 cm³ Essigsäureethylester in einem zuvor gewogenen 500-cm³-Rundkolben 2 h auf dem Wasserbad extrahiert. Die Essigesterphase, einschließlich der überstehenden Phase (= DC-Lösung b) werden am Rotationsverdampfer bei Wasserbadtemperaturen von 40–60 °C bis zur Trockene eingengt. – Vorsicht, die Lösung kann leicht übersäumen –, wobei sich der festwerdende braungelbe Rückstand aufbläht. Dieser Rückstand wird dann mit gerade so viel cm³ eines Gemisches aus Chloroform-Methanol (6 + 1) versetzt, so daß in der Siedehitze auf dem Wasserbad eine klare Lösung entsteht. Die Lösung wird auf –20 °C abgekühlt. Nach ca. 2 h sind kleine zitronengelbe Kristalle von Aloin ausgefallen, die über einen Glasfiltertrichter abgesaugt wer-

den, und mit ca. 10 cm³ Dichlormethan nachgewaschen werden. Der Niederschlag wird in der Trockenpistole bei 15 Torr und 60 °C getrocknet. Mutterlauge = DC-Lösung c).

Ausbeute: ca. 1 g.

Das erhaltene Produkt besteht zu etwa 80 % aus Aloin A und zu 20 % aus Aloin B, wie eine HPLC-Untersuchung nach GRÜN, M. und G. FRANZ, Arch. Pharm. 315, 231 (1982) zeigt.

Die erneute Umkristallisation dieses Produkts in einem Gemisch aus Methanol-Chloroform (1 + 6), wobei die Abkühlung zunächst bei Zimmertemperatur erfolgte, und anschließend über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank, lieferte ein aus zitronengelben Nadeln bestehendes Produkt, das zu etwa 95 % aus Aloin A und zu 5 % aus Aloin B besteht.

Zeitbedarf: 1–2 Tage.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Essigsäureethylester-Methanol-Wasser (77 + 13 + 10), KS.

IV. Nachweis:

a) Tageslicht: Barbaloin ist im unteren Drittel des Chromatogramms (hRf 30–35) als gelbe Zone zu erkennen.

b) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren: Barbaloin und die Begleitsubstanzen zeigen Fluoreszenzminderung.

c) UV₃₆₅: Fluoreszierende Zonen markieren. Barbaloin zeigt eine gelbe Eigenfluoreszenz.

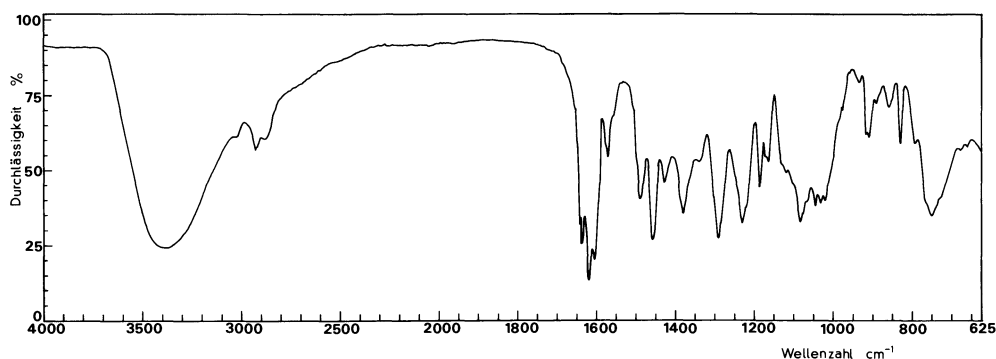
d) 10proz. (G/V) methanolische Kaliumhydroxidlösung aufsprühen und anschließend im UV₃₆₅ fluoreszierende Zonen markieren: Barbaloin ist als intensiv gelb-fluoreszierende Zone zu erkennen.

V. Untersuchungslösung: Bandförmige Auftragung (10 × 3 mm). Je 5 cm³ der DC-Lösungen a–c.

Isoliertes Aloin A: 5 mg werden in 1,0 cm³ Methanol gelöst.

VI. Vergleichslösung: 5 mg Barbaloin werden in 1,0 cm³ Methanol gelöst, davon werden 5 cm³ bandförmig (10 × 3 mm) aufgetragen.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Barbaloins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Barbaloin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3400	–OH	OH-Streckschwingung
2920	>CH_2 und $\text{–}\overset{ }{\text{CH}}$	CH-Streckschwingung
1640–1600	>C=O und Aromat	CO-Streckschwingung und CC-Streckschwingung
1512	Aromat	CC-Streckschwingung
1490–1450	>CH_2 und Aromat	CH-Beugeschwingung und CC-Streckschwingung
1380	–OH in $\text{–CH}_2\text{OH}$ und Phenol	assoz. OH-Beugeschwingung
1290 oder 1225	–OH in $\text{–CH}_2\text{OH}$ und Phenol	freie OH-Beugeschwingung
1165–1000	$\text{–}\overset{ }{\text{C}}\text{–OH}$ in Phenol und Zucker und cycl. Ether	CO-Streckschwingung
830	Substit. an den arom. Ringen	CO-Streckschwingung CH-Beugeschwingung

Das UV-Spektrum des isolierten Barbaloins ist aufzunehmen.

(5 mg Barbaloin werden in $10,0 \text{ cm}^3$ Methanol gelöst, davon wird 1 cm^3 mit Methanol auf 25 cm^3 aufgefüllt.)

$\lambda_{\text{max}} = 269 \text{ nm}$ ($\epsilon = 7800$).

$\lambda_{\text{max}} = 297 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9000$).

$\lambda_{\text{max}} = 354 \text{ nm}$ ($\epsilon = 11000$).

4. Die Schmelzpunkte der isolierten Aloin-Produkte sind zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

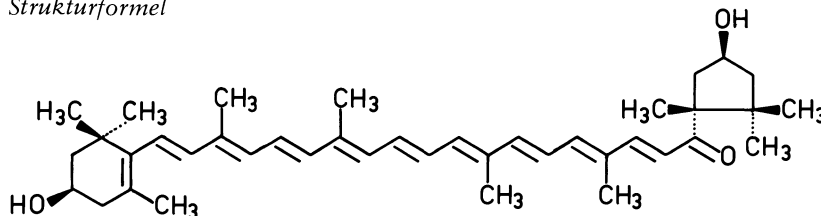
- Geben Sie die Unterscheidungsmerkmale von Kap- und Barbados-Aloe an.
- Was sind Aloinoside und Aloe(re)sine?
- Welche Glykosid- und Aglyka-Typen kommen in anthracenderivathaltigen Drogen vor?
- Welche weiteren C-Glykoside gibt es?
- Wie kann man aus Barbaloin das Aloe-Emodin herstellen?

2.11 Isolierung von Capsanthin aus Edelsüß-Paprika

Prinzip: Aus Edelsüß-Paprikapulver (*Capsicum annum* L.) werden durch Mazeration mit Petrolether der Capsanthinfettsäureester und andere lipophile Inhaltsstoffe extrahiert. Aus dem eingengten Extrakt wird Capsanthin durch Verseifung freigesetzt und aus dem Reaktionsgemisch mit Ether extrahiert. Aus dessen eingengtem Extrakt wird Capsanthin säulenchromatographisch getrennt.

Gehalt: 0,05–0,1 %.

Strukturformel



Capsanthin

$\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{O}_3$, MG 586,86; Smp: $175\text{--}176^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 36^\circ$ (in Chloroform)

Chemikalien

Capsici fructus, «Edelsüß»
 pulv. (180), 100 g
 Petrolether (40–60°), 350 cm³
 Ether, 600 cm³
 Dichlormethan, 350 cm³
 Essigsäureethylester, 300 cm³
 Methanol, 100 cm³
 Schwefelkohlenstoff, 30 cm³
 Kaliumhydroxid, 30 g
 Natriumsulfat, wasserfrei, 10 g
 Kieselgel zur SC, 0,063–0,2 mm, 50 g
 Seesand, 20 g
 DC-Schichten, Kieselgel F₂₅₄
 Coffein (Vergleich), 5 mg

Geräte

Erlenmeyerkolben: 500 cm³ (2), 1000 cm³ (1)
 1 Büchnertrichter, Ø 10 cm mit pass. Guko
 zu Saugflasche, 500 cm³
 1 Scheidetrichter, 1000 cm³
 1 Rundkolben, NS 29, 250 cm³
 Spitzkolben, NS 14,5, 100 cm³ (2)
 2 Glasfiltertrichter, Ø 4 cm, D 3, mit pass. Guko
 zu Saugrohr, 20 cm³
 1 Spitzkolben, NS 14,5, 50 cm³
 1 Rückflußkühler, NS 14,5
 1 Erlenmeyerkolben, NS 29, 20000 cm³
 1 Trichter, Ø 6 cm
 1 Schliffstopfen, NS 29
 1 Chromatographiesäule, $l = 80$ cm, $\varnothing_i = 1,5$ cm

Reagenzien: Antimon(III)-chlorid (Reag. Nr. 5)

Allgemeine Geräte

Wasserbad
 Magnetrührer mit Rührstäbchen, 40 mm
 Fraktionssammler mit Zubehör

Rotationsverdampfer
 DC-Grundausrüstung
 Vakuumexsikkator

Durchführung

Beachte: Die einzelnen Isolierungsschritte sind im diffusen Tageslicht durchzuführen!

a) *Extrakt:* 100 g Capsici fructus pulv. (180) «Edelsüß» werden mit 250 cm³ Petrolether (40–60°) 4 h bei Zimmertemperatur gerührt und danach über einen Büchnertrichter abgesaugt. Der Drogenrückstand wird mit 100 cm³ Petrolether (40–60°) nachgewaschen. Das rotgefärbte Filtrat (= DC-Lösung a) wird mit 600 cm³ Ether aufgefüllt, mit 100 cm³ 30proz. (G/V) methanolischer Kaliumhydroxidlösung versetzt und 8 h gerührt. Die Lösung wird dann in einen 1000 cm³-Scheidetrichter überführt und mit gerade so viel Wasser versetzt, bis eine Phasentrennung auftritt. Die untere wäßrig-methanolische Lösung wird verworfen. Die obere (etherische) Phase (= DC-Lösung b) wird mit ca. 50 cm³ Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer im Vakuum portionsweise in einem 250 cm³-Rundkolben bis zu einem Volumen von ca. 20 cm³ eingengt. Die eingengte Lösung wird mit ca. 50–60 cm³ Petrolether (40–60°) versetzt und bei 4° im Kühlschrank aufbewahrt. Nach 24 h wird das auskristallisierte Rohcapsanthin (ca. 30 mg) über einen Glasfiltertrichter abgesaugt (Mutterlauge = DC-Lösung c).

b) Säulenchromatographie

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen»

Chromatographiesäule: $l = 80$ cm, $\varnothing_i = 1,5$ cm.

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC, 50 g.

Elutionsmittel: 1. Dichlormethan, 50 cm³.

2. Dichlormethan-Essigsäureethylester (50 + 50), 500 cm³.

Aufgabemenge: Rohcapsanthin (30 mg) in 5 cm³ Dichlormethan.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Fraktionen: 10–15 cm³.

Die ausschließlich Capsanthin enthaltenden Fraktionen werden am Rotationsverdampfer im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in möglichst wenig siedendem Schwefelkohlenstoff unter Rückflußkochen auf dem Wasserbad gelöst. Nach 24stündigem Stehen bei 4° im Kühlschrank werden die ausgefallenen Kristalle über einen Glasfiltertiegel abgesaugt und im Vakuumexsikkator getrocknet, bis der Geruch nach Schwefelkohlenstoff verschwunden ist.

Ausbeute: 10 mg.

Zeitbedarf: 2,5 Tage.

c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode*: Ja; Abweichung: Laufstrecke 15 cm.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: Dichlormethan-Essigsäureethylester (80 + 20), KS, 15 cm.

IV. *Nachweis*: Nach Abdampfen des Fließmittels.

a) Tageslicht.

b) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren.

c) Besprühen mit einer 25proz. (G/G) Lösung von Antimon(III)-chlorid in Chloroform (Reag. Nr. 5) und anschließend 10 min auf 110° erhitzen.

V. *Untersuchungslösung*

Nach Austreten der 1. farbigen Fraktion von jeder Fraktion 5 mm³ punktförmig.

Von der Rohcapsanthin-Lösung zur SC: 2 mm³ punktförmig.

VI. *Vergleichslösung*: 0,5proz. Lösung von Coffein in Methanol: 2 mm³ punktförmig.

Auswertung des Dünnschicht-Chromatogramms

Die rote Zone im unteren Drittel des Chromatogramms der Untersuchungslösung entspricht dem Capsanthin. Etwas unterhalb dieser Zone erkennt man im kurzwelligen UV-Licht auf dem Chromatogramm der Vergleichslösung die fluoreszenzmindernde Zone des Coffeins.

Abschließende Dünnschicht-Chromatographie

Verfolgung der Isolierungsschritte:

DC-Bedingungen: I., II., III., IV. und VI. wie bei c).

V: *Untersuchungslösung*: (Bandförmige Auftragung: 10 × 3 mm);

DC-Lösung a: 5 mm³.

DC-Lösung b: 5 mm³.

DC-Lösung c: 5 mm³.

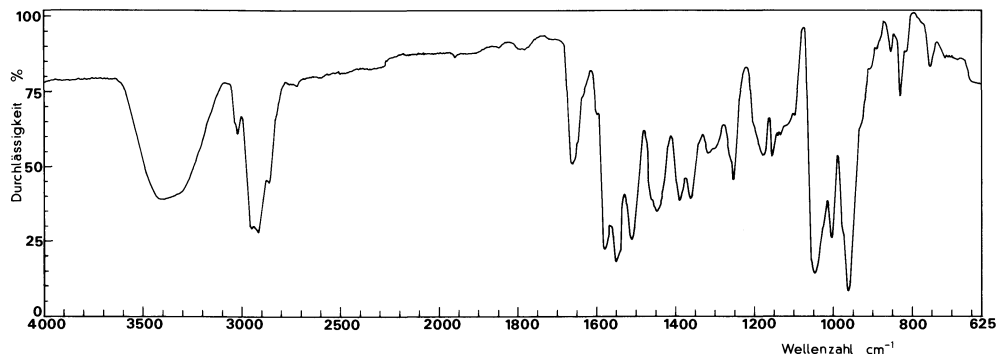
Rohcapsanthin: 5 mm³ der Aufgabelösung zur SC.

Reincapsanthin: 1 mg wird in 1 cm³ Essigsäureethylester gelöst, davon 5 mm³.

Mutterlauge von Reincapsanthin: 0,1 cm³ werden mit 0,2 cm³ Essigester verdünnt, davon 5 mm³ auftragen.

Auswertung

1. Das *IR-Spektrum* des isolierten Capsanthins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Capsanthin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3400, 3300	– OH	OH-Streckschwingung
3020	olefin. Doppelbindung	CH-Streckschwingung
2960–2860	– CH_3 , >CH_2 , $-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}-\text{H}$	CH-Streckschwingung
1660	$\text{C}=\text{O}$ (konj.)	CO-Streckschwingung
1580, 1550, 1510	vermutl. $-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$ (konj.) $-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$ (konj.)	$\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung
1460, 1440	– CH_3 , >CH_2	CH-Beugeschwingung
1390, 1360	$\text{>C} \begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$ gem. Dimethyl	sym. Beugeschwingung
1310	trans disubst. Doppelb.	CH-Beugeschwingung
1250	vermutl. $\text{C}-\text{C}$ in Ketonen	CC-Beugeschwingung
1045, 1000	>CHOH	CO-Streckschwingung
960	trans disubst. Doppelb.	CH-Beugeschwingung

2. Das *VIS-UV-Spektrum* des isolierten Capsanthins ist aufzunehmen. (1 mg Capsanthin wird in 25 cm^3 Dichlormethan gelöst, 5 cm^3 dieser Lösung werden mit Dichlormethan auf 50 cm^3 aufgefüllt.

$$\lambda_{\text{max}} = 483 \text{ nm } (\epsilon = 98\,500).$$

3. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Capsanthins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

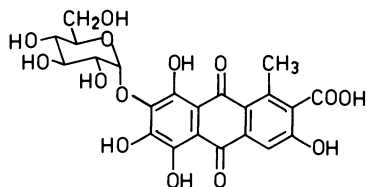
- Zeigen Sie an der Strukturformel von Capsanthin den Aufbau und die Verknüpfungsweise.
- Welche weiteren Carotinoide sind noch in *Capsici fructus* enthalten?
- Wie werden die Carotinoide ihren funktionellen Gruppen nach bezeichnet? – Geben Sie zu jeder Gruppe ein Beispiel an.
- Welche strukturellen Voraussetzungen müssen Carotinoide aufweisen, damit sie als Vitamin-A-Vorstufen fungieren können?

2.12 Isolierung von Carminsäure aus Cochenille

Prinzip: Gepulverte Cochenille (*Cocionella grisea* (L.) syn. *Dactylopius coccus* COSTA) werden zunächst mit Dichlormethan entfettet und anschließend mit siedendem Wasser extrahiert. Aus dem wäßrigen Extrakt wird mit einer Blei(II)-acetatlösung das Bleisalz der Carminsäure (= Bleilack) gefällt zur Abtrennung mitextrahierter Aminosäuren. Aus dem Bleilack wird durch Umsetzen mit einer Lösung von Schwefelsäure in Methanol die Carminsäure wieder freigesetzt. Das gebildete Bleisulfat wird abzentrifugiert. Aus dem methanolischen Filtrat erhält man nach Einengen und Versetzen mit Diethylether die reine Carminsäure.

Gehalt: 5–10 %.

Strukturformel



Carminsäure (7- α -D-Glucopyranosyl-9,10-dihydro-3,5,6,8-tetrahydroxy-1-methyl-9,10-dioxo-2-anthracen-carbonsäure)

$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$, MG 492,4

Smp: Zersetzung, dunkelt bei 120°C

Chemikalien

Cochenille, gepulvert, 10 g
 Dichlormethan, 60 cm³
 Blei(II)-acetat-Lösung, 20proz. (G/V), 10 cm³
 Methanol, 200 cm³
 Schwefelsäure, konz., 5 cm³
 konz. Salpetersäure, 2 cm³
 DC-Schicht: mikrokristalline Cellulose
 n-Butanol, 40 cm³
 Eisessig, 10 cm³
 Diethylether, 200 cm³

Reagenzien

Ninhydrin-Reagenz (Reag. Nr. 20)

Geräte

Extraktionsapparatur nach Soxhlet,
 30 cm³, mit Rundkolben NS 29, 100 cm³
 Bechergläser: 100 cm³ (1), 200 cm³ (2),
 400 cm³ (2)
 1 Glasfiltertrichter, D3, Ø 6 cm
 mit Saugflasche, 500 cm³
 Mörtel mit Pistill, Ø 7 cm
 1 Erlenmeyerkolben, 100 cm³,
 mit NS-Schliffstopfen

Allgemeine Geräte

Zentrifuge mit Z.-gläsern, 50 cm³
 Heizplatte
 Rotationsverdampfer
 Magnetrührer mit Stäbchen

Durchführung

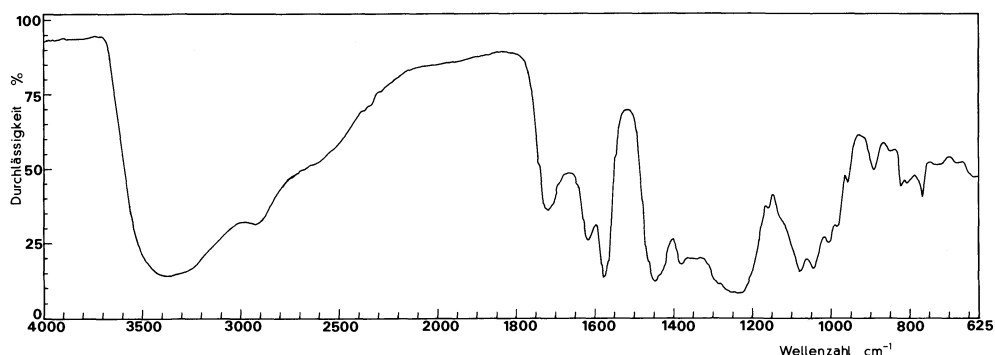
10 g Cochenille werden im Mörtel zerkleinert und mit 60 cm³ Dichlormethan in einer Soxhlet-apparatur 3 h extrahiert. Der Dichlormethanextrakt (= DC-Lösung a) wird verworfen. Der Drogenrückstand wird in der Extraktionshülse im Trockenschrank bei 50 °C getrocknet und danach erneut im Mörtel zerkleinert. Der pulverisierte Drogenrückstand wird dreimal mit je 100 cm³ siedendem Wasser versetzt und je 5 min gerührt. – Die wäßrigen Lösungen dürfen nicht kochen. – Die Abtrennung der tiefroten Lösungen vom Drogenrückstand erfolgt durch Zentrifugieren. Die vereinigten wäßrigen Extrakte (= DC-Lösung b) werden unter Rühren (Magnetrührer) in der Wärme (50–60 °C) mit 10 cm³ 20proz. (G/V) Blei(II)-acetat-Lösung versetzt. Es fällt ein blauer, voluminöser Niederschlag von Bleicarminat (= Bleilack) aus. Der amorphe Niederschlag wird abzentrifugiert (Zentrifugat = DC-Lösung 3) und mindestens dreimal mit je 40 cm³ heißem (60 °C) Wasser gewaschen, gegebenenfalls noch öfter, bis in der Waschflüssigkeit keine Bleiionen mehr nachzuweisen sind. (Nach Zugabe von einem Tropfen konz. Schwefelsäure zu dem Waschwasser darf keine Trübung (PbSO₄) mehr auftreten.) Danach wird der Niederschlag in der gleichen Weise dreimal mit Aceton gewaschen zur Entfernung der Wasserreste im Niederschlag. Schließlich wird noch zweimal mit Ether gewaschen. Der noch etherfeuchte Bleilack wird in einen Erlenmeyerkolben (200 cm³, mit Schliffstopfen) überführt mit Hilfe einer eiskalten Mischung von 50 cm³ Methanol und 500 mg konz. Schwefelsäure; danach wird kurz Stickstoff eingeleitet und der Kolben verschlossen. Nach dem Zusatz der schwefelsauren Methanollösung färbt sich die Mischung tiefrot. Die Mischung wird 24 h gerührt und anschließend der gebildete Niederschlag vom Bleisulfat abzentrifugiert. Die tiefrote überstehende Lösung wird abdekantiert. Einen Tropfen dieser Lösung versetzt man mit einem Tropfen konz. Salpetersäure und einem Tropfen 20proz. (G/V) Blei(II)-acetat-Lösung: es darf sich keine Trübung von Bleisulfat zeigen, und damit ist gewährleistet, daß die eingesetzte Schwefelsäure vollständig verbraucht worden ist. Nicht verbrauchte Schwefelsäure würde beim Einengen der methanolischen Lösung stören. Der Bleisulfatniederschlag wird noch zweimal mit je 25 cm³ Methanol nachgewaschen. Die Methanolwaschlösungen werden mit dem ersten Zentrifugat vereinigt und in einem 250 cm³-Rundkolben am Rotationsverdampfer bei höchstens 40 °C Wasserbadtemperatur bis zu einem Volumen von ca. 5 cm³ eingengt. – Carminsäure kann bereits als dunkelrote mikrokristalline Masse ausfallen, diese wird dann über einen Glasfiltertrichter abfiltriert und die Mutterlauge, oder die eingengte methanolische Lösung, mit ca. 200 cm³ Ether versetzt. Hierbei fällt ein tiefroter voluminöser Niederschlag von Carminsäure aus, der über einen Glasfiltertrichter abgesaugt, mit Ether nachgewaschen und an der Luft getrocknet wird.

Ausbeute: ca. 500 mg.

Zeitbedarf: 3 Tage.

1. *Dünnschicht-Chromatographie*I. *Standardmethode*: Ja.II. *Schicht*: Mikrokristalline Cellulose.III. *Fließmittel*: Oberphase von n-Butanol-Eisessig-Wasser (40 + 10 + 50), KS, 10 cm.IV. *Nachweis*: Nach Abdampfen des Fließmittels auf der Heizplatte:a) UV_{365} : Fluoreszierende Zonen markieren (Carminsäure im mittleren hR_f -Bereich zeigt eine rosafarbene Fluoreszenz).

b) Ninhydrin-Reagenz: Nach dem Erhitzen erkennt man im unteren Drittel des Chromatogramms der Untersuchungslösung des wässrigen Extrakts sich rotbraun anfärbende Zonen von Aminosäuren.

V. *Untersuchungslösung*: Bandförmige Auftragung (10×2 mm).Von jeder DC-Lösung a bis c je 2 mm^3 .VI. *Vergleichslösung*: 1 mg Carminsäure wird in $0,5\text{ cm}^3$ Methanol gelöst und davon 2 mm^3 bandförmig (10×2 mm) aufgetragen.2. Das *IR-Spektrum* der isolierten Carminsäure ist aufzunehmen und mit dem abgebildeten Spektrum und den Daten zu vergleichen.

IR-Spektrum von Carminsäure (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3380	$-\text{OH}$	OH-Streckschwingung
2930	$>\text{CH}_2$	CH-Streckschwingung
1730	$>\text{C}=\text{O}$	C=O-Streckschwingung
1620	$>\text{C}=\text{O}$	C=O-Streckschwingung
1580	Aromat	C=C-Streckschwingung
1450	$>\text{CH}_2$	CH-Beugeschwingung
1230–1260	$>\text{C}-\text{O}$	CO-Streckschwingung

3. Das *VIS-UV-Spektrum* der isolierten Carminsäure ist in Wasser aufzunehmen.

$$\lambda_{\text{max}} = 500\text{ nm } (\epsilon = 6800)$$

4. Das Verhalten von Carminsäure im Schmelzpunktsapparat ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

a) Wozu wird die Carminsäure verwendet?

b) Welche weitere ähnliche, chinoide Naturstoffe kennen Sie?

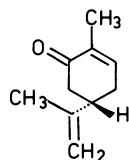
c) Geben Sie weitere natürliche Farbstofftypen an!

2.13 Isolierung von (S)-(+)-Carvon aus Kümmelfrüchten

Prinzip: Aus frisch gepulverten Kümmelfrüchten (*Carum carvi* L.) wird durch Wasserdampfdestillation das etherische Öl gewonnen. Aus dem etherischen Öl wird das Carvon säulenchromatographisch abgetrennt.

Gehalt: eth. Öl: 3–4 %, darin 50–80 % Carvon.

Strukturformel



Carvon (6,8-p-Menthadien-2-on)

$C_{10}H_{14}O$, MG 150,2; Sdp: ca. 230 °C, $[\alpha]_D^{20} = +62,5^\circ$ (D-Form)

Chemikalien

Carvi fructus pulv. (710), 50 g

Pentan, 20 cm³

Petrolether (40–60°), 400 cm³

Dichlormethan, 700 cm³

Dimethylsulfoxid, 10 cm³

Ethanol, 96proz. (V/V), 10 cm³

Salzsäure, konz., 1 cm³

2,4-Dinitrophenylhydrazin, 1 g

Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 100 g

Seesand, 10 g

DC-Schichten: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm

Carvon, 10 mm³ (Vergleich)

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Geräte

Apparatur zur kontinuierlichen Wasserdampfdestillation

Rundkolben, NS 29: 1000 cm³ (1), 250 cm³ (2)

Spitzkolben, NS 14,5, 25 cm³

Erlenmeyerkolben, 10 cm³

1 Mikrofilternutsche, D 3, 2 cm³

1 Glasfiltertrichter, D 3, Ø 4 cm mit pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm³

Chromatographiesäule $l = 120$ cm, $\varnothing_1 = 1,5$ cm

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 1000 cm³

Wärmeplatte bis 60 °C

Rotationsverdampfer

Fraktionssammler mit Zubehör

DC-Grundausrüstung

Durchführung

- a) **Gewinnung des etherischen Öles:** 50 g Carvi fructus werden in einem Mixer zerkleinert und mit 500 cm³ Wasser in einem 1000 cm³-Kolben 6 h einer kontinuierlichen Wasserdampfdestillation unterworfen. Als Vorlage dienen 2 cm³ Pentan. Das etherische Öl-Pentan-Gemisch wird wasserfrei in einen 10 cm³-Erlenmeyerkolben abgelassen. Das Pentan wird auf einer Wärmeplatte bei 50° entfernt und der etherische Ölgehalt gravimetrisch bestimmt.

Ausbeute: Je nach Gehalt 1,5–2 g.

b) Säulenchromatographie

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 120$ cm, $\varnothing_1 = 1,5$ cm.

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 100 g.

Elutionsmittel: Petrolether (40–60°), 100 cm³.

Petrolether (40–60°) – Dichlormethan (50 + 50), 100 cm³.

Dichlormethan, 600 cm³.

Aufgabemenge: 1 g eth. Öl.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Fraktionen: ca. 10 cm³.

Ausbeute: ca. 500 mg.

Zeitbedarf: 1,5 Tage.

c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode*: Ja.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: Dichlormethan, KS.

IV. *Nachweis*

1. UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Carvon im mittleren hRf-Bereich des Chromatogramms zeigt Fluoreszenzminderung).

2. Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3), 5–10 min auf 110 °C (Carvon färbt sich rosafarben an).

V. *Untersuchungslösung*: Punktförmige Auftragung:

a) 10 mm³ eth. Öl werden in 2,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon 5 mm³.

b) Ab Fraktion 10 von jeder 3. Fraktion 5–10 mm³.

VI. *Vergleichslösung*

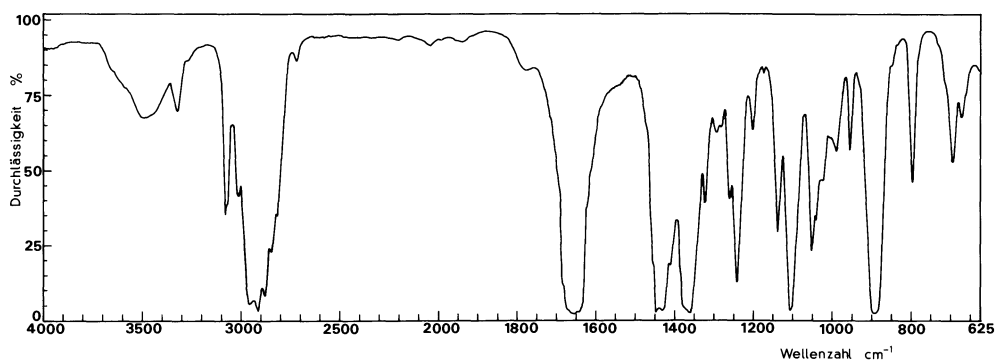
2 mm³ Carvon werden in 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man 5 mm³ punktförmig auf.

Auswertung

1. *Herstellung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons (2,4-DNPH)*

0,5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazon werden im Reagenzglas in 10 cm³ Dimethylsulfoxid gelöst, 0,1 cm³ des isolierten Carvons zugegeben und geschüttelt. Nach Zugabe von 1–2 Tropfen konz. Salzsäure fällt das entsprechende Hydrazon aus. Zur Kristallisation fügt man 2 cm³ Ethanol zu, schüttelt und läßt 1–2 h bei 4 ° stehen. Die feinen Kristalle saugt man auf einem Glasfiltertrichter ab und wäscht mit 2 cm³ Ethanol nach. Nach dem Trocknen liegt der Smp. bei 190 °C.

2. Das *IR-Spektrum* des isolierten Carvons ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Carvon (als Film zwischen zwei Kaliumbromidpreßlingen).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3320	>C=O	Oberschwingung von C=O
3080	exocycl. Doppelbindung	CH-Streckschwingung
3020	endocycl. Doppelbindung	CH-Streckschwingung

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
2985–2815	$-\text{CH}_3$, $>\text{CH}_2$, $-\text{C}-\text{H}$	CH-Streckschwingung
1660	$>\text{C}=\text{O}$ (verschoben wegen Konjugation)	C=O-Streckschwingung
1644	exocycl. Doppelbindung	C=C-Streckschwingung
1448	$-\text{CH}_3$ und $>\text{CH}_2$ (in α -Stellung zu der Doppelbindung)	CH-Beugeschwingung
1431	$>\text{CH}_2$ (in α -Stellung zu C=O)	CH-Beugeschwingung
1364	vermutl. $-\text{CH}_3$	sym. CH-Beugeschwingung
1244	$>\text{C}=\text{O}$	vermutl. CC-Schwingung in Ketonen
895	exocycl. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung
800	endocycl. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung

3. Das *UV-Spektrum* des isolierten Carvons ist aufzunehmen (10 mg Carvon werden in 25 cm^3 Ethanol gelöst, davon wird 1,0 cm^3 mit Ethanol auf 25,0 cm^3 aufgefüllt).

$$\lambda_{\text{max}} = 235 \text{ nm } (\epsilon = 8500).$$

$$\lambda_{\text{max}} = 318 \text{ nm } (\epsilon = 420).$$

Weitere Aufgaben

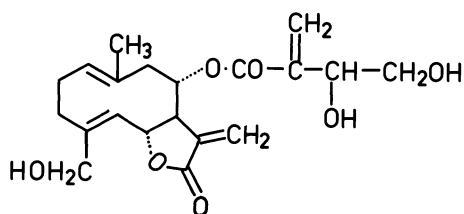
- Welcher Terpenkohlenwasserstoff, der die gleiche Grundstruktur wie Carvon aufweist, ist im etherischen Kümmelöl enthalten? – In welchem etherischen Öl anderer Drogen bzw. Nutzpflanzen ist dieser Kohlenwasserstoff hauptsächlich enthalten?
- Nennen Sie weitere Drogen (Stammpflanze, Familie), die ebenfalls Carvon enthalten!
- Geben Sie Beispiele für acyclische, monocyclische (außer Carvon) und bicyclische Monoterpenketone an!
- Mit welchem gruppenspezifischen Sprühreagenz kann man Ketone und Aldehyde auf der DC-Schicht nachweisen?

2.14 Isolierung von Cnicin aus Kardobenediktenkraut

Prinzip: Grob gepulvertes Kardobenediktenkraut (*Cnicus benedictus* L.) wird mit einem Gemisch von Chloroform und Methanol perkoliert. Aus dem eingengten Perkolat wird Cnicin säulenchromatographisch abgetrennt und durch Umkristallisation rein dargestellt.

Gehalt: 0,3 %.

Strukturformel



Cnicin

$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_7$, MG 378,4; Smp: 143 °C, 330° (Zersetzung)
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +158^\circ$ (c = 2,3 in Ethanol)

Chemikalien

Cardui benedicti herba pulv.

gross. (700), 200 g

Dichlormethan, 4000 cm^3

Methanol, 500 cm^3

Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 220 g

Seesand, 100 g

DC-Schichten: Kieselgel F₂₅₄

Cnicin, 5 mg (Vergleich)

Hydrochinon, 5 mg (Leitsubstanz)

Geräte

Rundkolben, NS 29, 500 cm³ (1), 250 cm³ (1)
 Spitzkolben, NS 14,5, 100 cm³ (1)
 Bechergläser: 2000 cm³ (1), 250 cm³ (1),
 100 cm³ (2), 50 cm³ (1)
 1 Erlenmeyerkolben, 1000 cm³
 1 Glasfiltertrichter, D3, Ø 4 cm,
 mit pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm
 1 Trichter, Ø 4 cm
 1 Perkulationsrohr, $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 5$ cm
 1 Chromatographiesäule, $l = 150$ cm, $\varnothing_i = 2$ cm

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Allgemeine Geräte

Wasserband
 Fraktionssammler mit Zubehör
 Rotationsverdampfer
 DC-Grundausrüstung

Durchführung

a) *Extrakt*: 200 g Cardui benedicti herba pulv. gross. werden portionsweise mit 2000 cm³ eines Gemisches aus Dichlormethan-Methanol (90 + 10) in das Perkulationsrohr eingeschlämmt und über Nacht stehen gelassen. Danach wird mit weiteren 500 cm³ des Gemisches perkoliert. Das Perkolat wird portionsweise in einem 500 cm³ Rundkolben am Rotationsverdampfer bei Temperaturen unter 50 °C eingengt. 10 mm³ werden in 1,0 cm³ Dichlormethan-Methanol (9 + 1) gelöst (= DC-Lösung a).

b) *Säulen-Chromatographie*

Allgemeine Durchführung: Siehe «Säulenchromatographische Trennungen», S. 11.

Chromatographiesäule: $l = 150$ cm, $\varnothing_i = 2$ cm.

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC, 220 g.

Elutionsmittel: Dichlormethan-Methanol (98 + 2), 200 cm³.

Dichlormethan-Methanol (95 + 5), 300 cm³.

Dichlormethan-Methanol (90 + 10), ca. 800 cm³.

Aufgabenmenge: Eingengter Extrakt (a), in Seesand verrieben.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Fraktionen: 10–15 cm³.

Die hauptsächlich Cnicin enthaltenden Fraktionen, die meist noch grünlich-grau gefärbt sind, werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zu einem Volumen von ca. 10 cm³ eingengt. Die eingengte Lösung wird in ein 100 cm³ Becherglas überführt, der Kolben mit wenig Methanol nachgespült. Die vereinigten Lösungen werden mit ca. 100 mg Aktivkohle versetzt, auf dem Wasserbad aufgeköcht und heiß filtriert. Aus dem schwach gelben Filtrat kristallisiert beim Stehenlassen über Nacht Cnicin aus. Die farblosen Kristalle werden über einen Glasfiltertrichter abgesaugt und mit wenig Dichlormethan gewaschen.

Ausbeute: 0,3–0,6 g.

c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode*: Ja.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: Dichlormethan-Methanol (90 + 10), KS.

IV. *Nachweis*

1. UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Cnicin zeigt im unteren Drittel des Chromatogramms eine schwache Fluoreszenzminderung, ebenso die auf gleicher Höhe im Chromatogramm liegende Vergleichssubstanz Hydrochinon).

2. Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3), 5–10 min auf 110 °C. Die Cnicinzone färbt sich bräunlich an; die Vergleichssubstanz Hydrochinon färbt sich gelbbraun an.

V. *Untersuchungslösung*: Punktförmige Auftragung.

1. DC-Lösung a, 10 mm³.

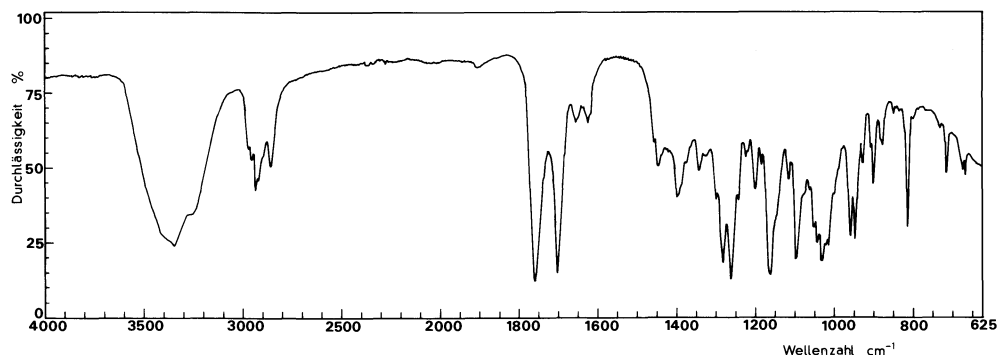
2. von jeder 3. Fraktion 5–10 mm³.

VI. *Vergleichslösung*: 5 mg Cnicin werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 3 mm³ punktförmig auf.

Oder: 5 mg Hydrochinon werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 3 mm³ punktförmig auf.

Auswertung

1. Das IR-Spektrum des isolierten Cnicins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Cnicin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahlen cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3350	–OH	OH-Streckschwingung
3260	>C=O (vermutl.)	C=CO-Oberschwingung
2980–2870	–CH ₃ >CH_2 und $\text{–}\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}\text{–H}$	CH-Streckschwingung
1760	>C=O , im Lacton	C=O-Streckschwingung
1703	>C=O , im Ester	C=O-Streckschwingung
1655	endocycl. Doppelbindung und Doppelbindung in der Kette	CH-Streckschwingung
1625	exocycl. Doppelbindung	C=C-Streckschwingung
1460–1450	–CH ₃ und >CH_2	asym. CH-Beugeschwingung
1400	–OH in –CH ₂ OH	asoz. OH-Beugeschwingung
1280, 1260	>C–O im Ester	CO-Streckschwingung und C–CO–O-Gerüstschwingung
und 1162	–OH in –CH ₂ OH	freie OH-Beugeschwingung
1050–1014	–CH ₂ OH	CO-Streckschwingung
897	exocycl. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung
813	trisubst. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung

2. Der *Schmelzpunkt* (bzw. Zersetzungspunkt) des isolierten Cnicins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

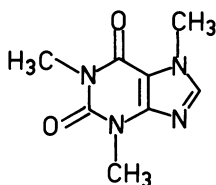
- a) Welche Sesquiterpengrundstrukturen sind in Naturstoffen vertreten? – Zu welchen gehört Cnicin?
- b) Welche anderen Sesquiterpenlactone kommen in Pflanzen vor?
- c) Welche anderen natürlichen Bitterstoffe gibt es? Zu welchen chemischen Stoffgruppen gehören diese und in welchen Drogen sind diese enthalten?

2.15 Isolierung von Coffein aus schwarzem Tee

Prinzip: Aus grob gepulverten Teeblättern (*Camellia sinensis* (L.) O. KUNTZE) wird mit siedendem Wasser Coffein extrahiert. Die mitextrahierten Gerbstoffe werden mit Bleiacetatlösung gefällt. Überschüssige Bleiionen werden mit verdünnter Schwefelsäure ausgefällt; aus diesem mit Ammoniaklösung neutralisierten Filtrat wird Coffein mit Dichlormethan extrahiert.

Gehalt: 2–4 %.

Strukturformel



Coffein (1,3,7-Trimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropurin)
 $C_8H_{10}N_4O_2$, MG 194,2; Subl. p: 180 °C, Smp: 235–238 °C

Chemikalien

Theae folium pulv. gross. (710), 50 g
 Ethanol, 50 cm³
 Petrolether (40–60°), 150 cm³
 Dichlormethan, 350 cm³
 Ammoniaklösung 25proz. (G/V), 30 cm³
 Schwefelsäure 20proz. (G/V), 30 cm³
 basisches Bleiacetat, 10 g
 Natriumsulfat, wasserfrei, 20 g
 DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
 Coffein, 5 mg (Vergleich)
 Theobromin, 5 mg (Vergleich)
 Theophyllin, 5 mg (Vergleich)
 Maté folium pulv. (300), 50 mg
 Colae semen pulv. (300), 50 mg
 Coffeae semen pulv. (300), 50 mg

Allgemeine Geräte

Heizplatte
 Drogenpresse
 Rotationsverdampfer
 TAS-Ofen mit Zubehör
 DC-Grundausrüstung

Geräte

Rundkolben, NS 29, 1000 cm³ (1),
 250 cm³ (1)
 Bechergläser, 1000 cm³ (1),
 600 cm³ (2), 100 cm³ (2),
 2 Erlenmeyerkolben, 200 cm³
 1 Scheidetrichter, 500 cm³
 1 Büchner-Trichter, Ø 10 cm mit
 pass. Guko zu Saugflasche, 1000 cm³
 1 Glasfiltertrichter, D3, Ø 4 cm
 mit pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm³
 2 Trichter, Ø 5 cm
 1 Glasstab, 8 × 350 nm
 Objektträger
 Gazesäckchen

Reagenzien

Jod-Salzsäure (Reag. Nr. 17)

Durchführung

50 g grob gepulverte Teeblätter und 350 cm³ destilliertes Wasser werden unter öfterem Rühren in einem 600 cm³-Becherglas 15 min gekocht. Das Blattmaterial wird in einem Gazesäckchen in einer Drogenpresse stark ausgepresst und nochmals mit 250 cm³ destilliertem Wasser aufgeköcht und erneut abgepresst. Zu den vereinigten Wasserauszügen (= DC-Lösung a) gibt man nach Erwärmen auf 60–70 °C ca. 60–80 cm³ 10proz. (G/V) Bleiacetatlösung, bis sich die Lösung über dem Niederschlag klärt. Der braune Niederschlag wird nach Filtrieren in 200 cm³ Wasser aufgeköcht, nochmals filtriert und verworfen.

Man erhitzt die vereinigten, orangeroten klaren Filtrate zum Sieden und versetzt sie unter Rühren mit 20 cm³ 20proz. (G/V) Schwefelsäure. Nach Absetzen des weißen Bleisulfat-Niederschlags wird durch nochmalige Zugabe von wenig Schwefelsäure auf Vollständigkeit der Fällung geprüft. Die filtrierte Lösung (= DC-Lösung b) wird am Rotationsverdampfer auf 250 cm³ eingengt, abgenutscht und der Rückstand verworfen. Nach dem Abkühlen alkalisiert man mit etwa 20 cm³ 25proz. (G/G) Ammoniaklösung, überführt in einen Scheidetrichter und schüttelt 5 × mit je 20 cm³ Dichlormethan vorsichtig aus (= DC-Lösung c). Die vereinigten, über wasserfreiem Natriumsulfat getrockneten Dichlormethanextrakte werden am Rotationsverdampfer im Vakuum bis fast zur Trockne eingengt. (Vorsicht beim Belüften des Rotationsverdampfers!) Der grauweiße Rückstand wird unter Erhitzen auf dem Wasserbad in möglichst wenig Dichlormethan aufgelöst und unter Nachspülen mit Dichlormethan in ein 100 cm³ Becherglas filtriert. Man engt die filtrierte Lösung auf dem Wasserbad soweit ein, bis nach Zugabe von 1–2 cm³ Petrolether (40–60°) eine Trübung eintritt. Man setzt in der Hitze einige Tropfen Dichlormethan hinzu, bis die Lösung wieder klar geworden ist. Bei längerem Stehen bei 4 °C fällt Coffein kristallin aus, das über einen Glasfiltertrichter abgesaugt wird.

Ausbeute: 0,3–0,5 g.

Zeitbedarf: 1 Tag.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Dichlormethan-Ethanol-konz. Ammoniaklösung (97 + 2 + 1), KS, 10 cm.

IV. Nachweis

a) TAS-Verfahren: Je 10 mg von Theae folium, Colae semen, Coffeae semen und Maté folium, *Verweilzeit*: 2 min, *Temperatur*: 250 °C.

b) bandförmige Auftragung (10 × 3 mm)

a) DC-Lösung a: 10 mm³

b) DC-Lösung b: 10 mm³

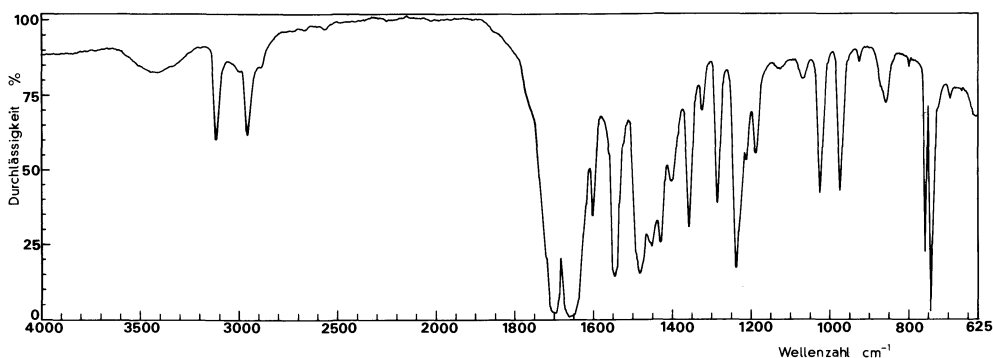
c) DC-Lösung c: 5 mm³

} unter Warmluftstrom auftragen.

d) isoliertes Coffein: 5 mg in 5 cm³ Ethanol, davon trägt man 5 mm³ auf.

VI. Vergleichslösung: Je 5 mg Coffein, Theobromin und Theophyllin werden in je 5 cm³ Ethanol gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) auf.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Coffeins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Coffein (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3120	vermutl. $-\text{N}=\text{C}-$ H	CH-Streckschwingung
2950	$-\text{CH}_3$	CH-Streckschwingung
1695	$>\text{C}=\text{O}$ (Carbonamid)	C=O-Streckschwingung
1655	$>\text{C}=\text{O}$ Vinyloges Carbonamid und evtl. $\text{N}-\text{CO}-\text{N}$	C=O-Streckschwingung
1595, 1550 und 1450	Pyrimidin-System	C=N-Streckschwingung
1479	$-\text{CH}_3$	asym. CH-Beugeschwingung
1355	$-\text{CH}_3$	sym. CH-Beugeschwingung
1236, 1185 und 1022	$>\text{C}=\text{N}-$	C=N-Streckschwingung
744	$-\text{C}-\text{H}$ im Fünfring (?)	CH-Beugeschwingung

3. Das UV-Spektrum des isolierten Coffeins ist aufzunehmen (50 mg Coffein werden in 50,0 cm^3 Wasser gelöst, davon wird 1 cm^3 mit Wasser auf 100 cm^3 aufgefüllt).
 $\lambda_{\text{max}} = 274 \text{ nm}$ ($\varepsilon = 10000$).

4. Der Schmelzpunkt des isolierten Coffeins ist im geschlossenen Schmelzpunktsröhrchen zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

- Welche weiteren xanthinderivathaltigen Drogen werden verwendet?
- Was sind die Unterschiede zwischen grünem und schwarzem Tee?
- Welche Gerbstofftypen sind in Theae folium enthalten?
- Wie unterscheiden sich die pK_s und pK_b -Werte der drei Xanthinderivate?
- Wie kann man außer durch chromatographische Verfahren Theophyllin neben Theobromin und Coffein nachweisen?
- Welche Herkunft und Arten von Kaffee sind von weltwirtschaftlicher Bedeutung? Wie hoch ist der durchschnittliche Coffeingehalt in geröstetem Kaffee?

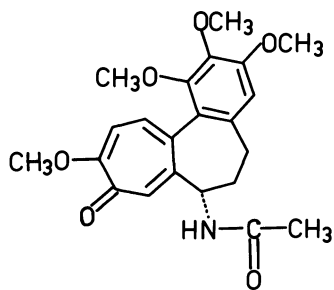
2.16 Isolierung von Colchicin aus Herbstzeitlosensamen

Beachte: Colchicin gehört zu den am stärksten wirkenden Giften!

Prinzip: Gemahlene Herbstzeitlosensamen (*Colchicum autumnale* L.) werden zur Abtrennung der fetten Öle mit Petrolether extrahiert. Aus dem Drogenrückstand werden die Alkaloide mit Dichlormethan extrahiert. Aus diesem eingeeengten Extrakt wird Colchicin säulenchromatographisch abgetrennt.

Gehalt: 0,2–0,6 %.

Strukturformel



Colchicin

$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_6$, MG 399,4; Smp: 155–157 °C, 160–164 °C (DAB 8)
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -235$ bis -245° ($c = 0,5\text{proz. in Ethanol}$)

Chemikalien

Colchici semen pulv. (300), 50 g
 Petrolether (40–60 °C), 400 cm³
 Dichlormethan, 1000 cm³
 Aceton, 100 cm³
 Diethylamin, 40 cm³
 Natriumsulfat, wasserfrei, 10 g
 Aktivkohle, 500 mg
 Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 75 g
 Seesand, 10 g
 DC-Schichten: Kieselgel F₂₅₄
 Colchicin, 5 mg (Vergleich)

Geräte

1 Extraktionsapparat nach Soxhlet,
 250 cm³ mit pass. Rückflußkühler
 1 Rundkolben, 500 cm³
 Spitzkolben, NS 14,5: 50 cm³ (2), 100 cm³ (1)
 Bechergläser: 100 cm³ (1), 50 cm³ (2)
 2 Trichter, Ø 5 cm
 1 Glasfiltertrichter, D 3, Ø 5 cm
 mit pass. Guko zu Saugfinger, 25 cm³
 1 Chromatographiesäule, l = 70 cm, Ø_i = 2 cm

Reagenzien

Molybdätophosphorsäure (Reag. Nr. 21)
 Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Allgemeine Geräte

Rotationsverdampfer
 Fraktionssammler mit Zubehör
 Wasserbad
 DC-Grundausrüstung

Durchführung: (im diffusen Tageslicht) – Colchicin ist lichtempfindlich.

a) *Extrakt:* 50 g gepulverte Colchici semen (300) werden in einer Soxhlet-Apparatur (250 cm³) 1 h mit 350 cm³ Petrolether (40–60 °C) extrahiert. Der Petrolether-Extrakt (= DC-Lösung a) wird verworfen. Der Drogenrückstand wird ohne vorher zu trocknen in der gleichen Apparatur mit 350 cm³ Dichlormethan 2 h weiter extrahiert. Der Dichlormethan-Extrakt (= DC-Lösung b) wird am Rotationsverdampfer bei Wasserbadtemperaturen um 50 °C lösungsmittelfrei eingengt (ca. 2,5 g Extrakt).

b) *Säulenchromatographie* (im abgedunkelten Raum)

Allgemeine Durchführung: Siehe S.11: «Säulenchromatographische Isolierungen».

Chromatographiesäule: l = 70 cm, Ø_i = 2,0 cm (mit Aluminiumfolie ummantelt)

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 75 g.

Elutionsmittel:

Dichlormethan, 100 cm³

Dichlormethan-Aceton (90 + 10), 200 cm³

Dichlormethan-Aceton-Diethylamin (80 + 15 + 5), 200 cm³

Dichlormethan-Aceton-Diethylamin (70 + 20 + 10), 400 cm³

Aufgabemenge: ca. 2 g lösungsmittelfreier Dichlormethan-Extrakt.

Tropfgeschwindigkeit: 2 Tropfen/s.

Fraktionen: ca. 15 cm³.

Die Colchicin-haltigen Fraktionen werden vollständig eingengt, bis der Geruch nach Diethylamin verschwunden ist, in ca. 1 cm³ Dichlormethan aufgenommen, in ein Becherglas von 50 cm³ überführt, auf dem Wasserbad weitgehend eingengt und unter Rühren mit ca. 5 cm³ Ether versetzt. Das Colchicin fällt als gelblich-weißer amorpher Niederschlag aus, der über einen Glasfiltertrichter abgesaugt und im Dunkeln an der Luft getrocknet wird.

Ausbeute: ca. 200 mg.

Gegebenenfalls kann das erhaltene Colchicin durch Umkristallisation weiter gereinigt werden. Dazu wird das erhaltene Produkt (ca. 200 mg) in 10 cm³ Dichlormethan unter Zusatz von ca. 100 mg Aktivkohle kurz aufgekocht und filtriert. Der Filtrerrückstand wird mit 2 cm³ Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird auf dem Wasserbad weitgehend eingengt und danach erneut mit Ether versetzt, so daß das Colchicin amorph ausfällt.

Zeitbedarf: 2 Tage.

c) *Dünnschicht-Chromatographie*I. *Standardmethode*: Ja.II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.III. *Fließmittel*: Dichlormethan-Aceton-Diethylamin (50 + 40 + 10), KS.IV. *Nachweis*: Abdampfen des Fließmittels bei 110 °C.1. UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Colchicin im mittleren R_f-Bereich als Hauptzone und kleinere Zonen der Nebenalkaloide oberhalb und unterhalb der Colchicinzone zeigen Fluoreszenzminderung).2. UV₃₆₅: Fluoreszierende Zonen markieren (Colchicin zeigt eine ockergelbe Fluoreszenz; eine blau fluoreszierende Zone in Startpunktnähe entspricht dem Colchicein).

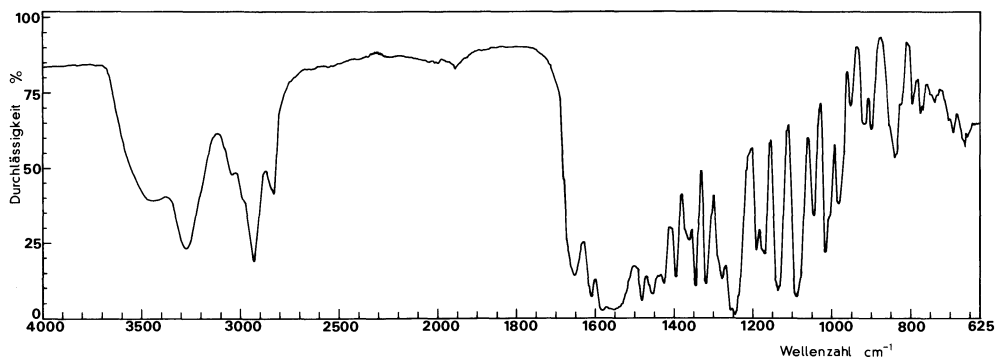
3. Besprühen einer Mischung (1 + 1) aus Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) und Molybdatophosphorsäure (Reag. Nr. 21) und anschließend 5 min auf 110 °C erhitzen. (Colchicin färbt sich hellblau an)

V. *Untersuchungslösung*: Punktförmige Auftragung:1. 5 mm³ eingedampfte DC-Lösung b werden in 0,5 cm³ Dichlormethan gelöst, davon 5 mm³.2. Ab Fraktion 10 von jeder 3. Fraktion 5–10 mm³.VI. *Vergleichslösung*: 5 mg Colchicin werden in 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man 5 mm³ punktförmig auf.**Auswertung**1. *Abschließende DC*

DC-Bedingungen I.–IV. und VI. wie oben unter c).

V. *Untersuchungslösung*: Bandförmige Auftragung (3 × 10 mm):a) DC-Lösung a, 10 mm³.b) DC-Lösung b, 10 mm³.c) Mutterlauge der Colchicinfällung, 10 mm³.d) Rein-Colchicin: 5 mg werden in 1,0 cm³ Chloroform gelöst, davon trägt man 10 mm³ auf.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Colchicins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Colchicin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3450	–NH–	freie NH-Streckschwingung
3250	–NH–	assoz. NH-Streckschwingung
3050	Aromat	CH-Streckschwingung

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
2940	$-\text{CH}_3$ und $>\text{CH}_2$	CH-Streckschwingung
2840	$-\text{OCH}_3$	CH-Streckschwingung
1660	$>\text{C}=\text{O}$ (in $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$)	C=O-Streckschwingung
1615	$>\text{C}=\text{O}$ im Tropolon-Ring	C=O-Streckschwingung
1590–1485	Aromat und $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$	CC-Streckschw., NH-Beugeschw. oder sym. $\text{O}=\text{C}-\text{N}$ -Streckschwingung
1459	$-\text{OCH}_3$	asym. CH-Beugeschwingung
1430	$-\text{CH}_3$ in $(-\text{CO}-\text{CH}_3)$	asym. CH-Beugeschwingung
1350	$-\text{CH}_3$ in $(-\text{CO}-\text{CH}_3)$	sym. CH-Beugeschwingung
1250	$\text{Ar}-\text{OCH}_3$ (arom.-aliph. Ether)	asym. CO-Streckschwingung
1020	vermutl. $\text{Ar}-\text{O}-\text{CH}_3$	sym. CO-Streckschwingung
845–830	isol. H am Aromat sowie 2 benachbarte H am Aromat	CH-Beugeschwingung

3. Das *UV-Spektrum* des isolierten Colchicins ist aufzunehmen (5 mg werden in 25 cm^3 Ethanol gelöst, davon wird 1 cm^3 mit Ethanol auf 25 cm^3 aufgefüllt).

$$\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm } (\epsilon = 16000).$$

$$\lambda_{\text{max}} = 240 \text{ nm } (\epsilon = 29000).$$

4. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Colchicins ist zu bestimmen.

Beachte: Die letzten Reste des Chloroforms werden hartnäckig festgehalten, so daß der Schmelzbereich niedriger liegt ($148\text{--}153^\circ\text{C}$); durch Trocknen in der Vakuumpistole bei 80°C wird ein höherer Schmelzpunkt erreicht.

Weitere Aufgaben

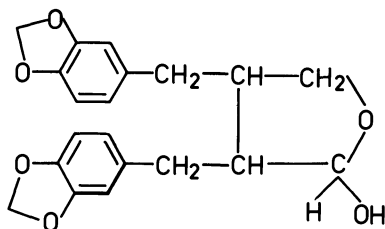
- Welche Nebenalkaloide sind in Colchici semen enthalten? Wie unterscheiden sie sich strukturell?
- Wozu wird Colchicin therapeutisch verwendet? Wie wirkt Colchicin außerdem?
- Welche Ringsysteme weist das Colchicin-Molekül auf?
- Von welcher Aminosäure kann Colchicin biogenetisch abgeleitet werden?

2.17 Isolierung von Cubebin aus Kubebenpfeffer

Prinzip: Gepulverte Kubeben (*Piper cubeba* L. fil.) werden mit Dichlormethan extrahiert. Aus dem eingeeengten Extrakt wird Cubebin säulenchromatographisch abgetrennt und anschließend umkristallisiert.

Gehalt: 2,5 %.

Strukturformel



Cubebin

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$, MG 356,4; Smp: $131\text{--}132^\circ\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -45,6^\circ$ ($c = 5$ in Chloroform)

Chemikalien

Cubebae fructus pulv. (310), 100 g
 Dichlormethan 2500 cm³
 Petrolether (40–60°), 200 cm³
 Essigsäureethylester, 500 cm³
 Schwefelsäure 80proz. (G/V), 10 cm³
 Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 250 g
 Seesand, 20 g
 Aktivkohle, 1 g
 DC-Schichten: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
 Cubebin, 5 mg (Vergleich)
 Piperin, 5 mg (Vergleich)

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Geräte

Rundkolben, NS 29, 250 cm³ (2), 500 cm³ (1)
 2 Spitzkolben, NS 14,5, 100 cm³
 1 Extraktionsapparat nach Soxhlet (300 cm³)
 Bechergläser: 250 cm³ (2),
 100 cm³ (3), 50 cm³ (2)
 Trichter: Ø 8 cm, Ø 6 cm (je 1), Ø 5 cm (2)
 1 Glasfiltertrichter, D 3, Ø 6 cm
 mit pass. Guko für Saugrohr, 20 cm³
 1 Chromatographiesäule, l = 120 cm, Ø_i = 2,5 cm

Allgemeine Geräte

Rotationsverdampfer

Wasserbad

DC-Grundausrüstung

Durchführung

- a) *Extrakt*: 100 g Cubebae fructus, pulv. (300) werden in einer Extraktionsapparat nach Soxhlet (250 cm³) 6 h mit 400 cm³ Dichlormethan extrahiert. Der Dichlormethan-Extrakt, der vorteilhafter zur Entfernung von mit übergegangenen Schwebstoffen über ein hartes Filterpapier filtriert wird, wird am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von ca. 50 °C lösungsmittelfrei eingengt. 10 mm³ des Extrakts werden in 1 cm³ Dichlormethan gelöst (= DC-Lösung a).

Ausbeute: ca. 18 g.

- b) *Säulenchromatographie*

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: l = 120 cm, Ø_i = 2,5 cm

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 250 g.

Elutionsmittel: Dichlormethan 200 cm³.

Dichlormethan-Essigsäureethylester (90 + 10), 200 cm³.

Dichlormethan-Essigsäureethylester (80 + 20), 1000 cm³.

Aufgabemenge: 18 g.

Tropfgeschwindigkeit: 1–2 Tropfen/s.

Zur *Schnellprüfung auf Cubebin* in den Fraktionen dient folgender Test: 1–2 Tropfen des Eluats werden in einem Reagenzglas mit 1 Tropfen 80proz. (G/V) Schwefelsäure versetzt. Beim Vorhandensein von Cubebin tritt eine Rotfärbung ein. Das aus den entsprechenden Fraktionen nach Einengen erhaltene noch bräunlich gefärbte Rohcubebin (5 mg werden in 1 cm³ Dichlormethan gelöst = DC-Lösung b) wird mit gerade so viel Dichlormethan versetzt, daß es sich bei einer Wasserbadtemperatur von 60 °C auflöst. Diese Lösung wird mit ca. 100 mg Aktivkohle versetzt, auf dem Wasserbad kurz aufgeköcht und heiß in ein Becherglas abfiltriert. Auf dem Wasserbad wird das Filtrat bis zu einem Volumen von ca. 5 cm³ eingengt. Nach dem Abkühlen setzt man gerade so viel Petrolether (40–60 °C) hinzu, bis eine Trübung eintritt und erhitzt dann auf dem Wasserbad, bis wieder eine klare Lösung entstanden ist. Klärt sich die Lösung nicht mehr, so setzt man wieder einige Tropfen Dichlormethan hinzu. Nach 12 h bis 24 h Stehen bei 4 °C scheiden sich farblose Kristalle von Cubebin aus, die über einen Glasfiltertrichter abgesaugt werden (10 mm³ Mutterlauge werden mit 1,0 cm³ Dichlormethan versetzt = DC-Lösung c). Ist die Substanz noch nicht ganz farblos, wird in der gleichen Weise umkristallisiert. Aus der Mutterlauge scheiden sich beim Stehenlassen noch mehr oder weniger farblose Kristalle von Cubebin aus.

Ausbeute: 1,2–1,5 g.

Zeitbedarf: 2,5 Tage.

- c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. Standardmethode: Ja; Abweichung: 15 cm Laufstrecke.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Dichlormethan-Essigsäureethylester (80 + 20), 15 cm, KS.

IV. Nachweis

- UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Cubebin im mittleren hRf-Bereich zeigt eine schwache Fluoreszenzminderung).
- Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3), im Tageslicht betrachten. Cubebin färbt sich blau-violett an, beim anschließenden 5–10 min Erhitzen auf 100–110 °C verstärkt sich die Farbe.

V. Untersuchungslösung: Punktförmige Auftragung:

- DC-Lösung a, 10 mm³.
- Ab Fraktion 10 von jeder 3. Fraktion 5–10 mm³.

VI. Vergleichslösung: 5 mg Cubebin oder Piperin werden in 1 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man 2 mm³ punktförmig auf. Piperin liegt im Chromatogramm etwas tiefer als Cubebin und zeigt im UV₃₆₅ eine hellblaue Fluoreszenz.

Auswertung

1. Abschließende DC.

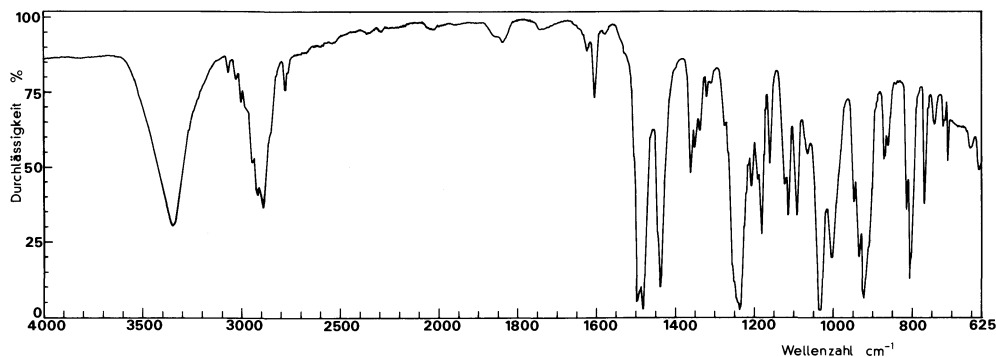
I.–IV. wie bei c).

V. Untersuchungslösung: Bandförmige Auftragung (10 × 3 mm) je 10 mm³:

- DC-Lösung a (Extrakt)
- DC-Lösung b (Rohcubebin).
- DC-Lösung c (Mutterlauge).
- umkristallisiertes Cubebin: 5 mg werden in 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst.

VI. wie bei c).

2. Das IR-Spektrum des isolierten Cubebins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Cubebin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3340	–OH	OH-Streckschwingung
3065, 3030 und 3000	Aromat	CH-Streckschwingung
2945–2890	>CH ₂ und $\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{H} \end{array}$	CH-Streckschwingung
2780	$\begin{array}{c} \text{O}- \\ \text{H}_2\text{C} < \\ \text{O}- \end{array}$	CH-Streckschwingung
1606	Aromat	CC-Streckschwingung
1500–1485	Aromat	CC-Streckschwingung
1440	>CH ₂	asym. CH-Beugeschwingung

Geräte

1 Extraktionsapparatur (250 cm ³) nach Soxhlet	2 Erlenmeyerkolben, 500 cm ³
1 Rundkolben, NS 29, 500 cm ³	1 Glasfiltertrichter, D3, Ø 5 cm mit pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm ³
2 Spitzkolben, NS 14,5, 100 cm ³	1 Chromatographiesäule mit Kühl- mantel, $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 1,5$ cm
Bechergläser: 50 cm ³ (1), 100 cm ³ (1)	

Durchführung

- a) *Extrakt*: 60 g *Valerianae wallichii radix*, pulv. (300) werden in einer 250 cm³ Extraktionsapparatur nach Soxhlet 6 h mit 350 cm³ Dichlormethan im 500 cm³-Rundkolben auf dem Wasserbad extrahiert (*keinesfalls* in einem Heizpilz!). Der Extrakt wird über ein *hartes* Filterpapier filtriert und portionsweise in einem 100 cm³-Spitzkolben am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C (!) bis zur Gewichtskonstanz eingengt.

Ausbeute: ca. 2,5–4,0 g.

- b) *Säulenchromatographie*

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 1,5$ cm (mit Kühlmantel)

Stationäre Phase: 200 g Aluminiumoxid, basisch, Aktivität II–III werden in einem 500 cm³ Erlenmeyerkolben mit 200 cm³ eines Gemisches aus Petrolether (40–60°) und Essigsäure (98 + 2) versetzt, gut durchgeschüttelt und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur in die gekühlte Chromatographiesäule gefüllt. Die stationäre Phase wird mit Petrolether (ca. 500 cm³) so lange perkoliert, bis das auslaufende Eluat auf einem angefeuchteten Indikatorpapier keine saure Reaktion mehr zeigt. (Das Petrolether-Essigsäure-Eluat wird mit 100 cm³ einer 5proz. (G/V) Natriumhydrogencarbonatlösung in einem Scheidetrichter neutralisiert, die überstehende Petroletherphase wird über wasserfreiem Natriumsulfat grtrocknet und als Elutionsmittel verwendet.)

Elutionsmittel:

Petrolether (40–60°)-Ethylmethylketon (98 + 2), 100 cm³.

Petrolether (40–60°)-Ethylmethylketon (95 + 5), 100 cm³.

Petrolether (40–60°)-Ethylmethylketon (90 + 10), 200 cm³.

Petrolether (40–60°)-Ethylmethylketon (85 + 15), 200 cm³.

Petrolether (40–60°)-Ethylmethylketon (80 + 20), 300 cm³.

Aufgabemenge: Eingengter Dichlormethan-Extrakt.

Sollte nach Aufgaben des Extrakts die Säule verstopft sein, ist mit einem Glasstab die Seesandschicht aufzurühren und so viel Seesand hinzuzugeben, bis der gesamte Extrakt sich im Seesand befindet.

Tropfgeschwindigkeit: 1–2 Tropfen/s.

Fraktionen: ca. 10 cm³.

Das beim Einengen der entsprechenden Fraktionen ölig anfallende Didrovaltrat wird in ca. 2–5 cm³ Petrolether (40–60°) aufgenommen, in ein Becherglas überführt, der Kolben wird 2–3mal mit je 5 cm³ Petrolether (40–60°) gespült. Die vereinigten Petroletherphasen werden auf dem Wasserbad bis zu einem Volumen von ca. 5 cm³ eingengt und in den Kühlschrank gestellt. Das über Nacht watteähnlich ausgefallene Didrovaltrat wird über einen Glasfiltertrichter abgesaugt und mit wenig kaltem Petrolether (40–60°) nachgewaschen.

Ausbeute: 0,5–1 g.

Zeitdauer: 2–3 Tage.

- c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode*: Ja, Abweichung: Zweifachentwicklung.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: n-Hexan-Ethylmethylketon (80 + 20), KS, 2 × 10 cm.

IV. *Nachweis*

1. UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren.

2. 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Essigsäure-Salzsäure-Reagenz (Reag. Nr. 10), 5–10 min auf 110 °C. (Didrovaltrat tritt im mittleren hRf-Bereich als ockerfarbene Zone auf schwach gelbem Untergrund auf. Die Vergleichssubstanz Anisaldehyd liegt direkt über der Didrovaltratzone und färbt sich orange an.)

V. *Untersuchungslösung*: Punktförmige Auftragung.

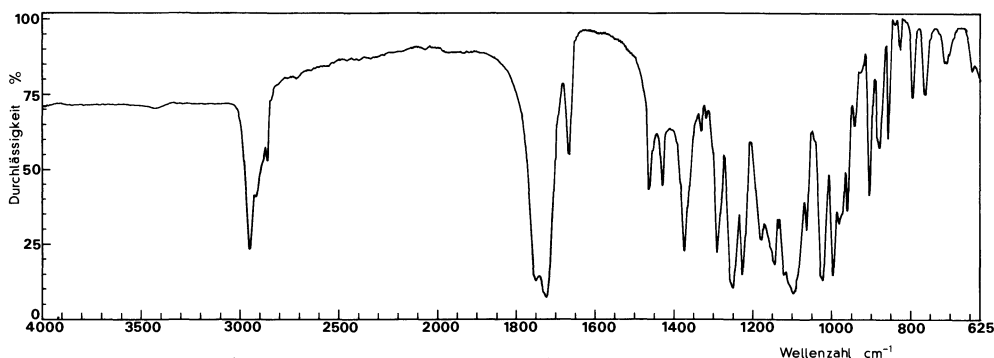
1. 5 mm³ des eingengten Dichlormethanextrakts werden mit 0,5 cm³ Essigsäureethylester versetzt, davon trägt man 5–10 mm³ auf.

2. Ab Fraktion 20 von jeder 3. Fraktion 5–10 mm³.

VI. *Vergleichslösung*: 5 mm³ Anisaldehyd werden in 5 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man 5–10 mm³ punktförmig auf.

Auswertung

1. Das *IR-Spektrum* des isolierten Didrovaltrats ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Didrovaltrat (2 mg/200 g Kaliumbromid)

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
2960–2870	–CH ₃ , >CH ₂ und –C–H	C–H-Streckschwingung
1755 und 1730	C=O	C=O-Streckschwingung
1670	C=C-Doppelbindung	C=C-Streckschwingung
1465 und 1431	–CH ₃ und >CH ₂	asym. CH-Beugeschwingung und CH-Beugeschwingung
1373	–CH ₃	sym. C–H-Beugeschwingung
1252	Epoxid	CO-Streckschwingung
1252 und 1237	Ester	CO-Streckschwingung
1182 und 1148	Isopropyl	CC-Gerüstschwingung
1100	Ether	CO-Streckschwingung
905–860	Epoxid	CO-Streckschwingung
798	vermutl. Isopropyl oder/und trisubst. Doppelbindung	Gerüstschwingung C–H-Beugeschwingung

2. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Didrovaltrats ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

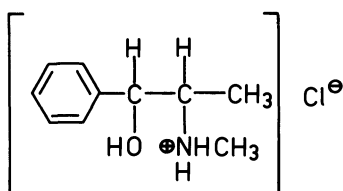
- In welche Klasse von Naturstoffen werden die Valepotriate ihrer Grundstruktur nach eingeordnet?
- Welche weiteren Valepotriate sind bisher bekannt? – Wodurch unterscheiden sie sich strukturell?
- Wie ist die qualitative und quantitative Valepotriatzusammensetzung der offizinellen Baldrianwurzel?

2.19 Isolierung von L-Ephedrin (als Hydrochlorid) aus Ephedrakraut

Prinzip: Aus gepulvertem Ephedrakraut (*Ephedra sinica* STAPF) werden die Alkaloide mit Natriumcarbonatlösung freigesetzt und durch Perkolation mit Dichlormethan extrahiert. Die Reinigung erfolgt durch mehrfaches Überführen zwischen der Basen- und Salzform. Die Alkaloidbasen werden dann aus der organischen Phase mit Chlorwasserstoff ausgefällt. Das Ephedrinhydrochlorid erhält man durch fraktionierte Kristallisation.

Gehalt: 1–2 %.

Strukturformel



Ephedrinhydrochlorid

$C_{10}H_{16}ClNO$, MG 201,7; Smp: 217–220 °C, $[\alpha]_D^{20} = -36,6^\circ$ (c = 5 in Wasser)

Chemikalien

Ephedrae herba pulv. (710), 100 g
 Dichlormethan, 1500 cm³
 Ether, 50 cm³
 Ethanol, 100 cm³
 Aceton, 150 cm³
 Methanol, 200 cm³
 Natriumcarbonat, 50 g
 Kaliumcarbonat, 50 g
 Natriumchlorid, 10 g
 Natriumsulfat, wasserfrei, 20 g
 Salzsäure conc., 250 cm³
 Salzsäure 0,5 N, 150 cm³
 Schwefelsäure conc., 100 cm³
 Aktivkohle, 2 g
 Seesand, 50 g
 DC-Schicht, Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
 Ephedrin, 5 mg (Vergleich)

Reagenzien

Ninhydrin-Reagenz (Reag. Nr. 20)

Allgemeine Geräte

Wasserbad
 Rotationsverdampfer
 DC-Grundausrüstung

Durchführung

100 g grob gepulvertes Ephedrakraut werden zu einer Lösung von 50 g Natriumcarbonat in 150 cm³ Wasser in einem 1000 cm³ Becherglas gegeben, mit einem Glasstab durchmischt und 2 h stehen gelassen. Man füllt das Perkolationsrohr zu einem Drittel mit Dichlormethan und verschließt die Öffnung vor dem Hahn mit einem Glaswattebausch, der mit einer Seesandschicht

Geräte

1 Rundkolben, NS 29, 500 cm³
 1 Rundkolben, NS 29, 250 cm³ mit bis fast auf den Boden reichendem Gaswaschflaschen-aufsatz nach DRECHSEL
 1 Dreihals-Rundkolben, 500 cm³ mit NS Hülzen 14,5 oder 29, passend für
 a) Tropftrichter, b) Absaugbügel, c) Glasstopfen
 Erlenmeyerkolben: 500 cm³, 100 cm³
 Bechergläser: 1000 cm³, 250 cm³ (je 3), 50 cm³ (2)
 Scheidetrichter: 250 cm³, 500 cm³
 1 Büchnertrichter, Ø 6 cm mit pass. Guko zu Saugflasche, 100 cm³
 Glasfiltertrichter, D 3, Ø 5 cm mit pass. Guko zu 100 cm³ Saugflasche
 3 Gaswaschflaschen: 250 cm³ mit Aufsatz
 Glasstab, 8 × 700 mm
 Perkolationssäule, 5 × 50 cm
 PVC-Schlauch (trocken), 150 cm

von ca. 1 cm Höhe beschwert wird. Der Drogenbrei wird portionsweise in die so vorbereitete Perkolationssäule überführt. – Die Droge soll sich luftblasenfrei im Perkulationsrohr absetzen. – Die Droge wird mit einem Glaswattebausch abgedeckt und leicht zusammengedrückt. Man perkoliert durch kontinuierliche Zugabe von 1000 cm³ Dichlormethan. Das Perkolat wird portionsweise in einem 500 cm³-Rundkolben am Rotationsverdampfer eingeeengt bis zu einem Volumen von 5 cm³ [Davon werden 5 mm³ mit 0,5 cm³ Chloroform verdünnt (= DC-Lösung a)]. Der eingeengte Extrakt wird mit 30 cm³ Ether versetzt. Die etherische Lösung wird in einem 250 cm³-Scheidetrichter dreimal mit je 50 cm³ 0,5 N-Salzsäure ausgeschüttelt. Die vereinigten, salzsauren Extrakte werden über einen Trichter mit Faltenfilter, in dem sich 50 g Kaliumcarbonat befinden, in einen 500 cm³-Scheidetrichter filtriert. In diesem wird die neutrale bis alkalische Lösung viermal mit je 75 cm³ Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten Dichlormethanauszüge werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und portionsweise in einem 250 cm³-Rundkolben am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das anfallende gelborange-farbene Öl (5 mm³ werden in 1 cm³ Chloroform verdünnt = DC-Lösung b) wird in einer Mischung aus 20 cm³ Ether und 20 cm³ Dichlormethan aufgenommen. Auf den 250 cm³-Rundkolben setzt man den passenden Gaswaschflaschenaufsatz. Falls keine Chlorwasserstoff-Gasflasche zur Verfügung steht, wird aus einer Gasentwicklungsapparatur, bestehend aus einem 500 cm³-Dreihals-Rundkolben mit passendem Gasableitungsrohr und einem 100 cm³-Tropftrichter durch tropfenweise Zugabe von 20 cm³ konz. Schwefelsäure zu 10 g Kochsalz Chlorwasserstoff entwickelt. Über PVC-Schlauchverbindungen durchströmt das Gas zum Trocknen erst eine mit 50 cm³ konz. Schwefelsäure beschickte Waschflasche. Nach Passieren einer nachgeschalteten Sicherheitswaschflasche wird der getrocknete Chlorwasserstoff in die etherische Alkaloidbasenlösung eingeleitet. Der überschüssige Chlorwasserstoff wird in eine Waschflasche mit 10proz. Natronlauge geleitet. Nach etwa 10 min bildet sich in der etherischen Lösung infolge Fällung der Alkaloidhydrochloride ein schmutzigweißer Niederschlag von Ephedrinhydrochlorid neben Hydrochloriden der Begleitalkaloide. Daraufhin wird die Chlorwasserstoffzufuhr abgebrochen und sämtliche Schlauchverbindungen der Gasentwicklungsapparatur gelöst, um ein Zurücksaugen der Sperrflüssigkeiten zu vermeiden. Das Rohalkaloidgemisch wird über einen Büchner-Trichter abgesaugt [10 mm³ der Mutterlauge werden mit 0,1 cm³ Chloroform verdünnt = DC-Lösung c]. – Das Rohalkaloidgemisch (5 mg in 1,0 cm³ Methanol = DC-Lösung d) wird in einem 250 cm³ Becherglas mit ca. 30 cm³ Aceton versetzt, auf dem Wasserbad unter portionsweisem Zusatz von Methanol (ca. 10 cm³) erhitzt, bis es sich vollständig aufgelöst hat. Man gibt dann eine Spatelspitze Aktivkohle hinzu, kocht auf und filtriert. Zu dem Filtrat gibt man gerade so viel Aceton, bis das Ausfallen der Kristalle beginnt. Das beim Abkühlen nach längerer Zeit (6 h) ausgefallene kristalline Produkt wird über einen Glasfiltertrichter abgesaugt, mit wenig Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. – Falls noch kein dc-einheitliches Produkt vorliegt, wird fraktioniert umkristallisiert; dazu wird das erhaltene Produkt in der 15fachen Menge Methanol gelöst, mit der 100fachen Menge Aceton versetzt und ca. 6 h bei 4° stehen gelassen. Die danach ausgefallenen Kristalle werden über einen Glasfiltertrichter abgesaugt. (Nach ein- bis zweimaligem Umkristallisieren wird ein dc-einheitliches Ephedrin-Hydrochlorid erhalten.)

Ausbeute: 0,5–1,5 g.

Zeitbedarf: 2 Tage.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. *Standardmethode:* Ja.

II. *Schicht:* Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel:* Ethanol-Dichlormethan-konz. Ammoniaklösung. (49 + 49 + 2), KS, 10 cm

IV. *Nachweis*

1. UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Ephedrin im unteren Drittel des Chromatogramms (hRf 20–25) und darüber ein Begleitalkaloid (hRf 35–40) zeigen eine schwache Fluoreszenzminderung).

2. Ninhydrin-Reagenz (Reag. Nr. 20), 5–10 min auf 110° erhitzen. (Ephedrin und die Begleitalkaloide färben sich tiefrot an).

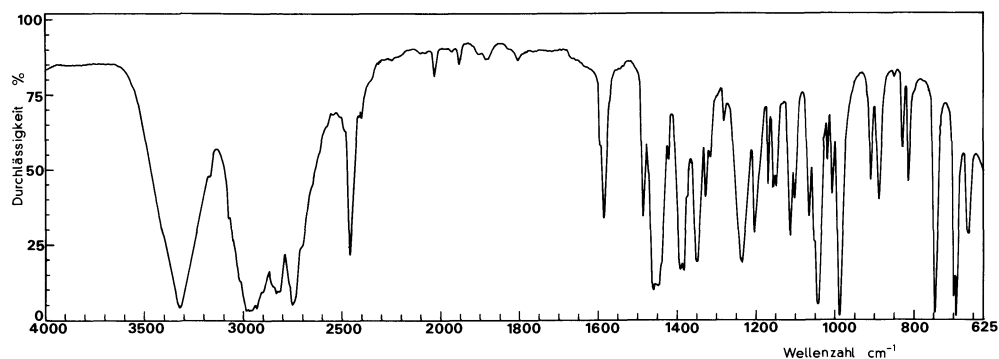
V. *Untersuchungslösung*: (Bandförmige Auftragung, 10 × 3 mm)

Je 10 mm³ der DC-Lösungen a–d.

VI. *Vergleichslösung*:

5 mg Ephedrinhydrochlorid werden in 1,0 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) auf.

2. Das *IR-Spektrum* des isolierten Ephedrinhydrochlorids ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Ephedrinhydrochlorid (2 mg/200 mg Kaliumbormid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3325	–OH und sek. Amin	NH- u. OH-Streckschwingung
2990–2938	–CH ₃ und –C–H	CH-Streckschwingung
2835	–CH ₃ (am N)	CH-Streckschwingung
2765 und 2460	≥NH	NH-Streckschwingung
1590	Aromat und –NH	CC-Streckschwingung und –NH-Beugeschwingung
1490	Aromat	CC-Streckschwingung
1470–1450	–CH ₃ (am C u. N) und Aromat	asym. C–H-Beugeschwingung und CC-Streckschwingung
1420	–OH	asoz. –OH-Beugeschwingung
1385	–CH ₃	sym. CH-Beugeschwingung
1240 oder 1205	–OH	freie OH-Beugeschwingung
1115 oder 1050	–C–OH	CO-Streckschwingung
750 und 695	monosubst. Aromat	CH-Beugeschwingung
695	vermutl. auch –NH	NH-Deformationsschwingung

3. Das *UV-Spektrum* des isolierten Ephedrinhydrochlorids ist aufzunehmen (5 mg in 25 cm³ Methanol).

$\lambda_{\max} = 252 \text{ nm}$ ($\epsilon = 140\text{--}160$).

$\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$ ($\epsilon = 180\text{--}200$).

$\lambda_{\max} = 264 \text{ nm}$ ($\epsilon = 140\text{--}160$).

4. Die *Schmelzpunkte* des isolierten Ephedrinhydrochlorids und der einzelnen Umkristallisationsprodukte sind zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

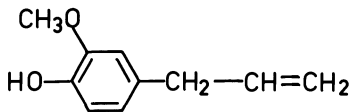
- Welche Stereoisomeren von Ephedrin gibt es? Erläutern Sie die Zusammenhänge zwischen den einzelnen.
- Welche Nebenalkaloide kommen in *Ephedrae herba* vor? Geben Sie die Strukturunterschiede an.
- Wodurch unterscheiden sich Adrenalin und Ephedrin strukturell?

2.20 Isolierung von Eugenol aus Gewürznelken

Prinzip: Aus dem bei der Oleanolsäuregewinnung (s. S. 132) anfallenden Petroletherextrakt von Gewürznelken (*Syzygium aromaticum* (L.) MERILL et L. M. PERRY) wird das Eugenol mit Lauge als Phenolat abgetrennt. Nach dem Ansäuern der wäßrig-alkalischen Phase wird es mit Petrolether ausgeschüttelt. Nach Abdestillieren des Petrolethers wird aus dem Rückstand durch Mikrodestillation im Vakuum das Eugenol gewonnen.

Gehalt: 15 %.

Strukturformel



Eugenol (4-Allyl-2-methoxyphenol)

$C_{10}H_{12}O_2$, MG 164,2; Sdp_{14 Torr} (~18 mbar): 125°

Chemikalien

Petroletherextrakt der Oleanolsäure-Isolierung
 Natriumhydrogencarbonat, 1,5 g
 Natriumhydroxid, 20 g
 Salzsäure, conc., 30 cm³
 Petrolether (Kp. 40–60°), 200 cm³
 Natriumsulfat, wasserfrei, 10 g
 n-Hexan, 80 cm³
 Chloroform, 15 cm³
 i-Propanol, 5 cm³
 Aceton, 5 cm³
 DC-Schicht, Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
 Eugenol, 5 mg (Vergleich)
 Eugenolmethylether, 5 mg (Vergleich)
 Aceteugenol, 5 mg (Vergleich)
 Eiswürfel

Geräte

1 Mikro-Vakuum-Destillationsanlage
 mit drehbarem Fraktionieransatz
 Spitzkolben, NS 14,5, 100 cm³ (1),
 20 cm³ (1)
 2 Erlenmeyerkolben, 500 cm³
 1 Trichter, 5 cm Ø
 1 Scheidetrichter, 500 cm³

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Allgemeine Geräte

Ölbad mit Magnetrührer
 Rotationsverdampfer
 Quecksilbermanometer
 pH-Papier
 DC-Grundausrüstung

Durchführung

Der Petroletherextrakt (s. S. 132, Oleanolsäureisolierung) wird am Rotationsverdampfer auf etwa 200 cm³ (DC-Lösung a) eingengt. Er wird dann im Scheidetrichter 2 × mit je 50 cm³ einer 1proz. wäßrigen Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt (Entfernen von Säuren). Anschließend wird er 4 × mit je 50 cm³ einer 5proz. Natronlauge ausgeschüttelt. Die wäßrige Phenolatlösung des Eugenols wird anschließend nach Zugabe einiger Eiswürfel mit 30 cm³ konzentrierter Salzsäure angesäuert (pH-Wert überprüfen) und im Scheidetrichter 4 × mit je 50 cm³ Petrolether ausgeschüttelt. Die Petroletherextrakte werden mit 50 cm³ einer 1proz. wäßrigen Natriumhydrogencarbonatlösung säurefrei gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und bis zur öligen Konsistenz am Rotationsverdampfer eingengt (Roh-Eugenol 10 g).

Mittels einer Mikrodestillationsapparatur mit Fraktionieransatz wird dann das Roh-Eugenol im Vakuum destilliert. Nach einem Vorlauf von etwa 0,5 cm³ fängt man die bei 125 °C und 14 Torr siedende Fraktion auf.

Ausbeute: ca. 4 g Eugenol.

Zeitbedarf: 1/2 Tag.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: n-Hexan-Chloroform-Aceton-i-Propanol (80 + 15 + 5 + 0,5), KS.

IV. Nachweis

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen nach Abdampfen des Fließmittels markieren (Eugenol im unteren Drittel des Chromatogramms zeigt Fluoreszenzminderung).

b) Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) 5–10 min auf 110 °C. Eugenol färbt sich graublau-graubraun an.

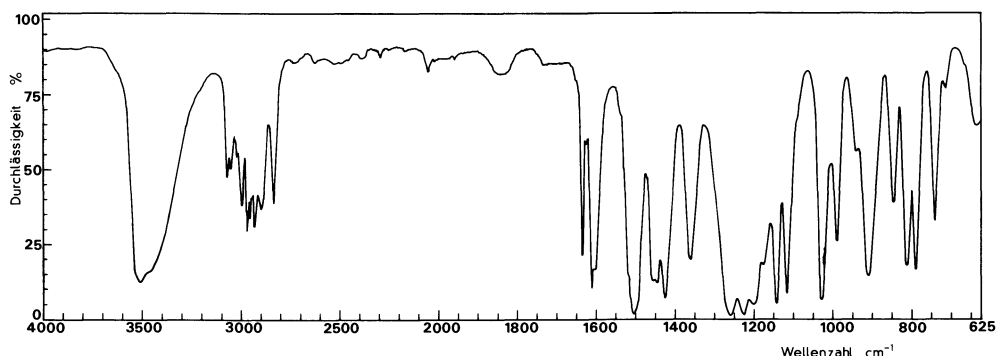
V. Untersuchungslösung

Je 2 mm³ der Vor- und Hauptfraktionen werden in 0,5 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man je 10 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) auf, ebenso 10 mm³ der DC-Lösung a.

VI. Vergleichslösung

Je 2 mm³ Eugenol, Eugenolmethylether und Aceteugenol werden in je 1 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man je 10 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) auf.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Eugenols ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Eugenol, als Film zwischen zwei Kaliumbromidpreßlingen.

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3520–3440	– OH	OH-Streckschwingung
3075 und 3060	monosubst. Doppelbindung	CH-Streckschwingung
3000–2910	>CH_2 und $\text{–}\overset{\text{OCH}_3}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}\text{–H}$	CH-Streckschwingung
2820	– OCH ₃	CH-Streckschwingung
1638	monosubst. Doppelbindung	C=C-Streckschwingung
1610 und 1510	Aromat	CC-Streckschwingung
1460–1450 und 1430	>CH_2 , –OCH ₃ und Aromat	asym. CH-Beugeschwingung und CC-Streckschwingung
1367	– OH	asoz. OH-Beugeschwingung

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
1270–1200	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{OH} \\ \end{array}$	freie OH-Streckschwingung und CO-Streckschwingung
995 und 914	monosubst. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung
912 oder 850	Subst. am Aromat (isol. H)	CH-Beugeschwingung
818 oder 793	Subst. am Aromat (2 benachb. H)	CH-Beugeschwingung

3. Das *UV-Spektrum* des isolierten Eugenols ist aufzunehmen (5 mg Eugenol in 10 cm^3 Chloroform, davon 1 cm^3 auf 25 cm^3).

$$\lambda_{\text{max}} = 280\text{--}282 \text{ nm } (\epsilon = 3150).$$

Weitere Aufgaben

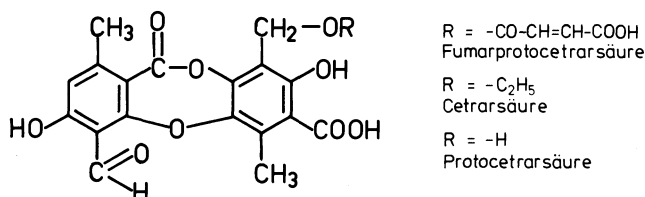
- Wegen welcher Eigenschaften wird Eugenol in der Pharmazie verwendet?
- Welche anderen Drogen bzw. Pflanzen enthalten Eugenol bzw. dessen Methylether?
- Nennen Sie weitere Drogen, die andere flüchtige Phenolderivate enthalten.

2.21 Isolierung von Fumarprotocetrarsäure aus isländischem Moos

Prinzip: Aus gepulvertem isländischem Moos (*Lichen islandicus* (L.) ACHARIUS) wird durch fraktionierte Extraktion mit Aceton zunächst das Chlorophyll entfernt und dann die Hauptmenge der Fumarprotocetrarsäure gewonnen. Aus dem stark eingengten Extrakt fällt die Säure beim Stehen im Kühlschrank aus. Nach der Umkristallisation aus Aceton wird sie in reiner Form erhalten.

Gehalt: 1–2 %.

Strukturformel



Fumarprotocetrarsäure

$\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}_{12}$, MG 472,4; Smp: ca. 250° , braunschwarz ohne zu schmelzen

Chemikalien

Lichen islandicus, pulv. (420), 100 g
 Aceton dest., 2000 cm^3
 Ether, 20 cm^3
 Dichlormethan, 80 cm^3
 Methanol, 60 cm^3
 Eisessig, 10 cm^3
 Ethanol, absolut, 50 cm^3
 DC-Schicht: Kieselgel 60 F₂₅₄, $20 \times 20 \text{ cm}$
 Kaffeesäure, 5 mg (Vergleich)
 Ferulasäure, 5 mg (Vergleich)

Geräte

1 Extraktionsapparat nach Soxhlet (300 cm^3)
 Rundkolben NS 29: 1000 cm^3 (2), 100 cm^3 (1)
 1 Rückflußkühler NS 29
 1 Glasfiltertrichter D3 mit passendem Guko zu
 1 Saugflasche, 100 cm^3
 2 Kristallisierschalen, $\varnothing 5 \text{ cm}$

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)
 Phenylendiamin (Reag. Nr. 23)

Allgemeine Geräte

Wasserbad

Rotationsverdampfer

Vakuum-Exsikkator mit Blaugel

Magnetrührer mit Rührstäbchen

TAS-Ofen mit Röhrchen

Mikroskop und Objektträger

Durchführung

100 g Lichen islandicus, pulv. (420) werden in der Soxhletapparatur 2 h mit 600 cm³ Aceton bei einer Wasserbadtemperatur von 70°C extrahiert. Der erste, grünschwärze Extrakt (= DC-Lösung a) wird verworfen. Mit weiteren 600 cm³ Aceton wird nun 12 h weiter extrahiert, wobei stärkere Lichteinwirkung vermieden werden soll.

Die aus der zweiten Extraktion erhaltene gelbe Lösung (= DC-Lösung b) wird unter Lichtschutz am Rotationsverdampfer bis auf 20–30 cm³ eingengt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die entstandene weißliche Fällung von Fumarprotocetrarsäure (Rohprodukt) wird abgesaugt und im Vakuum-Exsikkator über Blaugel getrocknet (Mutterlauge = DC-Lösung c).

Ausbeute: 1,2–2 g

Für die Umkristallisation werden 500 mg getrocknetes Rohprodukt in einem 1 l-Rundkolben mit 600 cm³ Aceton versetzt und 4 h unter Rückflußkühlung und Rühren (Magnetrührer) unter Lichtschutz auf dem Wasserbad bei 70°C gekocht. Die noch warme, schwach gelblich und trübe Lösung wird filtriert und am Rotationsverdampfer bis auf ca. 30 cm³ eingengt. Der Kolben wird über Nacht in den Kühlschrank gestellt und die abgesaugte weißliche Fällung mit 10–20 cm³ Ether gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum-Exsikkator über Blaugel erhält man ca. 0,2 g praktisch farblose Fumarprotocetrarsäure.

Anmerkung: Starkes Licht muß vermieden werden, da sonst die Lösung blaugrün wird. Wird nicht in der Abenddämmerung oder an einem sehr trüben Tag ohne künstliches Licht gearbeitet, muß die Lösung durch Alufolie geschützt werden, ebenso Hülsenbehälter und Kolben der Soxhletapparatur.

Auswertung**1. Dünnschicht-Chromatographie**

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel 60 F₂₅₄

III. Fließmittel: Dichlormethan-Methanol-Eisessig (80 + 10 + 10), KS, 10 cm.

IV. Nachweis

a) Betrachten im UV₂₅₄-Licht und fluoreszenzmindernde Zonen nach Abdampfen des Fließmittels markieren (Fumarprotocetrarsäure im unteren hRf-Bereich 30–40; Kaffeesäure der Vergleichslösung liegt etwas höher), anschließend besprühen mit:

b) Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) und 5–10 min erhitzen auf 110°. Die Fumarprotocetrarsäure färbt sich graublau an, ebenso die Zone der Kaffeesäure.

c) oder mit Phenylendiamin (Reag. Nr. 23). Beim Betrachten im langwelligen UV-Licht zeigt Fumarprotocetrarsäure eine ockergelbe Fluoreszenz.

V. Untersuchungslösung: Man trage bandförmig (20 × 3 mm) auf:

a) DC-Lösung a, 20 mm³

b) DC-Lösung b, 20 mm³

c) DC-Lösung c, 20 mm³

d) Rohprodukt, 20 mm³

e) umkristallisiertes Produkt, 20 mm³; d) und e) jeweils 2 mg in 1 cm³ Aceton gelöst.

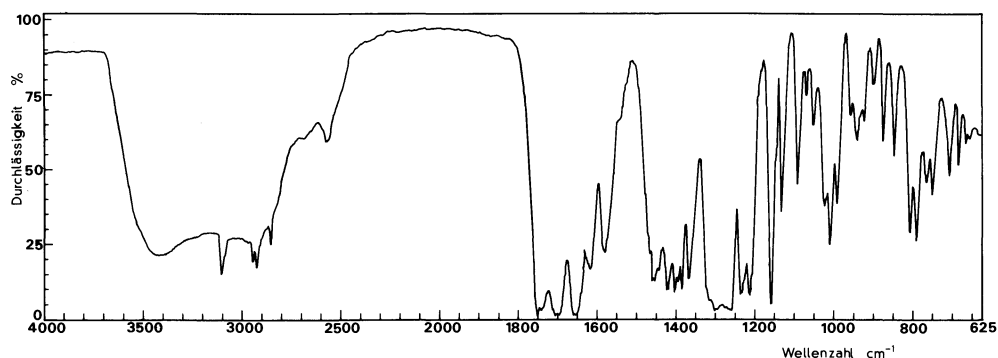
VI. Vergleichslösung: 2 mg reine Fumarprotocetrarsäure werden in 1 cm³ Aceton gelöst, davon trägt man 20 mm³ bandförmig (20 × 3 mm) auf.

Oder: 5 mg Kaffeesäure werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 5 mm³ bandförmig auf (20 × 3 mm).

Anmerkung

Bei selbst hergestellten Schichten verwende man ein weniger polares Fließmittel, z. B. Dichlormethan-Methanol-Eisessig (90 + 5 + 5).

2. Das *IR-Spektrum* der isolierten und umkristallisierten Fumarprotocetrarsäure ist aufzunehmen und mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Fumarprotocetrarsäure (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3400	–OH	OH-Streckschwingung
3100	olefin. Doppelbindung (verschoben durch Konj.)	CH-Streckschwingung
2940	–CH ₃ und –CH ₂	CH-Streckschwingung
2920 und 2855	Aldehyd	CH-Streckschwingung
1750	>C=O, in konj. Ester	C=O-Streckschwingung
1740	>C=O, in konj. Ester	C=O-Streckschwingung
1705	>C=O, in konj. Carbonsäuren	C=O-Streckschwingung
1695	>C=O, in konj. Carbonsäuren	C=O-Streckschwingung
1650	>C=O, in konj. Aldehyd	C=O-Streckschwingung
1615	olefin. Doppelbindung (zu längerwell. verschoben durch Konj.)	C=C-Streckschwingung
1580	Aromat	CC-Streckschwingung
1455	–CH ₃ und Aromat	asym. CH-Beugeschwingung und CC-Streckschwingung
1440	>CH ₂	CH-Beugeschwingung
1420	–COOH	OH-Beugeschwingung
1400–1365	Phenol	asoz. OH-Beugeschwingung
1330–1260	Ester und Phenol	CO-Streckschwingung, C–CO–C-Gerüstschwingung und freie OH-Beugeschwingung
1230 und/oder 1210	Phenol	CO-Streckschwingung
1160	vermutl. cycl. Ether	asym. CO-Streckschwingung
1005	olefin. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung

3. Das *UV-Spektrum* der isolierten und umkristallisierten Fumarprotocetrarsäure in Methanol ist aufzunehmen (2 mg Fumarprotocetrarsäure in 50,0 cm^3 Methanol).

$$\lambda_{\text{max}} = 238\text{--}239 \text{ nm } (\epsilon = 6100) \quad \lambda_{\text{max}} = 315\text{--}316 \text{ nm } (\epsilon = 1150).$$

Weitere Aufgaben

1. Bildung von Cetrarsäure aus Fumarprotocetrarsäure

Durchführung: 50 mg Fumarprotocetrarsäure werden in einem 100 cm³ Schliffkolben mit 50 cm³ absolutem Ethanol versetzt und 3 h unter Rückflußkühlung bei ca. 70°C unter Rühren (Magnetrührer) gekocht. 10 mm³ des Reaktionsproduktes werden dc unter den vorstehenden DC-Bedingungen mit Fumarprotocetrarsäure verglichen. Die gebildete Cetrarsäure liegt im hRf-Bereich 60–70 und färbt sich mit Anisaldehyd-Schwefelsäure ebenfalls graublau an. Ferulasäure kann als Vergleichssubstanz dienen; sie färbt sich gleich an und liegt etwa in gleicher Höhe.

2. Thermische Abspaltung von Fumarsäure aus Fumarprotocetrarsäure

2 mg Fumarprotocetrarsäure werden in einer Aluminiumkartusche ohne Glaswatte in die TAS-Patrone gesteckt und in den TAS-Ofen (250°C) gebracht. Auf einem davor gehaltenen Objektträger wird die abgespaltene Fumarsäure 3 min lang aufgefangen. Der weiße Fleck wird mikroskopisch im Auflicht, also ohne eingeschaltete Lampe im Tageslicht, bei 32- und 100facher Vergrößerung betrachtet. Man erkennt reinweiße Kristalle, die einzeln oder zu Büscheln zusammenliegen.

Weitere Aufgaben

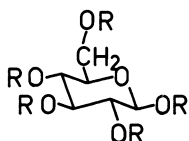
1. Was sind Flechten, botanisch gesehen?
2. Welche Inhaltsstoffe sind typisch für Flechten?
3. Was versteht man unter irländischem und was unter isländischem Moos?
4. Welche weiteren Inhaltsstoffe enthält isländisches Moos und wie kann man darauf prüfen?

2.22 Isolierung von Gallusgerbstoff (Tannin) aus Galläpfeln

Prinzip: Aus gepulverten Galläpfeln (Gallae von *Quercus infectoria* OLIVIER) werden die Gerbstoffe mit Methanol extrahiert. Nach Einengen und Zusatz von Ether werden sie mit Wasser ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase engt man zur Trockne ein und erhält so ein Rohtannin. Nachweis der Phenole nach thermischer Spaltung (TAS).

Gehalt: 35–45%.

Strukturformel



Gallusgerbstoff: R = Galloyl- und/oder Digalloylreste
Gemisch von Estern der D-Glucose mit Gallussäure und Galloyl-gallussäure

Chemikalien

Gallae pulv. gross. (710), 15 g
Methanol, 300 cm³
Ether, 200 cm³
Aktivkohle, 1 g
Ameisensäureethylester, 40 cm³
Toluol, 60 cm³
Ameisensäure, 2 cm³
DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
Pyrogallol, 10 mg (Vergleich)
Resorcin, 10 mg (Vergleich)
Gallussäure, 10 mg (Vergleich)

Geräte

1 Soxhletapparat, 50 cm³ mit
Rundkolben NS 29, 500 cm³
1 Rundkolben NS 29, 250 cm³
2 Erlenmeyerkolben, 500 cm³
1 Scheidetrichter, 500 cm³
1 Analysentrichter, Ø 11 cm
2 Glasplatten, 20 × 20 cm
1 Porzellanreischale, Ø 12 cm mit Pistill

Reagenzien

Echtblausalz B (Reag. Nr. 15)

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 500 cm³

Rotationsverdampfer

TAS-Ofen mit Zubehör

Durchführung

15 g Gallae pulv. (710) werden mit 250 cm³ Methanol in einer Soxhletapparatur 3 × 7 h extrahiert. Danach wird die Lösung am Rotationsverdampfer auf 50 cm³ eingengt und nach Erkalten mit 200 cm³ Ether versetzt. Diese Suspension schüttelt man in einem 500 cm³-Scheidetrichter 4 × mit je 50 cm³ Wasser aus. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden danach mit 50 cm³ Ether ausgeschüttelt. Zur wäßrigen Phase gibt man 1 g Aktivkohle und läßt unter gelegentlichem Schütteln einige h stehen; dann wird filtriert. Das Filtrat engt man portionsweise in einem 250 cm³-Rundkolben am Rotationsverdampfer bis zur sirupösen Konsistenz ein und streicht den Sirup auf Glasplatten. Man trocknet im Warmluftstrom, schabt danach die Masse ab und pulverisiert.

Ausbeute: 5–7 g hellbraunes Rohtannin.

Zeitbedarf: 4 Tage.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Toluol-Ameisensäureethylester-Ameisensäure (60 + 38 + 2), KS.

IV. Nachweis

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Resorcin, hRf 25–30; Pyrogallol, hRf 20–25; Gallussäure, hRf 5–10 zeigen Fluoreszenzminderung).

b) Echtblausalz B-Lösung (Reag. Nr. 15), Nachbedampfen mit Ammoniak, danach mit Salzsäuredämpfen, bis der Untergrund farblos ist. (Resorcin färbt sich violett, Pyrogallol und Gallussäure färben sich braun an.)

V. TAS-Bedingungen:

Einwaagen: Jeweils 1 mg isoliertes Rohtannin, 3 mg extrahierte Droge, 3 mg Ausgangsdroge.

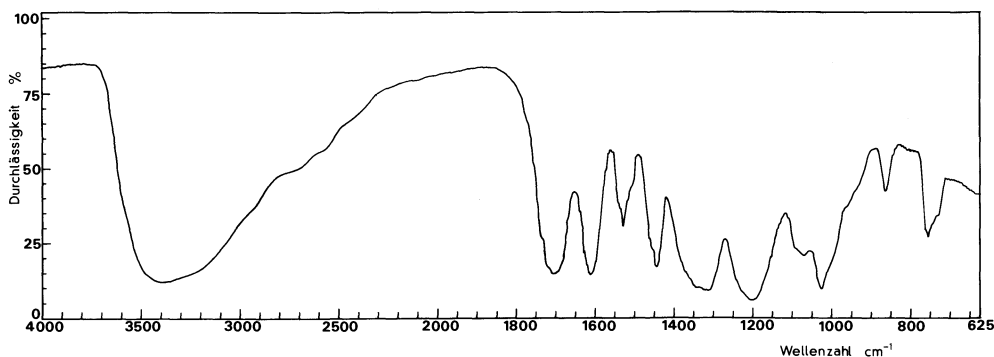
Temperatur: 250 °C.

Verweilzeit: 3 min.

Treibmittel: wasserdampfgesättigtes Molekularsieb 4 Å (= 0,4 nm) 2–3 Kügelchen.

VI. Vergleichslösung: Je 5 mg Resorcin, Pyrogallol und Gallussäure werden in je 2,0 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man je 2 mm³ punktförmig auf.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Tannins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Tannin (2 mg/200 mg Kalliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3380	–OH	OH-Streckschwingung
1705	$>\text{C}=\text{O}$	C=O-Streckschwingung
1610, 1532 und 1445	Aromat	CC-Streckschwingung
1340–1315	–OH und Ester	OH-Beugeschwingung CO-Streckschwingung und C–CO–O-Gerüstschwingung
1200	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{OH} \\ \end{array}$	CO-Streckschwingung
1028	vermutlich Ether	CO-Streckschwingung
867	Subst. am Aromat	CH-Beugeschwingung

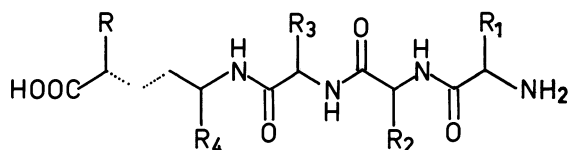
Weitere Aufgaben

- Welche Gerbstoffarten kennen Sie?
- Was versteht man unter gerben? Erläutern Sie die chemischen Vorgänge hierbei.
- Welche Methoden zur Gerbstoffbestimmung kennen Sie und auf welchem Prinzip basieren sie?
- Nennen Sie Gerbstoffdrogen, die Art ihres Gerbstoffs, den Gehalt und die Verwendung der Droge.

2.23 Isolierung von Gelatine aus Schweineschwarte

Prinzip: Aus kollagenhaltigem tierischem Material (Knochen, Haut, Bindegewebe usw.) wird nach saurer (Typ A) oder alkalischer (Typ B) Teilhydrolyse und Extrahieren mit heißem Wasser ein Protein mit Molekulargewichten zwischen 40000 und 100000 erhalten. Es löst sich nach Aufquellen in kaltem Wasser beim Erhitzen (Sol-Zustand) und erstarrt beim Erkalten (Gel-Zustand). Bei der Hydrolyse erhält man die für Gelatine typischen Aminosäuren: Glycin, Prolin, Oxyprolin, Alanin, Arginin und Leucin. Es fehlen Cystin, Cystein, Tryptophan und andere. In der nachstehenden Vorschrift wird aus Schweineschwarte (*Sus scrofa* L. var. *domesticus* GRAY) nach Säurebehandlung eine Gelatine des A-Typs gewonnen.

Strukturformel



Gelatine, ein Protein mit Amidbindungen: $\text{R}_1\text{--R}_4$ = Substituenten der Aminosäuren.

Chemikalien

Schweineschwarte, 200 g
Methanol, 50 cm^3
Dichlormethan, 50 cm^3
Schwefelsäure, 9,8proz. (G/V), 10 cm^3
Schwefelsäure ca. 8 N, 25 cm^3
Aktivkohle, 1 g
Bariumcarbonat, 10 g
Ammoniak, 25proz. (G/V), 20 cm^3
DC-Schicht: Kieselgel, 20 × 20 cm

Leucin, 1 mg (Vergleich)
Alanin, 1 mg (Vergleich)
Glycin, 1 mg (Vergleich)
Prolin, 1 mg (Vergleich)
Arginin, 1 mg (Vergleich)

Reagenzien

Ninhydrin-Reagenz (Reag. Nr. 20)

Geräte

Rundkolben, NS 29, 1000 cm³ (1), 50 cm³ (1)
 1 Becherglas, 1000 cm³
 1 Rückflußkühler, NS 29
 Trichter: Ø 10 cm (1), Ø 5 cm (1)
 Porzellanabdampfschalen:
 Ø 25 und 30 cm (je 1)
 1 Glasstab, 300 × 8 mm
 Verbandsmull, 65 mm breit, ca. 2 m

Allgemeine Geräte

Spezial-pH-Papier (pH = 1–5)
 Heizplatte
 Heißwassertrichter
 1 Thermometer 0–100°C
 Rotationsverdampfer
 DC-Grundausrüstung
 Wasserbad
 Zentrifuge

Durchführung

200 g Schweineschwarte werden zu ca. 5 mm großen Würfeln zerkleinert und in einem 1000 cm³-Becherglas mit 600 cm³ Wasser versetzt, das mit verdünnter Schwefelsäure auf ein pH von 3,8 eingestellt wurde. Man läßt 8 h stehen, dekantiert oder gießt gegebenenfalls durch eine Mull-Lage ab. Nun wird nochmals mit der gleichen Menge Wasser und verdünnter Schwefelsäure (pH 3,8) versetzt und weitere 16 h stehen gelassen. Danach wird dekantiert und die säurebehandelte Schweineschwarte zweimal mit 800 cm³ Wasser gewaschen. Dann erhitzt man mit 600 cm³ Wasser unter langsamem Rühren 3–4 h auf 70°C. Anschließend wird durch eine doppelte Lage Mull filtriert und das Filtrat abgekühlt. Das an der Oberfläche abgeschiedene Fett wird entfernt und wiederum auf 70°C erhitzt, mit 1 g Aktivkohle versetzt, 15 min gerührt und heiß in eine Porzellanschale filtriert. (Die Abtrennung der Aktivkohle aus der viskosen Lösung erfolgt schneller durch Zentrifugation.) Zum Abdampfen des Wassers stellt man das Filtrat in einen Trockenschrank oder auf ein Wasserbad bei Temperaturen von ca. 65°C. Die verbliebenen Schweineschwartenwürfel werden nochmals mit 600 cm³ Wasser 3 h auf nunmehr 90°C erhitzt. Anschließend wird heiß filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zu einer viskosen Lösung eingengt und in einer Porzellanschale auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft.

Gesamtausbeute: ca. 15 g.

Zeitbedarf: 2¹/₂ Tage.

Auswertung**1. Dünnschicht-Chromatographie der Hydrolyseprodukte**

I. Standardmethode: Ja; Abweichung: 15 cm Laufstrecke.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Methanol-Dichlormethan-Ammoniaklösung, 25proz. (45 + 45 + 10), KS.

IV. Nachweis: Ninhydrin-Reagenz (Reag. Nr. 20) und anschließend 5–10 min auf 110°C.

	hRf-Werte	Farbe mit Ninhydrin
Leucin	70–75	rot
Alanin	40–45	rot
Prolin	30–35	gelb
Glycin	25–30	rot
Arginin	0–5	rot

V. Untersuchungslösung: 50 mg gepulverte Gelatine werden mit 25 cm³ 8 N-Schwefelsäure 6 h unter Rückfluß auf dem Wasserbad gekocht. Zu 10 cm³ der schwefelsauren Lösung gebe man 10 cm³ Wasser und neutralisiere unter Erwärmen (60–60°) mit 9 g Bariumcarbonat. Nach 30 min wird die Neutralisation mit konz. Ammoniaklösung (etwa 1 cm³) vervollständigt. Die neutrale Lösung wird filtriert und 5 cm³ des Filtrates vorsichtig zur Trockne eingengt. Den Rückstand löst man in 1 cm³ Methanol, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (20 × 3 mm) auf. Beachte: Der Rückstand im Kolben besteht aus Ammoniumsulfat.

VI. Vergleichslösung: Je 1 mg Glycin, Prolin, Alanin, Arginin und Leucin werden in je 1 cm³ Methanol unter Erwärmen gelöst. Auftragemenge: 10 mm³ bandförmig (20 × 3 mm).

2. Gelierungsversuch

Je 0,05 g; 0,1 g; 0,2 g bis 0,5 g gepulverte Gelatine werden in einem Reagenzglas mit 10 cm³ kaltem Wasser 10 min vorgequollen und dann im siedenden Wasserbad zur Lösung gebracht. Man kühlt dann mit Leitungswasser ab und stellt fest, bei welcher Konzentration ein vollständiges Erstarren der Lösung eingetreten ist.

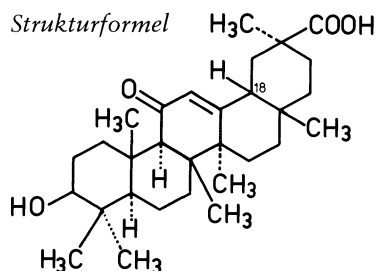
Weitere Aufgaben

- Auf welche Fremdstoffe muß handelsübliche Gelatine geprüft werden?
- Wie lassen sich die beiden Gelatinetypen A und B physikalisch und chemisch kennzeichnen?
- Untergliedern Sie die Proteine, und nennen Sie Proteinklassen mit typischen Vertretern.
- Wie läßt sich der Aufbau von Eiweißkörpern ermitteln?

2.24 Isolierung von 18 β -Glycyrrhetinsäure aus geschälter Süßholzwurzel

Prinzip: Aus geschälter und gepulverter Süßholzwurzel (*Glycyrrhiza glabra* L.) werden zunächst lipophile Inhaltsstoffe mit Aceton extrahiert. Der Drogenrückstand wird mit verdünnter Salzsäure aufgeköcht, hierbei erfolgt eine Spaltung von Glycyrrhizin, des β -Glucuronosyl-D-Glucuronsäureglykosids der Glycyrrhetinsäure. Aus dem hydrolysierten Drogenrückstand wird die entstandene 18 β -Glycyrrhetinsäure mit Dichlormethan extrahiert und aus dem eingeeengten Extrakt säulenchromatographisch abgetrennt.

Gehalt: 2–14 % (Glycyrrhizin).



18 β -Glycyrrhetinsäure

C₃₀H₄₆O₄, MG 470,7; Smp: 297–300 °C, $[\alpha]_D^{20} = +86^\circ$
(c = 0,5 in Ethanol)

Chemikalien

Liquiritiae radix, mund. pulv. (300)
100 g (mit Aceton extrahiert = Rückstand der Liquiritin-Isolierung S. 120)
Salzsäure, ca. 1 N, 600 cm³
Dioxan, 60 cm³
Essigsäureethylester, 1200 cm³
Petrolether (40–60 °C), 400 cm³
Dichlormethan, 1600 cm³
Ethanol, 96proz., 50 cm³
Natriumsulfat, wasserfrei, 200 g
Aktivkohle, 500 mg
Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 220 g
Kieselgel F₂₅₄-Schichten
Glycyrrhizin(säure) bzw.
Ammoniumsalz, 5 mg (Vergleich)
18 β -Glycyrrhetinsäure, 5 mg (Vergleich)
n-Hexan, 10 cm³
Ameisensäure, 10 cm³

Geräte

Rundkolben, NS 29, 2000 cm³ (1),
1000 cm³ (2), 500 cm³ (1), 250 cm³ (1), 100 cm³ (1)
1 Rückflußkühler, NS 29
1 Büchnertrichter, Ø 110 mm mit pass. Guko zu Saugflasche 1 l
1 Mörser, Ø 12 cm mit Pistill
3 Schliffstopfen, NS 29
1 Erlenmeyerkolben, 1000 cm³
Bechergläser, 800 cm³ (1), 250 cm³ (1), 100 cm³ (2)
Trichter, Ø 8 cm (1), 5 cm (2)
Glasfiltertrichter, D3, Ø 5 cm mit pass. Guko zu Saugrohr, 20 cm³
1 Chromatographiesäule, l = 150 cm, Ø_i = 2 cm

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Allgemeine Geräte

Wasserbad

Rotationsverdampfer

Fraktionssammler mit Zubehör

DC-Grundausrüstung

Durchführung

- a) *Extrakt*: Der Drogenrückstand der Liquiritin-Isolierung (S.120) (bzw. die mit Aceton vor-extrahierte Droge *Liquiritiae radix*) wird mit 600 cm³ 1 N-Salzsäure und 60 cm³ Dioxan versetzt, kurz aufgerührt (= DC-Lösung a) und 2 h auf dem siedenden Wasserbad unter Rückfluß gekocht. – Ein Erhitzen mit einem Heizpilz führt zum Übersäumen. – Danach wird über einen Büchnertrichter abgesaugt, bis der Drogenrückstand weitgehend wasserfrei ist. Das Filtrat (= DC-Lösung b) wird verworfen.

Der Drogenrückstand wird in einem Mörser mit ca. 150 g wasserfreiem Natriumsulfat zerrieben, die Verreibung in einen 1000 cm³-Rundkolben überführt und vielmals mit je 400 cm³ Dichlormethan ausgeschüttelt. (Ausschüttelung 1 = DC-Lösung c, entsprechend Ausschüttung 2, 3 und 4 = DC-Lösung d, e und f). Die vereinigten Dichlormethan-Extrakte werden nochmals über wasserfreies Natriumsulfat filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Es wird ein bräunlich gelber fester Rückstand von ca. 2,5 g erhalten. (5 mg des Rückstands werden in 1 cm³ Methanol gelöst = DC-Lösung g).

- b) *Säulenchromatographie*

Allgemeine Durchführung: Siehe S.11: «Säulenchromatographische Trennungen»

Chromatographiesäule: $l = 150 \text{ cm}$, $\varnothing_i = 2 \text{ cm}$

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 220 g

Elutionsmittelfolge:

Essigsäureethylester-Petrolether (40–60°C) (70 + 30), 1000 cm³

Essigsäureethylester, 300 cm³

Aufgabemenge: Der Extrakt wird in 30 cm³ des 1. Elutionsmittels auf dem Wasserbad kurz aufgeköcht und die entstandene Suspension wird auf die Seesandschicht in der Chromatographiesäule gegeben und nach Ablauf des Lösungsmittels in der Seesandschicht unter Zugabe von weiterem Seesand (Schichthöhe ca. 6 cm) verrieben, wobei ein «Trockenlaufen» der stationären Phase zu vermeiden ist.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s

Fraktionen: 15 cm³

Nach vollständigem Einengen der fast ausschließlich 18 β -Glycyrrhetinsäure-haltigen Fraktionen erhält man einen leicht gelblichen Rückstand von ca. 800 mg, der in 8 cm³ Ethanol unter Erwärmen auf dem Wasserbad gelöst wird, mit 300 mg Aktivkohle vorsichtig versetzt wird und auf dem Wasserbad zum Sieden erhitzt wird. Der Rundkolben wird mit ca. 5 cm³ Ethanol nachgespült und danach das Filter. Die vereinigten klaren farblosen Filtrate (5 mm³ werden mit 0,5 cm³ Methanol verdünnt = DC-Lösung h) werden auf dem Wasserbad bis zu einem Gewicht von 5 g eingengt, mit 10 cm³ n-Hexan versetzt und bei 4°C stehen gelassen. Falls über Nacht keine Fällung von 18 β -Glycyrrhetinsäure erfolgt, wird die Lösung auf dem Wasserbad bis fast zur Trockene eingengt und mit gerade soviel Dichlormethan auf dem Wasserbad aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstanden ist. Aus dieser Lösung wird durch n-Hexan-Zusatz 18 β -Glycyrrhetinsäure gefällt, über einen Glasfiltertrichter abgesaugt und an der Luft getrocknet. (Mutterlauge = DC-Lösung i)

Ausbeute: 500 mg

Zeitbedarf: 3 Tage

- c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode*: ja.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: Essigsäureethylester-Petrolether (40–60°C) (70 + 30), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis*:

- a) UV₂₅₄: Glycyrrhetinsäure im unteren Drittel des Chromatogramms zeigt Fluoreszenzminderung.

b) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Reag. Nr. 3), 5–10 min auf 110°C (Glycyrrhetinsäure färbt sich blauviolett an).

V. *Untersuchungslösung*: Punktförmige Auftragung.

a) DC-Lösung g 5 mm³.

b) Ab der Fraktion 20 von jeder 3. Fraktion 5 mm³.

VI. *Vergleichslösung*: 5 mg 18 β -Glycyrrhetinsäure werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 2–3 mm³ punktförmig auf.

Auswertung

1. Abschließende Dünnschicht-Chromatographie

A) Prüfung auf Glycyrrhizin(säure)

I. und II. wie c)

III. *Fließmittel*: Essigsäureethylester-Wasser-Ameisensäure (75 + 15 + 10), KS, 10 cm

IV. *Nachweis*: wie c) IV: Glycyrrhizin(säure) im mittleren R_f-Bereich zeigt Fluoreszenzmin-
derung und färbt sich mit Reag.-Nr. 3 blauviolett an.

V. *Untersuchungslösung*: bandförmige Auftragung (10 × 3 mm).

DC-Lösung a) und b) je 10 mm³.

c) 200 mg Liquiritiae radix pulv. (300) werden mit 2 cm³ Wasser versetzt und im sie-
denden Wasserbad kurz geschüttelt und filtriert, vom Filtrat trägt man 10 mm³ auf.
– Die Startzonen sind an der Luft und nicht auf der Heizplatte zu trocknen vor Be-
ginn der DC-

VI. *Vergleichslösung*:

5 mg Glycyrrhizin(säure) werden in 1 cm³ Wasser gelöst, davon trägt man 5 mm³
bandförmig (10 × 3 mm) auf.

B) Prüfung auf 18 β -Glycyrrhetinsäure

I., II., III., IV. und VI. siehe c)

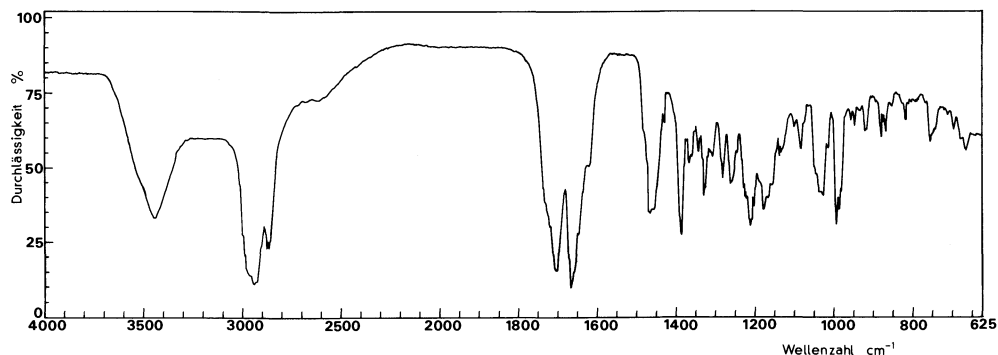
V. *Untersuchungslösung*: bandförmige Auftragung (10 × 3 mm).

a) Aceton-Extrakt der Liquiritin-Isolierung, 10 mm³.

b–i) DC-Lösungen b–i je 10 mm³.

j..) Je 5 mg der isolierten 18 β -Glycyrrhetinsäureprodukte werden in je 1 cm³
Methanol gelöst, davon trägt man je 5 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) auf.

2. Das IR-Spektrum der isolierten 18 β -Glycyrrhetinsäure ist aufzunehmen, mit dem abgebilde-
ten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von 18 β -Glycyrrhetinsäure (2 mg/200 mg KBr).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3450	–OH-Gruppen	OH-Streckschwingung
2980–2864	–CH ₃ , >CH_2 und $-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}-\text{H}$	CH-Streckschwingung
1700	>C=O (von –COOH)	CO-Streckschwingung
1650	>C=O (α, β -ungesättigt)	CO-Streckschwingung
1465–1450	–CH ₃ und >CH_2	asym. CH-Beugeschwingung
1385	–CH ₃	sym. CH-Beugeschwingung
1365 und 1360	Geminal-Dimethyl	sym. CH-Beugeschwingung
1323 oder 1280	–OH	asoz. OH-Beugeschwingung
1037	>CHOH	CO-Streckschwingung
818	trisubst. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung

3. Das *UV-Spektrum* der isolierten 18 β -Glycyrrhetinsäure ist aufzunehmen. (8 mg werden in 10,0 cm³ Ethanol gelöst, davon werden 1,0 cm³ mit Ethanol auf 25,0 cm³ aufgefüllt.)
 $\lambda_{\text{max}} = 242 \text{ nm}$ ($\epsilon = 12300$).

4. Der *Schmelzpunkt* der isolierten 18 β -Glycyrrhetinsäure ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

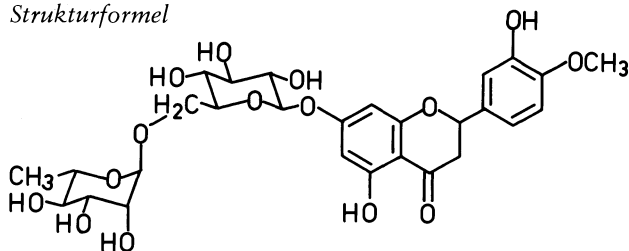
- Zu welcher Naturstoffgruppe gehört 18 β -Glycyrrhetinsäure?
- Welche Eigenschaft dieser Naturstoffklasse weist 18 β -Glycyrrhetinsäure nicht auf?
- Wodurch unterscheiden sich die α - und β -Form?
- Wie hoch ist die Süßkraft des Glycyrrhizins im Vergleich zu der des Rohrzuckers?

2.25 Isolierung von Hesperidin aus Orangenschalen

Prinzip: Getrocknete und gepulverte Orangenschalen (*Citrus sinensis* (L.) OSBECK) werden durch kontinuierliche Extraktion mit Dichlormethan vom etherischen Öl befreit. Aus dem Drogenrückstand wird das Hesperidin mit Methanol extrahiert und durch Umkristallisation rein dargestellt.

Gehalt: 5–8 %.

Strukturformel



Hesperidin (Hesperetin-7-(β -L-Rhamnosido-6- β -D-glucosid))

$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$, MG 610; Smp: 262–263 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -76,8$ bis 80° (in Ethanol)

Chemikalien

Schalen handelsüblicher Orangen,
getrocknet und gepulvert (300), 100 g
Dichlormethan, 800 cm³
Methanol, 1000 cm³
Essigsäure, 6proz. (V/V), 150 cm³

Dimethylsulfoxid, 50 cm³
Essigsäureethylester, 70 cm³
Isopropanol, 100 cm³
DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
Hesperidin, 10 mg (Vergleich)

Geräte

1 Extraktionsapparatur n. Soxhlet,
500 cm³, mit 1000 cm³-Rundkolben,
NS 29 und pass. Rückflußkühler
1 Becherglas, 250 cm³
Erlenmeyerkolben, 100 cm³ (1), 250 cm³ (1)
1 Büchner-Trichter, Ø 8 cm mit pass.
Guko zu 250 cm³ Saugflasche
1 Glasfiltertrichter, D3, Ø 4 cm mit
pass. Guko zu 250 cm³ Saugflasche
1 Kristallisierschale, Ø 8 cm

Reagenzien

Aluminiumchloridlösung (Reag. Nr. 1)

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 1000 cm³
Magnetrührer mit Heizung und
Stäbchen, 30 mm
Thermometer 0–100°C
Rotationsverdampfer
DC-Grundausrüstung
Vakuumsikkator

Durchführung

100 g getrocknete und gepulverte Orangenschalen (300) werden in einer Extraktionsapparatur nach Soxhlet mit 800 cm³ Dichlormethan 12 h extrahiert. Der Extrakt (= DC-Lösung a) wird verworfen. Der Drogenrückstand wird zur Entfernung des anhaftenden Dichlormethans an der Luft ausgebreitet (Abzug!). Der trockene Drogenrückstand wird in der gleichen Extraktionsapparatur 3 h mit 800 cm³ Methanol extrahiert. Der Methanolextrakt (= DC-Lösung b) wird bei Wasserstrahlvakuum am Rotationsverdampfer bis zur Sirupkonsistenz eingengt. Der Rückstand wird in 50 cm³ Essigsäure, 6proz., aufgenommen. Der ausgefallene Niederschlag wird über einen Büchner-Trichter abgesaugt, mit 6proz. Essigsäure gewaschen und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet (Mutterlauge = DC-Lösung c). Der Schmelzpunkt des getrockneten Roh-Hesperidins soll zwischen 235 und 245°C liegen. Zur Umkristallisation wird eine ca. 5proz. Lösung des Roh-Hesperidins in einem 250 cm³ Becherglas mit Dimethylsulfoxid unter Rühren und Erwärmen auf 60–80°C hergestellt (Abzug!). Danach setzt man unter Rühren langsam das gleiche Volumen Wasser hinzu. Beim Abkühlen auf Zimmertemperatur fällt Hesperidin aus; dieses wird über einen Glasfiltertrichter abgesaugt, zunächst mit wenig heißem Wasser und dann mit Isopropanol gewaschen. Das farblose Rein-Hesperidin wird in einem Vakuumsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ausbeute: ca. 2 g.

Zeitbedarf: 1,5 Tage.

Auswertung**1. Dünnschicht-Chromatographie**

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Oberphase von n-Butanol-Eisessig-Wasser (40 + 10 + 50), KS, 10 cm.

IV. Nachweis:

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Hesperidin im mittleren hRf-Bereich zeigt Fluoreszenzminderung).

b) Besprühen mit Aluminiumchloridlösung (Reag. Nr. 1) und anschließend im UV₃₆₅ betrachten. (Hesperidin zeigt eine gelbe bis türkisfarbene Fluoreszenz.)

V. Untersuchungslösung: Bandförmige Auftragung (15 × 3 mm):

a) DC-Lösung a, 10 mm³.

b) DC-Lösung b, 10 mm³.

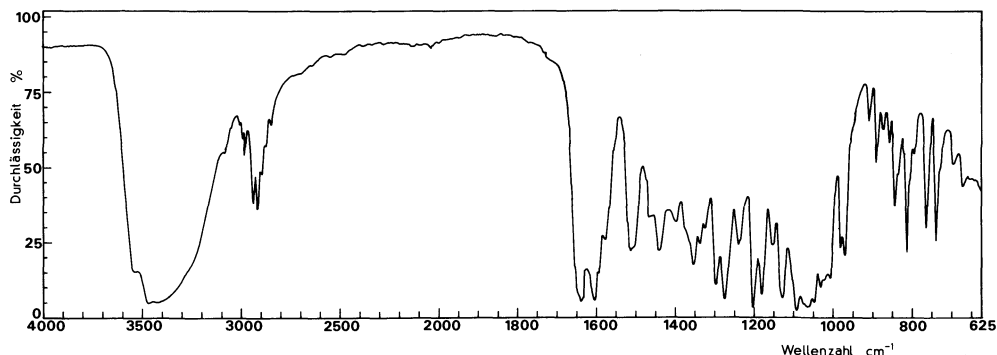
c) 0,1 cm³ DC-Lösung c mit Methanol auf 1,0 cm³ auffüllen, davon 10 mm³.

d) Roh-Hesperidin: 5 mg werden in 5 cm³ Methanol unter Erwärmen auf dem Wasserbad gelöst, davon 10 mm³.

e) Rein-Hesperidin: Wie vorstehend.

VI. Vergleichslösung: 5 mg Hesperidin werden in 5 cm³ Methanol unter Erwärmen gelöst, davon 10 mm³ bandförmig (15 × 3 mm).

2. Das IR-Spektrum des isolierten Hesperidins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Hesperidin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3450	–OH	OH-Streckschwingung
3080 und 3010	Aromat	CH-Streckschwingung
2980–2865	–CH ₃ , >CH ₂ und $\begin{array}{c} \\ -\text{CH} \end{array}$	CH-Streckschwingung
2850	–OCH ₃	CH-Streckschwingung
1650	>C=O	CO-Streckschwingung
1610, 1518–1500	Aromat	CC-Streckschwingung
1470 oder 1445	–OCH ₃ und Aromat	asym. CH-Beugeschwingung und CC-Streckschwingung
1445	–CH ₃ und >CH ₂	asym. CH-Beugeschwingung
1445–1276	sek. OH	asoz. OH-Beugeschwingung
1358	–CH ₃	sym. CH-Beugeschwingung
1358–1326	phenolische und alkoholische OH-Gruppe	asoz. OH-Beugeschwingung
1276–1000	phenolische, alkoholische OH-Gruppe, Ether	CO-Streckschwingung und freie OH-Beugeschwingung
1080–975	alkoholisches OH	CO-Streckschwingung

3. Das UV-Spektrum des isolierten Hesperidins in Methanol ist aufzunehmen. (1 mg Hesperidin in 50,0 cm^3 Methanol.)

$\lambda_{\text{max}} = 283 \text{ nm}$ ($\epsilon = 16820$).

4. Der Schmelzpunkt des isolierten Hesperidins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

- Wodurch unterscheiden sich Flavonoide, Isoflavonoide und Neoflavonoide?
- Welches chemische Bauprinzip liegt den Flavonoiden zugrunde?
- Welche Grundtypen von Flavonoiden unterscheidet man (Strukturformeln)?

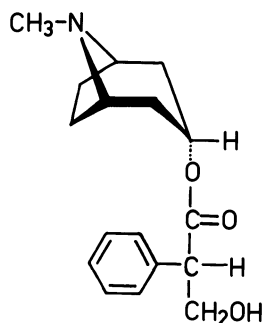
2.26 Isolierung von L-Hyoscyamin aus Belladonna-Blättern

Prinzip: Grob gepulverte Belladonna-Blätter (*Atropa belladonna* L.) werden zur Entfernung lipophiler Ballaststoffe (Blattwache u.ä.) mit Petrolether extrahiert. Aus der anschließend alkalisierten Droge werden die Alkaloide mit Dichlormethan extrahiert. Zur weiteren Abtrennung von Ballaststoffen werden die Alkaloide als Salze in die wäßrige Phase überführt, aus der

sie anschließend nach Alkalisierung wieder in die organische Phase überführt werden, aus der nach Einengung L-Hyoscyamin auskristallisiert.

Gehalt: 0,1–1,2 %.

Strukturformel



L-Hyoscyamin
 $C_{17}H_{23}O_3N$, MG 289,4; Smp: 108–109°C, $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$
 (in 50proz. Ethanol)

Chemikalien

Belladonnae folium pulv. (710–300), 100 g

Petrolether (40–60°C), 300 cm³

Dichlormethan, 1600 cm³

Aceton, 200 cm³

Methanol, 10 cm³

Ammoniaklösung, konz., 15 cm³

Schwefelsäure, ca. 0,5 N, 50 cm³

Natriumhydroxid, 20 g

Aktivkohle, 2 g

Natriumsulfat, wasserfrei, 20 g

DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm

Atropin, 10 mg (Vergleich)

Reagenzien

Dragendorff-Reag. nach PUECH (Reag. Nr. 14)

Geräte

1 Perkulationsrohr, $l = 50$ cm, $\varnothing_i = 5$ cm

Rundkolben, NS 29, 100 cm³ (1), 1000 cm³ (1)

Bechergläser, 50 cm³ (2), 100 cm³ (2),

1000 cm³ (1)

2 Erlenmeyerkolben, 200 cm³

Trichter, \varnothing 5 cm (2), \varnothing 3 cm (2)

Scheidetrichter, 100 cm³

1 Glasfiltertrichter, D3, \varnothing 4 cm mit pass.

Guko zu Saugrohr, 20 cm³

Allgemeine Geräte

Rotationsverdampfer

pH-Papier

Zentrifuge

DC-Grundausrüstung

Alufolie, 30 × 30 cm

Wärmeplatte

Durchführung

100 g grob (710) bis mittelfein (300) gepulverte Belladonna-Blätter werden in einem Becherglas (1000 cm³) mit 100 cm³ Petrolether (40–60°C) durchfeuchtet, danach in ein mit 50 cm³ Petrolether (40–60°C) gefülltes Perkulationsrohr überführt und anschließend mit 150 cm³ Petrolether perkoliert. Das Perkolat (= DC-Lösung a) wird verworfen. Der Drogenrückstand wird an der Luft (Abzug!) getrocknet, bis der Petrolethergeruch verschwunden ist. Anschließend wird der Drogenrückstand in einem Becherglas (1000 cm³) unter kräftigem Rühren mit einer Mischung aus 10 cm³ Ammoniaklösung, konz. in 100 cm³ Aceton gleichmäßig durchfeuchtet und danach auf Alu-Folie ausgebreitet (Abzug!). Nachdem der Geruch nach Aceton verschwunden ist, wird der Drogenrückstand in ein mit 100 cm³ Dichlormethan gefülltes Perkulationsrohr gegeben, wobei darauf zu achten ist, daß die Droge stets von Dichlormethan umgeben ist (d. h. gegebenenfalls muß Dichlormethan nachgefüllt werden, damit sich die Droge luftblasenfrei im Perkulationsrohr absetzen kann). Die Droge wird bei langsamer Tropfgeschwindigkeit mit insgesamt 1500 cm³ Dichlormethan perkoliert. Das Perkolat (= DC-Lösung b) wird am Rotationsverdampfer im Vakuum bei 40–50°C Wasserbadtemperatur eingengt bis zu einem Volumen von ca. 50 cm³. Dieses eingengte Perkolat wird in einen Scheidetrichter überführt und dreimal mit je 15 cm³ ca. 0,5 N-Schwefelsäure ausgeschüttelt. Die gelbe, wäßrige Alkaloidsalzlösung wird in einen Scheidetrichter über Glaswatte filtriert und tropfenweise mit 20proz. Natriumhydroxid-

lösung schwach alkalisiert. Aus dieser Lösung schüttelt man *sofort* die freien Alkaloidbasen mit dreimal je 30 cm³ Dichlormethan aus. – Gegebenenfalls muß durch Zentrifugieren eine Phasentrennung herbeigeführt werden. – Die Dichlormethanlösung (= DC-Lösung c) wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zu einem Volumen von ca. 20 cm³ eingengt, dann mit einer Spatelspitze Aktivkohle versetzt, auf dem Wasserbad kurz aufgeköcht und filtriert. Der Kolben wird mit 5 cm³ Dichlormethan nachgespült. Die vereinigten klaren Dichlormethanfiltrate werden auf dem Wasserbad bis zur Hälfte eingengt, dann gibt man gerade so viel Petrolether (40–60°C) zu, bis eine leichte Trübung entsteht, die beim Erhitzen auf dem Wasserbad wieder verschwinden soll; falls nicht: Zugabe einiger Tropfen Dichlormethan. – Man läßt die Lösung dann mehrere Stunden bei 4°C stehen und saugt das ausgeschiedene Hyoscyamin über einen Glasfiltertrichter ab. (Mutterlauge = DC-Lösung d). Bei weiterem Verdunsten des Lösungsmittels kann aus der Mutterlauge noch weiteres Hyoscyamin gewonnen werden.

Ausbeute: ca. 100 mg.

Zeitbedarf: 1,5 Tage.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. *Standardmethode:* Ja.

II. *Schicht:* Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel:* Aceton-Wasser-Ammoniaklösung, konz. (90 + 7 + 3), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis:* Nach Abdampfen des Fließmittels auf der Wärmeplatte:

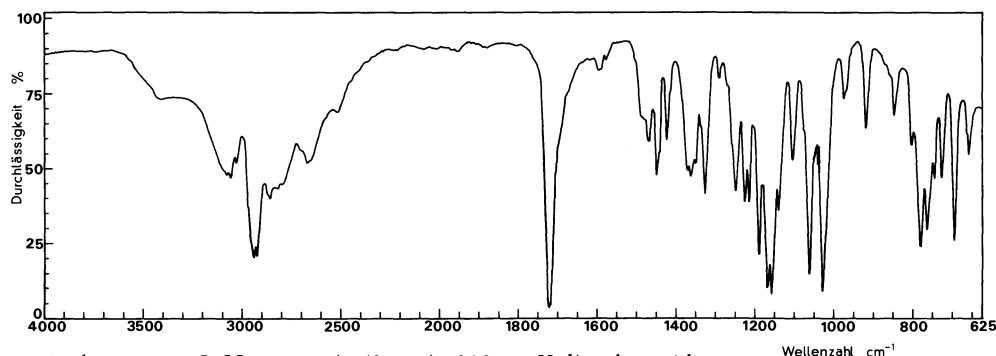
- UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren. (Im unteren Drittel des Chromatogramms ist die schwach fluoreszenzmindernde Zone des L-Hyoscyamins zu erkennen.)
- UV₃₆₅: Fluoreszierende Zonen markieren. (Oberhalb der L-Hyoscyamin-Zone liegt die fluoreszierende Zone des Scopoletins.)
- Dragendorff-Reagenz nach PUECH (Reag. Nr. 14) mit anschließendem Nachsprühen mit einer 10proz. (G/V) Lösung von Natriumnitrit bis zur Transparenz: Nach ca. 15 min färbt sich die Atropinzone blaugrau und die des Hyoscyamins rotbraun an.

V. *Untersuchungslösung:* Bandförmige Auftragung (15 × 3 mm):

- DC-Lösung a: 20 mm³.
- DC-Lösung b: 30 mm³.
- DC-Lösung c: 5 mm³.
- DC-Lösung d: 0,1 cm³ werden mit 0,4 cm³ Methanol verdünnt, davon 10 mm³.
- Isoliertes Hyoscyamin: 5 mg werden in 2,0 cm³ Methanol gelöst, davon 10 mm³.

VI. *Vergleichslösung:* 5 mg Atropin werden in 2,0 cm³ Methanol gelöst, davon werden 10 mm³ bandförmig (15 × 3 mm) aufgetragen.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Hyoscyamins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von L-Hyoscyamin (2 mg in 200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3400	–OH	OH-Streckschwingung
3025, 3080 u. 3060	Aromat	CH-Streckschwingung
2940, 2950	$-\text{CH}_3, \text{CH}_2, -\text{CH}$	CH-Streckschwingung
1725	$>\text{C}=\text{O}$	CO-Streckschwingung
1600, 1470	Aromat	CC-Streckschwingung
1450–1445	$>\text{CH}_2$	CH-Beugeschwingung
1425	$-\text{CH}_3$ an N	asym. Beugeschwingung
1375–1325	–OH	asoz. OH-Beugeschwingung
1250–1215	–OH	freie OH-Beugeschwingung
1175–1160	$-\text{C}-\text{CO}-\text{O}(?)$	CO-Streck- und C–CO–O-Gerüstschwingung
1065 oder 1025	$-\text{C}-\text{OH}$	CO-Streckschwingung
770–730 und 695	monosubst. Aromat	CH-Beugeschwingung

3. Das *UV-Spektrum* des isolierten L-Hyoscyamins ist aufzunehmen. (5 mg Hyoscyamin in $25,0 \text{ cm}^3$ Methanol.)

$$\lambda_{\text{max}} = 264 \text{ nm } (\epsilon = 158).$$

$$\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm } (\epsilon = 200).$$

$$\lambda_{\text{max}} = 252 \text{ nm } (\epsilon = 175).$$

4. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Hyoscyamins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

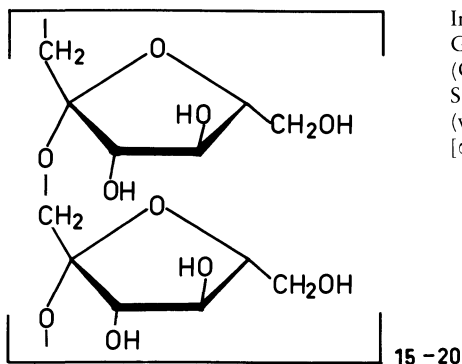
- Welche Nebenalkaloide können sich in der Mutterlauge finden?
- Welche Artefakte können sich aus L-Hyoscyamin beim Lagern bilden?
- In welchen weiteren Drogen kommen Hyoscyamin und Scopolamin vor?
- Aus welchen Aminosäuren ist Hyoscyamin biogenetisch aufgebaut?

2.27 Isolierung von Inulin aus Zichorienwurzel

Prinzip: Grob gepulverte Zichorienwurzel (*Cichorium intybus* L.) wird mit siedendem Wasser extrahiert. Zur Fällung der Pflanzensäuren und Eiweißstoffe wird der wäßrige Extrakt mit Calciumhydroxid versetzt. Überschlüssiges Calciumhydroxid wird durch Einleiten von Kohlendioxid ausgefällt. Das Filtrat wird mit Aktivkohle entfärbt, eingengt und mit Ethanol versetzt, bis Inulin auszufallen beginnt.

Gehalt: 10–15 %.

Strukturformel



Inulin (β -(1,2)-D-Fructofuranose mit endständigem Glucosemolekül)

$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$, $n = 20\text{--}30$, MG 3000–5000

Smp: (lufttrocken = 9–10 % Wasser): $165\text{--}170^\circ$,

(wasserfrei): $230\text{--}235^\circ$

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -39,9^\circ$ bis $-40,4^\circ$ (in Wasser)

Chemikalien

Cichorii radix pulv. gross. (710)
 Ether, 50 cm³
 Ethanol, 50 cm³
 Dichlorethan, 54 cm³
 Eisessig, 28 cm³
 Methanol, 30 cm³
 Dichlormethan, 100 cm³
 Calciumhydroxid, 3 g
 Aktivkohle, 5 g
 Kieselgur-Filtrierhilfsmittel, 20 g
 Schwefelsäure, 4proz. (G/V), 2,5 cm³
 Natriumcarbonat, 5 g
 DC-Schicht: Kieselgel, 20 × 20 cm u.
 Kieselgel F₂₅₄, 10 × 20 cm
 Inulin, 10 mg (Vergleich)
 Fructose, 5 mg (Vergleich)
 Glucose, 5 mg (Vergleich)
 5-Hydroxymethylfurfural, 5 mg (Vergleich)

Reagenzien

- Diphenylamin-Reagenz (Reag. Nr. 11)
- Aminohippursäure-Reagenz (Reag. Nr. 2)
- 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagenz (Reag. Nr. 9)

Geräte

1 Rundkolben, NS 29, 500 cm³
 Bechergläser: 250 cm³ (2),
 400 cm³ (2), 600 cm³ (2)
 2 Erlenmeyerkolben, Weithals, 500 cm³
 Trichter, Ø 8 cm (1), Ø 5 cm (1)
 1 Büchner-Trichter, Ø 10 cm
 mit passendem Gaze-Filter und
 passendem Guko zu Saugflasche, 500 cm³
 1 Glasfiltertrichter, D3, Ø 6 cm mit
 passendem Guko zu Saugflasche, 500 cm³
 1 Kristallisierschale, Ø 8 cm

Allgemeine Geräte

Magnetrührer mit Stäbchen
 Wasserbad
 Rotationsverdampfer
 pH-Papier
 Thermometer
 DC-Grundausrüstung
 Vakuum-Trockenpistole
 TAS-Ofen mit Zubehör
 Kohlendioxid-Gasflasche mit
 Entnahme-Ventil und Gaseinleitungsrohr
 mit Anschluß

Durchführung

50 g grob gepulverte Zichorienwurzeln (710) werden in einem Becherglas (600 cm³) mit 200 cm³ Wasser versetzt und unter Rühren langsam auf 80°C erhitzt. Die heiße Lösung wird über ein Gaze-Filter in einem Büchner-Trichter abgesaugt. Der Drogenrückstand wird anschließend mit 100 cm³ Wasser versetzt, abermals auf 80°C erwärmt und heiß abgesaugt. Die vereinigten Filtrate (= DC-Lösung a) werden mit 3 g Calciumhydroxid versetzt und auf dem Wasserbad erhitzt, bis Koagulation eintritt (ca. 5–10 min). Anschließend wird heiß über einen Büchner-Trichter mit Filterpapiereinlage filtriert.

In dieses klare, rostbraune Filtrat leitet man Kohlendioxid ein bis zur Neutralisation (ca. 2–3 min; Vorsicht Schaumbildung!). Nach dem Erhitzen auf ca. 80°C fällt Calciumcarbonat aus, das über einen Büchner-Trichter abgesaugt wird. Zur Entfärbung wird das rötlich braune Filtrat (= DC-Lösung b) dreimal mit je 500 mg Aktivkohle versetzt, aufgeköcht und heiß filtriert. (Beim letzten Filtrationsvorgang empfiehlt es sich, zur vollständigen Entfernung der Aktivkohle eine ca. 3–5 mm dicke Kieselgur-Filtrierhilfsmittel-Schicht auf das Filterpapier zu geben.)

Die erhaltene noch schwach gelbe Lösung wird portionsweise am Rotationsverdampfer auf die Hälfte eingengt und mit so viel Ethanol versetzt, bis Inulin auszufallen beginnt; zur Vervollständigung der Fällung wird die Lösung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Das ausgefallene Inulin wird über einen Glasfiltertrichter abgesaugt, mit 20 cm³ Ether gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet, bis der Geruch nach Ether verschwunden ist.

Falls das ausgefallene Produkt noch nicht farblos ist, muß noch einmal mit wenig heißem Wasser als Lösungsmittel unter Aktivkohlezusatz, wie vorstehend beschrieben, umkristallisiert werden.

Ausbeute an lufttrockenem Inulin: Ca. 5 g.

Zeitdauer: 1,5 Tage.

Herstellung eines wasserfreien Produkts

Ca. 1 g des isolierten Inulins werden auf einen passenden Aluminiumfolienstreifen ausgebreitet und 12 h in der Vakuum-Trockenpistole bei 80°C und 1 Torr aufbewahrt. – Der Trocknungsprozeß ist durch Bestimmung der Schmelzpunkte vor und nach der Trocknung zu verfolgen.

Auswertung**1. Dünnschicht-Chromatographie****a) Isolierungsschritte und Nachweis der Hydrolyseprodukte**

I. *Standardmethode*: Ja.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: Dichlorethan-Eisessig-Methanol-Wasser (54 + 28 + 11 + 7), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis*: Abdampfen des Fließmittels bei 110°C, besprühen mit Diphenylamin-Reagenz (Reag. Nr. 11) und anschließend 5–10 min auf 110°C erhitzen (Fructose im unteren Drittel des Chromatogramms färbt sich braun an und die darunter liegende Glucose graublau) oder mit Aminohippursäure-Reagenz (Reag. Nr. 2) und anschließend 5–10 min auf 110°C erhitzen. Fructose färbt sich braunrot an und zeigt im langwelligeren UV-Licht eine gelb-rötliche Fluoreszenz.

V. *Untersuchungslösung*: Bandförmige Auftragung (10 × 3 mm)

a) DC-Lösung a: 10 mm³.

b) DC-Lösung b: 10 mm³.

c) isoliertes Inulin: 10 mg werden in 2 cm³ Wasser gelöst, davon 10 mm³.

d) *Hydrolyse*: 0,1 g Inulin werden in 2,5 cm³ 4proz. Schwefelsäure gelöst und 5 min auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach der Neutralisation mit festem Natriumcarbonat wird 1 cm³ der erhaltenen Lösung mit 5 cm³ Methanol versetzt. Nach Absetzen des entstandenen Niederschlags werden von der überstehenden, klaren Lösung 10 mm³ aufgetragen.

VI. *Vergleichslösung*: Je 5 mg Fructose und Glucose werden in je 1,0 cm³ Wasser gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig auf.

b) Nachweis der Thermolyseprodukte (u. a. 5-Hydroxymethylfurfural)

mit dem TAS-Verfahren

DC-Bedingungen:

I. *Standardmethode*: Ja.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: Dichlormethan-Methanol (96 + 4), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis*

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (5-Hydroxymethylfurfural ist im unteren Drittel des Chromatogramms als fluoreszenzmindernde Zone zu erkennen).

b) Besprühen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagenz (Reag. Nr. 9) (5-Hydroxymethylfurfural färbt sich gelb an).

V. *TAS-Bedingungen*

Einwaage: Je 5 mg Inulin von a) isoliertem Produkt und b) Handelsprodukt.

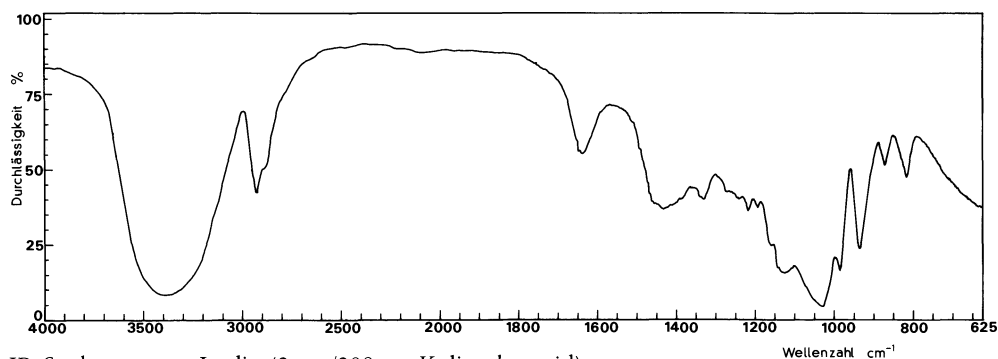
Temperatur: 250°C.

Treibmittel: 2 Kügelchen Molekularsieb 4 Å, (= 0,4 nm), wasserdampfgesättigt.

Verweilzeit: 120 s.

VI. *Vergleichslösung*: 1 mg 5-Hydroxymethylfurfural wird in 0,5 cm³ Essigsäureethylester gelöst, davon trägt man 5 mm³ punktförmig auf.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Inulins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Inulin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3380	– OH	OH-Streckschwingung
2930, 2880	>CH_2	CH-Streckschwingung
1460–1330	>CH_2 und – OH	asym. CH-Beugeschwingung asoz. OH-Beugeschwingung
1130–1120	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{OH} \text{ (prim.) und Ether} \\ \end{array}$	CO-Streckschwingung und asym. CO-Streckschwingung
1030	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{OH} \text{ (sek.)} \\ \end{array}$	CO-Streckschwingung
934	Ether	sym. CO-Streckschwingung

3. Es sind die *Schmelzpunkte* (bzw. Zersetzungspunkte) des isolierten lufttrockenen und wasserfreien Inulins zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

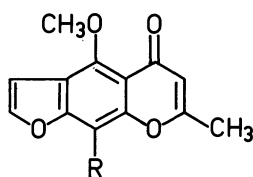
- Geben Sie weitere pflanzliche Polysaccharide an, die aus Hexosen (welchen?) aufgebaut sind. In welchen Pflanzen sind diese enthalten?
- Was sind Pektine?
- Was sind Schleime und Gumen?

2.28 und 2.29 Isolierung von Khellin und Visnagin aus Ammi visnaga-Früchten

Prinzip: Gepulverte Ammi visnaga-Früchte (*Ammi visnaga* (L.) LAMARCK) werden zur Entfernung der fetten Öle kurz mit Petrolether (40–60°C) extrahiert. Durch eine anschließende Extraktion mit Dichlormethan werden die Furanochromone abgetrennt. Aus dem eingedampften Extrakt werden sie säulenchromatographisch isoliert. Der Drogenrückstand ist für die Isolierung von Khellinin aufzubewahren.

Gehalte: Khellin: 0,5%, Visnagin: 0,05% (Lit.), prakt. 0,5%.

Strukturformeln



R = OCH₃ Khellin

R = H Visnagin

Khellin (5,8-Dimethoxy-2-methyl-furanochromon)
C₁₄H₁₂O₅, MG 260,25; Smp: 154–155°C,

Visnagin (5-Methoxy-2-methyl-furanochromon)
C₁₃H₁₀O₄, MG 230,22; Smp: 144–145°C

Chemikalien

Ammeos visnagae fructus pulv. (300), 70 g
 Dichlormethan, 1500 cm³
 Ethanol, 500 cm³
 Essigsäureethylester, 500 cm³
 Petrolether (40–60°C), 800 cm³
 Natriumsulfat, wasserfrei, 50 g
 Aktivkohle, 200 mg
 Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 100 g
 Seesand, 20 g
 DC-Schichten: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
 Khellin, 5 mg (Vergleich)
 Visnagin, 5 mg (Vergleich)

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure
 (Reag. Nr. 3)

Geräte

1 Extraktionsapparatur nach Soxhlet, 250 cm³,
 mit pass. Rückflußkühler
 Rundkolben, NS 29: 500 cm³ (2), 250 cm³ (1)
 Spitzkolben NS 14,5: 25 cm³ (3), 100 cm³ (3)
 Bechergläser: 400 cm³ (1), 250 cm³ (2), 50 cm³ (2)
 Trichter, Ø 8 cm (1), Ø 6 cm (1)
 2 Glasfiltertrichter, D3,
 Ø 5 cm mit pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm³
 1 Chromatographiesäule, mit Kühlmantel
 l = 130 cm, Ø_i = 1,5 cm

Allgemeine Geräte

Rotationsverdampfer
 Fraktionssammler mit Zubehör
 Wasserbad
 DC-Grundausrüstung

Durchführung

a) *Extrakt*: 70 g Ammeos visnagae fructus pulv. (300) (Ausmahlung aus 100 g tot.) werden mit 350 cm³ Petrolether (40–60°C) in einer Soxhlet-Apparatur (250 cm³) extrahiert. Nach 2 Umläufen ist die Extraktion zu beenden. Der Petrolether-Extrakt (= DC-Lösung a) wird verworfen. Die Extraktion der Droge wird 6 h lang mit 350 cm³ Dichlormethan fortgesetzt. Der Dichlormethan-Extrakt wird am Rotationsverdampfer bis zur Gewichtskonstanz eingengt. (5 mm³ werden in 1 cm³ Dichlormethan gelöst = DC-Lösung b.)

b) Säulen-Chromatographie

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographie-Säule: l = 130 cm, Ø_i = 1,5 cm mit Kühlmantel

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC, 0,063–0,2 mm, 100 g.

Elutionsmittelfolge: Petrolether (40–60°C)-Dichlormethan (50 + 50), 200 cm³.

Dichlormethan, 200 cm³.

Dichlormethan-Essigsäureethylester (70 + 30), 200 cm³.

Dichlormethan-Essigsäureethylester (50 + 50), 500 cm³.

Aufgabemenge: Eingengter Dichlormethan-Extrakt (10–12 g).

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Fraktionen: 10–15 cm³.

Nach der dc Untersuchung der einzelnen Fraktionen werden vereinigt:

a) Fraktionen, die ausschließlich Khellin enthalten (= DC-Lösung c), Ausbeute 2 g.

b) Fraktionen, die Khellin und Visnagin enthalten (= DC-Lösung d), Ausbeute 0,7 g.

c) Fraktionen, die ausschließlich Visnagin enthalten (= DC-Lösung e), Ausbeute 0,4 g.

Die nach dem Einengen der entsprechenden Fraktionen erhaltenen amorphen Produkte können zu kristallinen Produkten umkristallisiert werden, indem sie in der ca. 20fachen Menge Dichlormethan unter Erhitzen auf dem Wasserbad aufgelöst werden. Unter weiterem Erwärmen auf dem Wasserbad setzt man gerade so viel Petrolether (40–60°C) hinzu, bis eine Trübung auftritt.

Bei Khellin tritt fast schlagartig eine Auskristallisation ein. Zur weiteren Auskristallisation werden die Lösungen bei 4°C aufbewahrt.

Ausbeuten: 600 mg Khellin (DC-Lösung c).

400 mg Khellin und Visnagin (DC-Lösung d).

300 mg Visnagin (DC-Lösung e).

Zeitbedarf: 2 Tage.

c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode*: Ja.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: Essigsäureethylester, KS, 10 cm.

IV. *Nachweis*

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren. (Khellin hRf 25–30 und Visnagin hRf 20–25 sind als fluoreszenzmindernde Zonen im unteren Drittel des Chromatogramms zu erkennen.)

b) UV₃₆₅: Fluoreszierende Zonen markieren. (Khellin fluoresziert gelb, Visnagin fluoresziert blau.)

c) Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3). Schon bei Zimmertemperatur färben sich Khellin und Visnagin (weniger) gelb an. Beim anschließenden Erhitzen verfärben sie sich nach grau, auch zusätzliche Zonen treten auf den DC der Extrakte a und b auf. (u.a. eine sich rotbraun anfärbende Zone, die etwa in Höhe der Vergleichslösung «Olivenöl» liegt, und den fetten Ölen zuzuordnen ist.)

V. *Untersuchungslösung*: Punktförmige Auftragung:

a) DC-Lösung b: 5 mm³ werden in 1 cm³ Dichlormethan gelöst, davon werden 5 mm³ aufgetragen.

b) Jede 3. Fraktion ab der 20. Fraktion, Auftragemenge 5 mm³.

VI. *Vergleichslösung*: Je 5 mg Khellin und Visnagin werden in je 2 cm³ Dichlormethan gelöst, davon werden je 5 mm³ punktförmig aufgetragen. Ferner 5 mm³ punktförmig einer 0,2proz. Lösung von Olivenöl in Dichlormethan.

Auswertung

1. Abschließende DC

DC-Bedingungen: I–IV und VI wie b)

V. *Untersuchungslösung*: Bandförmige Auftragung (15 × 3 mm).

a) DC-Lösung a, 10 mm³

b) DC-Lösung b, vgl. oben b), V, a

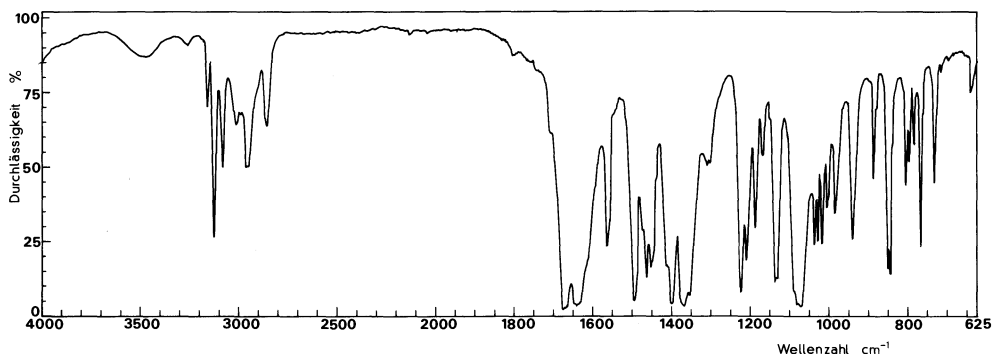
c) DC-Lösung c

d) DC-Lösung d

e) DC-Lösung e

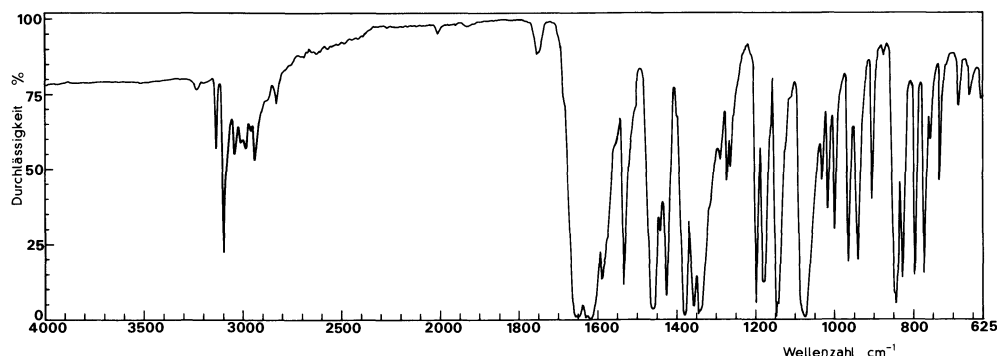
Je 5 mg werden in je 2 cm³ Dichlormethan gelöst.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Khellins und des isolierten Visnagins sind aufzunehmen, mit den abgebildeten Spektren und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Khellin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3100–3050	CH in Aromaten	CH-Streckschwingung
2990, 2940	–CH ₃	CH-Streckschwingung
2848	–O–CH ₃	CH-Streckschwingung
1647	konj. >C=O	C=O-Streckschwingung
1630	2 H an Doppelbindung	C=C-Streckschwingung
1618	Aromat	CC-Streckschwingung
1541	Aromat	CC-Streckschwingung
1478	Aromat	CC-Streckschwingung
1441	>CH_2 in α -Stellung zu >C=O sowie –OCH ₃	CH-Beugeschwingung asym. CH-Beugeschwingung
1385	–CH ₃	sym. CH-Beugeschwingung
1216 und 1195	Aliphat. arom. Ether (CH ₃ –O–Ar)	asym. CH-Beugeschwingung
1121 und 1058	Ether des 5er und 6er Ringes	asym. CH-Beugeschwingung
1020 und 1005	Aliphat. arom. Ether (CH ₃ –O–Ar)	sym. CH-Beugeschwingung
967	2 H an Doppelbind. (trans)	CH-Beugeschwingung
965–762	Ether des 5er und 6er Ringes	sym. CO-Streckschwingung



IR-Spektrum von Visnagin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3140, 3100, 3040 u. 3010	CH in Aromaten	CH-Streckschwingung
2990–2940	–CH ₃ und >CH_2	CH-Streckschwingung
2841	–OCH ₃	CH-Streckschwingung
1648	konj. >C=O	C=O-Streckschwingung
1630	2 H an der Doppelbind.	C=C-Streckschwingung
1648, 1535	Aromat	CC-Streckschwingung
1468–1460	Aromat	CC-Streckschwingung
1435	>CH_2 in α -Stellung zu >C=O	CH-Beugeschwingung
1381	–CH ₃	sym. CH-Beugeschwingung
1196 und 1178	Aliphat. arom. Ether (CH ₃ –O–Ar)	asym. CO-Streckschwingung
1146–1075	Ether des 5er und 6er Rings	asym. CO-Streckschwingung
1031–1000	aliphat. arom. Ether (CH ₃ –O–Ar)	sym. CO-Streckschwingung
967	2 H an der Doppelbind. (trans.)	CH-Beugeschwingung
845	Aromat (pentasubst.)	CH-Beugeschwingung
828–774	Ether des 5er und 6er Rings	sym. CO-Streckschwingung

3. Die *UV-Spektren* des isolierten Khellins und Visnagins sind aufzunehmen. (Je 10 mg in je 50 cm³ Ethanol, davon je 1 cm³ mit Ethanol zu 25 cm³ auffüllen.)

Khellin: $\lambda_{\max} = 250 \text{ nm}$ ($\epsilon = 28\,000$).

$\lambda_{\max} = 340 \text{ nm}$ ($\epsilon = 4\,000$) (Schulter).

Visnagin: $\lambda_{\max} = 245 \text{ nm}$ ($\epsilon = 30\,000$).

$\lambda_{\max} = 320 \text{ nm}$ ($\epsilon = 4\,000$).

4. Die *Schmelzpunkte* des isolierten Khellins und Visnagins sind zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

a) Zu welcher Naturstoffgruppe gehören Khellin und Visnagin?

b) Was sind Furanocumarine? – Geben Sie Drogen an, die diese enthalten.

c) Wie kann man Ammi visnagae und Ammi majus-Früchte unterscheiden?

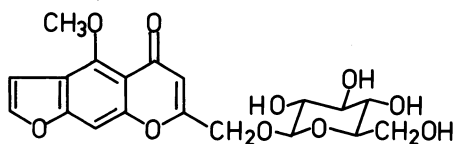
d) Worauf beruht der Nachweis von Khellin und Visnagin mit konzentrierter Salzsäure?

2.30 Isolierung von Khellinin (= Khellolglucosid) aus Ammi visnaga-Früchten

Prinzip: Der Drogenrückstand von Ammi visnaga-Früchten, der bei der Isolierung von Khellin und Visnagin anfällt, wird mit siedendem Ethanol extrahiert. Aus dem eingengten ethanoli-schen Extrakt wird Khellinin durch Umkristallisation rein dargestellt.

Gehalt: 1 %.

Strukturformel



Khellinin (Khellolglucosid)

C₁₉H₂₀O₁₀, MG 408,37; Smp: 174–176 °C (aus Ethanol), 142–144 °C (aus Wasser)

Chemikalien

Drogenrückstand aus der Khellin-

Visnagin-Isolierung

Ethanol, 500 cm³

Essigsäureethylester, 300 cm³

Methanol, 50 cm³

DC-Schichten, Kieselgel F₂₅₄

Khellinin, 2 mg (Vergleich)

Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 20 g

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 500 cm³

Wasserbad

Magnetrührer mit Stäbchen

Rotationsverdampfer

DC-Grundausrüstung

Geräte

1 Rundkolben, NS 29, 500 cm³

1 Rundkolben, NS 29, 250 cm³

1 Rückflußkühler, NS 29

3 Bechergläser, 100 cm³

1 Büchner-Trichter, Ø 7 cm mit

pass. Guko zu Saugflasche, 500 cm³

1 Glasfiltertrichter, Ø 5 cm, D3,

mit pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm

2 Trichter, Ø 4 cm

1 Chromatographiesäule $l = 20 \text{ cm}$, $\varnothing_i = 2 \text{ cm}$

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Durchführung

Zur vollständigen Entfettung wird der Drogenrest der Khellin- und Visnagin-Isolierung noch weitere 8 h mit Dichlormethan in der Soxhlet-Extraktionsapparatur extrahiert. Der Drogen-

rest wird auf einer Wärmeplatte von 50°C von den Dichlormethanresten befreit und danach 1 h mit 350 cm³ Ethanol unter Rückfluß gekocht. Die heiße ethanolische Lösung wird über einen Büchner-Trichter abgesaugt und der Drogenrückstand mit 50 cm³ heißem Ethanol gewaschen. Die vereinigten Ethanol-Filtrate (= DC-Lösung a) werden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der schmierig-braune – manchmal auch feste – Rückstand wird mit 20 cm³ Ethanol auf dem siedenden Wasserbad aufgeköcht und die heiße Lösung abdekantiert. Aus dieser scheidet sich beim Abkühlen auf Zimmertemperatur nach 1–2 h ein schmieriger Bodensatz aus, von dem erneut abdekantiert wird. Aus dieser Lösung scheiden sich nach 2–3 Tagen leicht gelbliche Kristalle ab, die über einen Glasfiltertrichter abgesaugt werden. (Mutterlauge 1: 10 mit Ethanol verdünnt = DC-Lösung b).

Ausbeute an Roh-Khellinin: 200 mg.

Das Roh-Khellinin wird mit gerade so viel Ethanol (ca. 7 cm³) versetzt, bis es sich im siedenden Wasserbad gerade auflöst, und danach wird die gleiche Menge Wasser hinzugegeben. Schon bei Wasserzusatz beginnt die Kristallisation von farblosem Khellinin, das nach 3stündigem Stehenlassen im Kühlschrank über einen Glasfiltertrichter abgesaugt wird.

Ausbeute: 150 mg.

Zeitbedarf: 4 Tage.

Falls aus der ethanolischen Lösung keine Kristallisation erfolgt, wird eine säulenchromatographische Trennung über eine kurze Säule mit Kieselgel als stationärer Phase durchgeführt. Die ethanolische Lösung wird bis auf ca. 10 cm³ eingengt.

20 g Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm) werden in einem Gemisch aus Essigsäureethylester-Methanol-Wasser (75 + 15 + 10) in eine Glassäule von $l = 20$ cm und $\varnothing_i = 2$ cm eingeschlämmt. Auf die stationäre Phase wird der eingengte ethanolische Extrakt aufgegeben und danach mit 200 cm³ des o.g. Gemisches eluiert. Es werden Fraktionen von ca. 15 cm³ aufgefangen. In den Fraktionen 7, 8, 9 scheiden sich schon nach kurzer Zeit Kristalle von Khellinin aus, die nach ca. 2 h über einen Glasfiltertrichter abgesaugt werden und gegebenenfalls wie oben beschrieben aus verdünntem Ethanol umkristallisiert werden.

Ausbeute: 150 mg.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Essigsäureethylester-Methanol-Wasser (75 + 15 + 10), KS.

IV. Nachweis:

a) UV₂₅₄: Die im mittleren R_f-Bereich liegende Zone des Khellinins zeigt Fluoreszenzminderung.

b) UV₃₆₅: Khellinin zeigt eine blaue Eigenfluoreszenz.

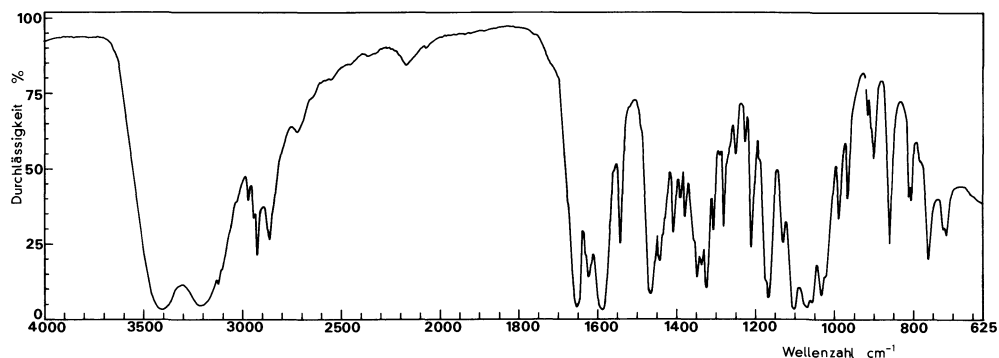
c) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Reag. Nr. 3), 5–10 min auf 110°C (Khellinin färbt sich schon nach kurzer Zeit gelb an und verfärbt sich später nach graublau).

V. Untersuchungslösung: Bandförmige Auftragung (10 × 3 mm).

a, b) DC-Lösungen a und b je 10 mm³.

c, d) Roh-Khellinin und Rein-Khellinin: Je 2 mg werden in je 0,5 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man je 10 mm³ auf.

VI. Vergleichslösung: 2 mg Khellinin werden in 0,5 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) auf.



IR-Spektrum von Khellinin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3410–3200	–OH des Zuckerrestes	OH-Streckschwingung
3122	2 H an der Doppelbindung	CH-Streckschwingung
2968–2922	>CH_2 und $-\text{C}-\text{H}$	CH-Streckschwingung
2860	–OCH ₃	CH-Streckschwingung
1660–1650	konj. >C=O	C=O-Streckschwingung
1624	2 H an der Doppelbindung	C=C-Streckschwingung
1590, 1542, 1472	Aromat	CC-Streckschwingung
1449–1445	–OCH ₃	asym. Beugeschwingung
1407	>CH_2 in α -Stellung zu >C=O	CH-Beugeschwingung
1378	–CH ₃	sym. CH-Beugeschwingung
1348–1304	sek. und tert. OH	asoz. und freie OH-Beugeschwingung
1210	aliphat. arom. Ether ($\text{CH}_3-\text{O}-\text{Ar}$)	asym. CO-Streckschwingung
1169–990	Ether der 5er und 6er Ringe, aliphat. arom. Ether ($\text{CH}_3-\text{O}-\text{Ar}$)	sym. CO-Streckschwingung
	sek. und tert. OH-Gruppen	sym. CO-Streckschwingung
965	2 H an der Doppelbindung (trans.)	CH-Beugeschwingung
900 und 860	Aromat (pentasubstituiert)	CH-Beugeschwingung
810 und 761	Ether der 5er und 6er Ringe	sym. CO-Streckschwingung

3. Das *UV-Spektrum* des isolierten Khellinins ist aufzunehmen (1 mg in 25 cm³ Ethanol).

$$\lambda_{\text{max}} = 245 \text{ nm } (\epsilon = 12000).$$

$$\lambda_{\text{max}} = 325 \text{ nm } (\epsilon = 1200).$$

4. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Khellinins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

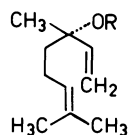
- Welche O-Glykoside kann man den Grundstrukturen der Aglyka nach unterscheiden?
- Nach welcher Methode kann man Khellinin quantitativ bestimmen?
- Welche weiteren Inhaltsstoffe sind in *Ammeos visnagae fructus* enthalten?

2.31 und 2.32 Isolierung von Linalool und Linalylacetat aus Lavendelblüten

Prinzip: Aus ganzen Lavendelblüten (*Lavandula angustifolia* MILLER) wird das etherische Öl durch Wasserdampfdestillation gewonnen und anschließend säulenchromatographisch aufgetrennt.

Gehalt: Eth. Öl: 0,8–1 %, darin 30–50 % Linalylacetat und 25–40 % Linalool.

Strukturformel



R = H: Linolool
R = $\cdot\text{OC}\cdot\text{CH}_3$: Linalylacetat

Linalool: $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$, MG 154,2; $\text{Sdp}_{14\text{ Torr}}$: 86–87°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20^\circ$
Linalylacetat: $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$, MG 196,3; $\text{Sdp}_{25\text{ Torr}}$: 115–116°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9^\circ$

Chemikalien

Lavandulae flos, tot. 150 g
Pentan, 10 cm³
Petrolether (40–60°C), 200 cm³
Dichlormethan, 2000 cm³
Ether, peroxidfrei, 30 cm³
Salzsäure, 10proz. (G/V), 10 cm³
Natriumsulfat, wasserfrei, 20 g
DC-Schichten Kieselgel F₂₅₄,
10 × 20 und 20 × 20 cm
Natriumhydrogencarbonat, 1 g
Lithiumaluminiumhydrid, 50 mg
Kieselgel zur SC, 0,063–0,2 mm, 100 g
Seesand, 50 g

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 2000 cm³
Wasserbad
Wärmeplatte bis 60°C
Rotationsverdampfer

Geräte

Apparatur zur kontinuierlichen Wasserdampfdestillation
Rundkolben, NS 29, 2000 cm³ (1), 250 cm³ (1)
2 Spitzkolben: 10 cm³, NS 14,5
mit passendem NS-Stopfen
1 Erlenmeyerkolben, 10 cm³
2 Mikrofilternutschen, D3, 2 cm³
1 Trichter, Ø 4 cm
Chromatographiesäule, $l = 120\text{ cm}$, $\varnothing_i = 1,5\text{ cm}$
mit Kühlmantel

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

pH-Papier

Fraktionssammler mit Zubehör
DC-Grundausrüstung

Durchführung

- a) *Gewinnung des etherischen Öles:* 150 g Lavendelblüten werden mit 1200 cm³ Wasser in einem 2000 cm³-Rundkolben 4 h einer kontinuierlichen Wasserdampfdestillation unterworfen. Als Vorlage dienen 2 cm³ Pentan. Das Pentan-eth. Öl-Gemisch wird nach Beendigung der Destillation wasserfrei in einen 10 cm³-Erlenmeyerkolben abgelassen. Das Pentan wird auf einer Wärmeplatte bei 50°C verdampft und anschließend der eth. Ölgehalt gravimetrisch bestimmt.

Ausbeute: ca. 1 g.

b) Säulenchromatographie

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 120\text{ cm}$, $\varnothing_i = 1,5\text{ cm}$ mit Kühlmantel.

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC, 0,063–0,2 mm, 100 g.

Elutionsmittel: Petrolether-Dichlormethan (50 + 50), 300 cm³,
Dichlormethan, 1500 cm³.

Aufgabemenge: 1 g eth. Öl.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Faktionen: ca. 10 cm³.

Ausbeuten: Linalylacetat: 300–450 mg
Linalool: 150–250 mg } je nach Droge verschieden.

Anmerkung: Gelegentlich kommt es vor, daß das Linalylacetat von einer geringen Menge einer bei der DC fluoreszenzmindernden Zone begleitet ist.

c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode:* Ja.

II. *Schicht:* Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel:* Dichlormethan, KS.

IV. *Nachweis*

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Begleitstoffe).

b) Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure, anschließend 5–10 min auf 110 °C. (Sowohl Linalylacetat (hRf 50–60) als auch Linalool (hRf 25–30) färben sich rotbraun an.)

V. *Untersuchungslösung:* punktförmige Auftragung.

a) 10 mm³ eth. Öl werden in 2,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon 5 mm³.

b) Ab Fraktion 10 von jeder Fraktion 5–10 mm³.

VI. *Vergleichslösung:* Je 2 mm³ Linalool und Linalylacetat werden in je 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man je 5 mm³ punktförmig auf.

Auswertung

1. *Überführung von Linalylacetat in Linalool*

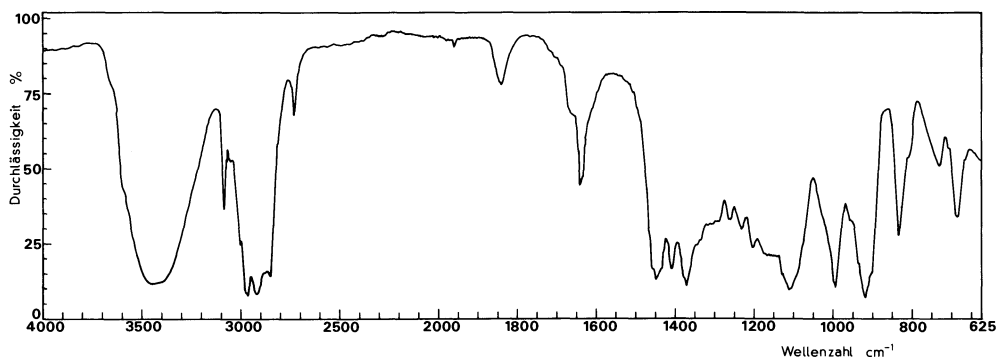
Prinzip: Reduktion des Esters mit Lithiumaluminiumhydrid.

Durchführung: 10 mm³ Linalylacetat werden in einem Reagenzglas in 2 cm³ Ether gelöst, dazu gibt man eine Spatelspitze (ca. 50 mg) Lithiumaluminiumhydrid (VORSICHT: langsame Zugabe, da heftige Reaktion mit Restfeuchtigkeit!). Danach erwärmt man vorsichtig einige min auf dem Wasserbad, ergänzt den verdampfenden Ether. Nun wird vorsichtig durch tropfenweise Zugabe von 10proz. Salzsäure hydrolysiert, bis eine klare Lösung entstanden ist und der pH-Wert ungefähr 1 beträgt. Die überstehende Etherphase wird abpipettiert und in einem Reagenzglas durch Schütteln mit 2 cm³ einer 5proz. Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert. Die Etherphase wird abpipettiert und über einen Glaswattebausch mit Natriumsulfatauflage filtriert und auf dem Wasserbad weitgehend eingengt. Davon trägt man 5 und 10 mm³ punktförmig zur DC auf.

DC-Bedingungen: Siehe Punkt c).

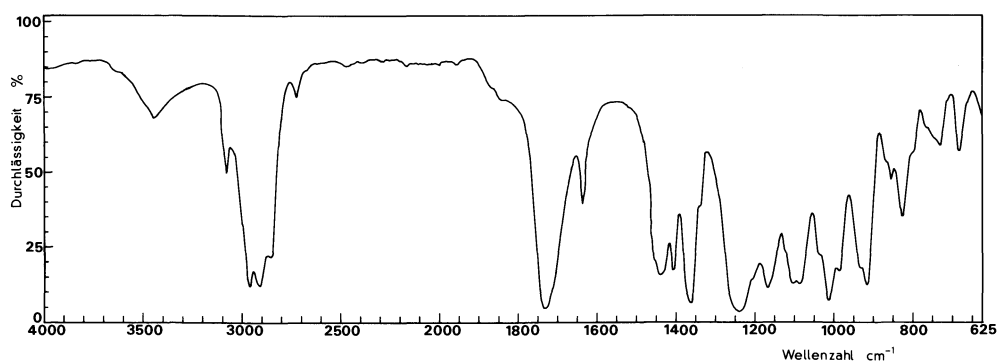
Änderung: Kieselgelschicht: 10 × 20 cm.

2. Die IR-Spektren des isolierten Linalools und Linalylacetats sind aufzunehmen, mit den abgebildeten Spektren und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Linalool (als Film zwischen Kaliumbromidpreßlingen).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3440	–OH	OH-Streckschwingung
3080	monosubst. Doppelbind.	CH-Streckschwingung
2970–2860	–CH ₃ , >CH_2 , $\text{–}\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}\text{–H}$	CH-Streckschwingung
1840	monosubst. Doppelbind.	CH-Oberschwingung
1674	trisubst. Doppelbind.	CC-Streckschwingung
1640	monosubst. Doppelbind.	CC-Streckschwingung
1450	–CH ₃ und >CH_2	asym. CH-Beuge- und CH-Beugeschw.
1375	$=\text{C}(\text{CH}_3)_2$	sym. CH-Beugeschwingung
1110	$\text{–}\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}\text{–OH}$	CO-Streckschwingung
993 und 920	monosubst. Doppelbind.	CH-Beugeschwingung
835	trisubst. Doppelbind.	CH-Beugeschwingung
685	–OH	OH-Beugeschwingung



IR-Spektrum von Linalylacetat (als Film zwischen Kaliumbromidpreßlingen).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3080	monosubst. Doppelbind.	CH-Streckschwingung
2960–2860	–CH ₃ , >CH_2 , $\text{–}\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}\text{–H}$	CH-Streckschwingung
1735	>C=O	C=O-Streckschwingung
1640	monosubst. Doppelbind.	C=C-Streckschwingung
1445	–CH ₃ , >CH_2	asym. CH-Beuge- und CH-Beugeschwingung
1410	monosubst. Doppelbind.	CH-Beugeschwingung
1365	$=\text{C}(\text{CH}_3)_2$	sym. CH-Beugeschwingung
1240	–CO–O–	CO-Streck- und C–CO–O–Gerüstschwingung
985 und 920	monosubst. Doppelbind.	CH-Beugeschwingung

Weitere Aufgaben

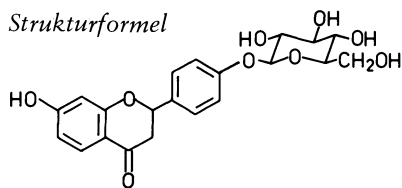
- Nennen Sie Beispiele für acyclische, monocyclische und bicyclische (Mono-) Terpenalkohole und ihr Vorkommen.
- Formulieren Sie den üblichen Biogeneseweg für Terpene.
- In welchen anderen Pflanzen ist Linalool noch enthalten?
- Schreiben Sie die Reaktionsgleichung für die Reduktion des Linalylacetats mit Lithiumaluminiumhydrid.

2.33 Isolierung von Liquiritin aus geschälter Süßholzwurzel

Prinzip: Geschälte und pulverisierte Süßholzwurzel (*Glycyrrhiza glabra* L.) wird mit Aceton extrahiert. Aus diesem eingengten und in Methanol aufgenommenen Extrakt kristallisiert Liquiritin aus, das aus verdünntem Ethanol umkristallisiert wird.

Gehalt: 1 %.

Strukturformel



Liquiritin (7,4'-Dihydroxyflavanon-4'-O-glucosid)
C₂₁H₂₂O₉, MG 418,4; Smp: 212 °C

Chemikalien

Liquiritiae mund. radix pulv. (300),
Aceton, 750 cm³
Methanol, 60 cm³
Ethanol, 10 cm³
Essigsäureethylester, 75 cm³
DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄

Allgemeine Geräte

Wasserbad
DC-Grundausrüstung
Rotationsverdampfer

Geräte

1 Extraktionsapparatur nach Soxhlet,
500 cm³ mit pass. Rückflußkühler
1 Rundkolben, NS 29, 1000 cm³
1 Trichter, Ø 6 cm
Bechergläser: 100 cm³ (2), 50 cm³ (1)
2 Glasfiltertrichter, D3, Ø 5 cm mit pass.
Guko zu Saugflasche 100 cm³

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Durchführung

100 g geschälte und pulverisierte Süßholzwurzeln werden 8 h in einer Soxhlet-Extraktionsapparatur (500 cm³) mit 750 cm³ Aceton*) in einem 1000 cm³-Rundkolben extrahiert. Der Extrakt (= DC-Lösung a) wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt (Ausbeute: ca. 3,5 g). Der erhaltene bräunlichgrüne sirupartige Rückstand wird mit 35 cm³ Methanol versetzt und auf dem Wasserbad kurz aufgeköcht und über ein Filterpapier in ein 100 cm³-Becherglas filtriert. Der Kolben wird mit 5 cm³ Methanol gespült, und die Spüllösung über das gleiche Filter in das Becherglas filtriert. Das Filtrat wird bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Falls sich harzige Bestandteile am Boden des Becherglases abgesetzt haben, wird von diesen abdekantiert. Aus dieser abdekantierten Lösung (= DC-Lösung b) scheiden sich im Laufe von 1–2*) Tagen farblose bis leicht gelbliche Kristalle aus, die über einen Glasfiltertrichter abgesaugt werden (Mutterlauge = DC-Lösung c). Der Niederschlag wird mit ca. 2 cm³ Aceton und danach mit ca. 5 cm³ Essigsäureethylester gewaschen und an der Luft getrocknet.

Ausbeute an Roh-Liquiritin: ca. 400 mg.

Zur Umkristallisation werden 350 mg Roh-Liquiritin in 10 cm³ Wasser in der Siedehitze des Wasserbads gelöst unter Zusatz von 10 cm³ Ethanol. Beim Abkühlen auf Zimmertemperatur (nach ca. 1 h) beginnt die Ausfällung eines farblosen Niederschlags. Nach Stehenlassen im Kühlschrank über Nacht wird der farblose Niederschlag über einen Glasfiltertrichter abgesaugt, zunächst mit ca. 1 cm³ kaltem Wasser, dann mit 10 cm³ Ether gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet (Mutterlauge = DC-Lösung d).

Ausbeute: 200 mg.

Zeitbedarf: 4 Tage.

*) Eine vorhergehende 5-stündige Extraktion mit 750 cm³ Dichlormethan verkürzt die Kristallisationsdauer.

Auswertung**1. Dünnschicht-Chromatographie**

I. Standardmethode: ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Essigsäureethylester-Methanol-Wasser (75 + 15 + 10), KS, 10 cm.

IV. Nachweis: Nach Abdampfen des Fließmittels.

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Liquiritin im mittleren R_f-Bereich zeigt Fluoreszenzminderung, oberhalb und unterhalb treten noch weitere fluoreszenzmindernde Zonen im DC des Ausgangsextrakts auf).

b) Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) und anschließend auf 1100 °C erhitzen. Die Liquiritinzone färbt sich gelb an (Bildung von Isoliquiritigenin u. dessen Oxoniumsalz), die sich nach längerem Erhitzen nach graugelb verfärbt. Die Vergleichssubstanz Arbutin, die auf dem DC etwas unterhalb der Liquiritinzone liegt, färbt sich blaugrau an.

V. Untersuchungslösung: bandförmige Auftragung (10 × 3 mm).

a) DC-Lösung a: 5 mm³ auftragen.b) DC-Lösung b: 0,1 cm³ werden mit Methanol zu 1 cm³ verdünnt, davon 5 mm³ auftragen.

c) DC-Lösung c: Verdünnung und Auftragemenge wie b).

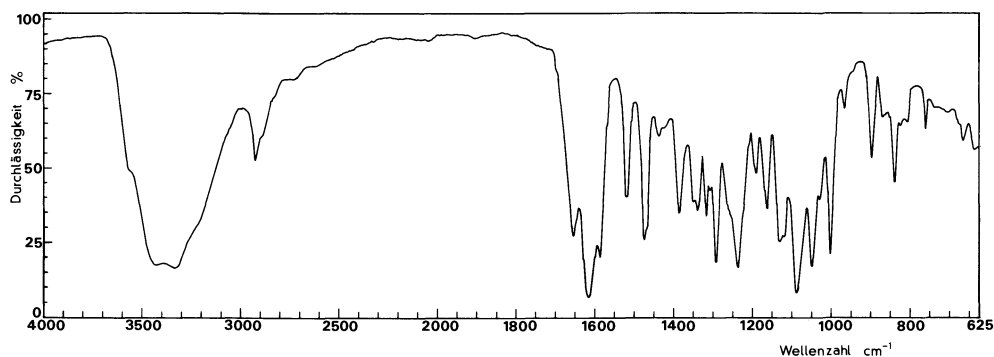
d) DC-Lösung d: Verdünnung und Auftragemenge wie b).

e) Roh-Liquiritin: 2 mg werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon 5 mm³ auftragen.

f) umkristallisiertes Liquiritin: Verdünnung und Auftragemenge wie e).

VI. Vergleichslösung: 2 mg Arbutin werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon werden 5 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) aufgetragen.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Liquiritins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Liquiritin (1,5 mg in 200 mg Kaliumbromid)

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3340–3440	alkoh. und phenol. OH	OH-Streckschwingung
2920	>CH ₂ , –CH	CH-Streckschwingung
1650	>C=O	CO-Streckschwingung
1615, 1590, 1520	Aromat	CC-Streckschwingung
1380	Ar–OH	OH-Beugeschwingung
1350	alipath. OH	OH-Beugeschwingung
1290, 1240, 1180	–C–O	CO-Streckschwingung

3. Das UV-Spektrum des isolierten Liquiritins ist aufzunehmen.

(2 mg Liquiritin werden in 100 cm³ Methanol gelöst)

$\lambda_{\max} = 315 \text{ nm}$ ($\epsilon = 6450$)

$\lambda_{\max} = 276 \text{ nm}$ ($\epsilon = 10400$)

4. Der Schmelzpunkt des isolierten Liquiritins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

a) Formulieren Sie die Bildung von Isoliquiritigenin aus Liquiritin nach Säurezusatz.

b) Geben Sie weitere Flavanonglykoside und die entsprechenden Pflanzen an?

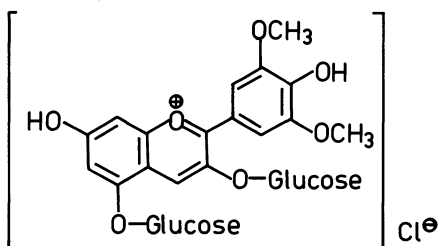
c) Welche Verfahren können zur Glykosidspaltung eingesetzt werden?

2.34 Isolierung von Malvinchlorid aus wilden Malvenblüten

Prinzip: Aus gepulverten Blüten der wilden Malve (*Malva sylvestris* L.) werden das Glucosid Malvin und andere in geringeren Mengen vorkommende Anthocyanglykoside in Form der Chloride mit methanolischer Salzsäure durch Perkolation extrahiert und aus dem eingengten Extrakt mit Ether gefällt.

Gehalt: bis zu 10 %.

Strukturformel



Malvinchlorid

C₂₉H₃₅O₁₇, MG 691; Smp: 165–170°C (Zersetzung)

Chemikalien

Malvae sylvestris flos, pulv. (710), 10 g

Methanol, 300 cm³

Ether, 250 cm³

Salzsäure, konz., 15 cm³

n-Butanol, 40 cm³

Eisessig, 10 cm³

DC-Schicht: Cellulose, mikrokristallin,
20 × 20 cm

Malvinchlorid, 1 mg (Vergleich)

Allgemeine Geräte

Rotationsverdampfer

Wärmeplatte

Schüttelmaschine

DC-Grundausrüstung

Geräte

2 Bechergläser, 250 cm³

1 Perkolationssäule, $l = 50 \text{ cm}$, $\varnothing_i = 3,5 \text{ cm}$

1 Glasstab, 6 × 250 mm

2 Erlenmeyerkolben, 500 cm³

Rundkolben, NS 29, 250 cm³ (1), 100 cm³ (3)

mit pass. Schliffstopfen

1 Büchnertrichter, $\varnothing 8 \text{ cm}$ mit pass. Guko zu

1 Saugflasche, 500 cm³

1 Glasfiltertrichter, D3, $\varnothing 5 \text{ cm}$ mit pass.

Guko zu Saugrohr, 25 cm³

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Durchführung

10 g Malvae sylvestris flos, pulv. (710) werden in einem 250 cm³-Becherglas mit so viel methanolischer Salzsäure (Methanol-konz. Salzsäure, 95 + 5 Volumteile) übergossen, daß das Blütenpulver gerade bedeckt ist. Man rührt gelegentlich um, nach 30 min schüttet man den Brei in ein Perkulationsrohr und perkoliert mit 150 cm³ methanolischer Salzsäure, bis das Perkolat nur noch schwach rot gefärbt ist. Das Perkolat wird portionsweise in einem 250 cm³-Rundkolben im Vakuum am Rotationsverdampfer bei Wasserbadtemperaturen von ca. 50° bis zu einem Volumen von ca. 40 cm³ eingengt (= DC-Lösung a). Nach dem Erkalten setzt man 120 cm³

Ether hinzu und läßt über Nacht stehen. Es scheidet sich ein harziger, schwarzroter Niederschlag ab, der über einen Büchnertrichter abgesaugt wird (Filtrat = DC-Lösung b). Der Niederschlag wird in 15 cm³ Methanol aufgenommen und 2 h geschüttelt (= DC-Lösung c). Die erhaltene Suspension wird mit 50 cm³ Ether versetzt und bei 4° über Nacht aufbewahrt. Danach wird der erneut ausgefallene Niederschlag über einen Büchnertrichter abgesaugt (Filtrat = DC-Lösung d). Der feste Rückstand wird abermals in 15 cm³ Methanol aufgenommen und 2 h geschüttelt (= DC-Lösung e). Danach setzt man 50 cm³ Ether hinzu und läßt erneut über Nacht bei 4° stehen. Der ausgefallene dunkelrote kristalline Niederschlag von Malvinchlorid wird über einen Glasfiltertrichter abgesaugt und 2 h bei 45° getrocknet.

Ausbeute: 0,8–1 g (das isolierte Produkt ist von geringen Mengen anderer Anthocyanglykoside begleitet).

Zeitbedarf: 3 Tage.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. *Standardmethode:* Ja.

II. *Schicht:* Cellulose, mikrokristallin.

III. *Fließmittel:* Oberphase von n-Butanol-Eisessig-Wasser (40 + 10 + 50), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis:*

a) Nach Abdampfen des Fließmittels auf der Wärmeplatte im Tageslicht auswerten und anschließend mit Ammoniakdämpfen behandeln.

b) Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) und anschließend 5 min auf 110° erhitzen.

V. *Untersuchungslösung:* Bandförmige Auftragung (10 × 3 mm):

DC-Lösung a: 5 mm³.

DC-Lösung b: 10 mm³.

DC-Lösung c: 0,1 cm³ werden mit 0,1 cm³ Methanol verdünnt, davon 5 mm³.

DC-Lösung d: 15 mm³.

DC-Lösung e: vgl. DC-Lösung c.

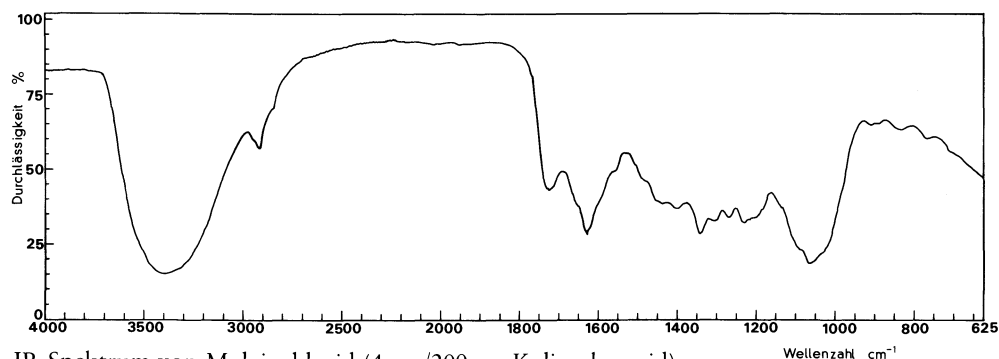
Isoliertes Malvinchlorid: 5 mg werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon 5 mm³.

Untersuchungslösungen von Malvae silvestris flos, Malvae arboreae sine calycibus und Hibisci flos:

Je 1 g gepulverte Droge wird mit 6 cm³ einer Mischung von 90 Volumteilen Methanol und 10 Volumteilen 25proz. (G/V) Salzsäure versetzt und 15 min geschüttelt. Von den Filtraten trägt man je 10 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) auf.

VI. *Vergleichslösung:* 5 mg Malvinchlorid werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 5 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) auf.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Malvinchlorids ist aufzunehmen und mit dem abgebildeten Spektrum und den entsprechenden Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Malvinchlorid (4 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3400	–OH	OH-Streckschwingung
2920	–CH ₃ , >CH_2 und $\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{H} \\ \end{array}$	CH-Streckschwingung
2850	–OCH ₃	CH-Streckschwingung
1635	Aromat	CC-Streckschwingung
1468–1455	–CH ₃ und >CH_2	CH-Beugeschwingung
1350–1200	–OH	OH-Beugeschwingung
1200	aliph-at-aromat. Ether	CO-Streckschwingung
1100	cycl. Ether	CO-Streckschwingung
1060	aliph-at-aromat. Ether	CO-Streckschwingung

3. Das *VIS-UV-Spektrum* des isolierten Malvinchlorids ist aufzunehmen.

Lösungsmittel: 44 Volumteile Methanol und 1 Volumteil verd. Salzsäure, 25proz. (G/V).

3 mg Malvinchlorid werden in 10 cm^3 gelöst, davon wird 1 cm^3 zu 10 cm^3 verdünnt.

$\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$ ($\epsilon = 14\,500$).

$\lambda_{\text{max}} = 274 \text{ nm}$ ($\epsilon = 7\,200$).

4. Der *Zersetzungspunkt* des isolierten Malvinchlorids ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

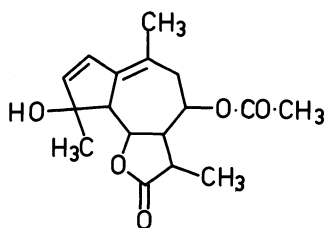
- Welche strukturellen Zusammenhänge bestehen zwischen Anthocyanidinen und Flavonen?
- Worauf beruhen die Indikatoreigenschaften der Anthocyane?
- Welche anderen pflanzlichen Farbstoffe gibt es? Geben Sie Beispiele zu den einzelnen Gruppen an. Nennen Sie entsprechende Drogen und die Verwendung der entsprechenden Farbstoffe.

2.35 Isolierung von Matricin aus Kamillenblüten

Prinzip: Kamillenblüten (*Chamomilla recutita* (L.) RAUSCHERT) werden kurz mit Chloroform extrahiert. Hierbei platzen die etherischen Öldrüsen mit dem darin enthaltenen Matricin. Der Extrakt wird dann in Petrolether eingerührt, um einen Teil der polaren Stoffe auszufällen. Aus der Petroletherlösung lässt sich das Matricin mit Kaliumhydrogencarbonatlösung ausschütteln. Hieraus kann es dann mit Ether extrahiert werden. Beim Einengen fällt es in kristalliner Form aus.

Gehalt: 0,06 % je nach Droge; beachte, es gibt «Chem. Rassen».

Strukturformel



Matricin

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$, MG 306,35; Smp: $158\text{--}160^\circ\text{C}$ (bei schnellem Erhitzen), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -122^\circ$

Chemikalien

Matricariae flos, tot. einer proazulenreichen Sorte, 500 g
 Chloroform (evtl. Dichlormethan), 6000 cm³
 Petrolether, 400 cm³
 Kaliumhydrogencarbonat, 2 g
 Diethylether, 200 cm³
 Natriumsulfat (wasserfrei), 100 g
 Dichlormethan, 100 cm³
 Ethanol, 2 cm³
 n-Hexan, 100 cm³
 DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm,
 u. Aluminiumoxid, neutral, 20 × 20 cm
 Matricin, 1 mg (Vergleich)

Allgemeine Geräte

Wasserbad
 TASOMAT oder TAS-Ofen, komplett
 Magnetrührer
 Rotationsverdampfer
 DC-Grundausrüstung
 Glasküvetten, Schichtdicke 1 cm

Geräte

Becherglas, 5000 cm³
 Erlenmeyerkolben, 2000 cm³
 Drogenpresse, großer Aufsatz
 Rundkolben, 1000 cm³
 Bechergläser, je 1 × 600, 400, 100 cm³
 Büchnertrichter mit pass.
 Guko zu Saugflasche, 500 cm³
 Scheidetrichter, 1000 cm³
 Trichter, Ø 5 cm
 2 Spitzkolben, 100 cm³
 Spitzkolben, 50, 25 cm³

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure
 (Reag. Nr. 3)
 EP-Reagenz*)

*) s. S. 127

Durchführung

250 g unzerkleinerte Kamillenblüten werden in einem 5000 cm³ Becherglas vollständig mit Chloroform (ca. 1500 cm³) bedeckt. Man läßt 3 min unter gelegentlichem Umrühren stehen. Dann preßt man vom Lösungsmittel, welches dabei über Glaswatte filtriert wird, bis zu einem Druck von 50 kg/cm² ($\approx 5 \cdot 10^6$ Pa) ab. Der Drogenrückstand wird noch ein zweites Mal auf diese Weise behandelt. Anschließend werden weitere 250 g Droge wie oben extrahiert. Die Chloroformextrakte werden jeweils am Rotationsverdampfer bei Zimmertemperatur in einem 1000 cm³-Rundkolben eingengt. Man erhält so ca. 100 g eines zähflüssigen, dunkelgrünen Extraktes. Diesen läßt man unter kräftigem Rühren in 400 cm³ Petrolether (40–60°) einfließen (= DC-Lösung a). Zur restlosen Überführung des Kolbeninhaltes wird zunächst mehrmals mit einem Teil des Petrolethers und schließlich 2mal mit je 10 cm³ Chloroform nachgespült. Der Extrakt muß dann vollständig in den Petrolether überführt sein. In diesem bildet sich eine braungrüne Ausfällung (ca. 3 g), welche abgesaugt und verworfen wird. Man gibt dann die Petroletherlösung in einen 1000 cm³-Scheidetrichter und schüttelt sie mit 100 cm³ 2proz. (G/V) Kaliumhydrogencarbonatlösung vorsichtig aus. Die in der wäßrigen Phase entstehende Emulsion entmischt sich nur langsam (Beschleunigung durch Zentrifugieren – 1 Std. bei 9000 Umdrehungen/min – möglich). Es bleibt jedoch auch nach vollständiger Entmischung immer eine dünne gallertige Schicht an der Phasengrenze erhalten. Diese wird getrennt abgelassen und verworfen. Die klare, hellgelbe wäßrige Phase wird dann 3mal mit je 50 cm³ peroxidfreiem Ether extrahiert. Die Etherfraktionen werden über 8 g wasserfreies Natriumsulfat in einen 100 cm³-Spitzkolben abgelassen und in diesem jeweils am Rotationsverdampfer bei Zimmertemperatur eingengt. Das Natriumsulfat wird dann 2mal mit je 10 cm³ Ether nachgewaschen. Die beschriebene Extraktion der Petroletherlösung wird insgesamt 10mal wiederholt (= DC-Lösung b), wobei die Kaliumhydrogencarbonatlösung jeweils wiederverwendet wird. Aus der wasserfreien Etherlösung (= DC-Lösung c) scheiden sich beim Einengen Matricinkristalle ab. Die Reinigung erfolgt, indem man vollständig einengt, wenig Ether (5–10 cm³) auf die Kristalle gibt und vorsichtig umschwenkt. Die überstehende Etherlösung wird dann mit einer fein ausgezogenen Tropfpipette in einen zweiten 100 cm³-Spitzkolben abgehoben. Dieses Waschen wiederholt man, bis die Kristalle (= DC-Lösung d) weiß sind und die überstehende Lösung farblos ist. Beim Einengen der Waschflüssigkeit bilden sich erneut Kristalle, welche wie vorher gereinigt werden. Man wiederholt diesen Vorgang, bis sich beim Einengen der Waschflüssigkeit keine Kristalle mehr bilden.

Bilden sich aus dem Etherextrakt beim Abdampfen des Ethers keine Kristalle, so läßt man über den an der Kolbenwand haftenden Extrakt vorsichtig wenig Ether laufen. Es kommt dann augenblicklich zur Kristallbildung.

Die erhaltenen Kristalle werden jeweils ausgekratzt und an der Luft getrocknet.

Ausbeute: 180–190 mg (je nach Matricingehalt der Droge verschieden).

Zeitbedarf: 2–3 Tage.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. *Standardmethode:* Ja.

II. *Schicht:* Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel:* Dichlormethan-Ethanol (98 + 2).

IV. Nachweis

a) UV₂₅₄: Matricin (hRf-Bereich 20–25) und En-in-dicycloether (hRf-Bereich 75–80) zeigen Fluoreszenzminderung.

b) UV₃₆₅: Herniarin zeigt blaue Eigenfluoreszenz.

c) Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure, Reag. Nr. 3, 110°C, 5 min. Matricin färbt sich bereits bei Zimmertemperatur blau-violett; En-in-dicycloether färbt sich gelbbraun und Herniarin zeigt keine Färbung.

V. Untersuchungslösung

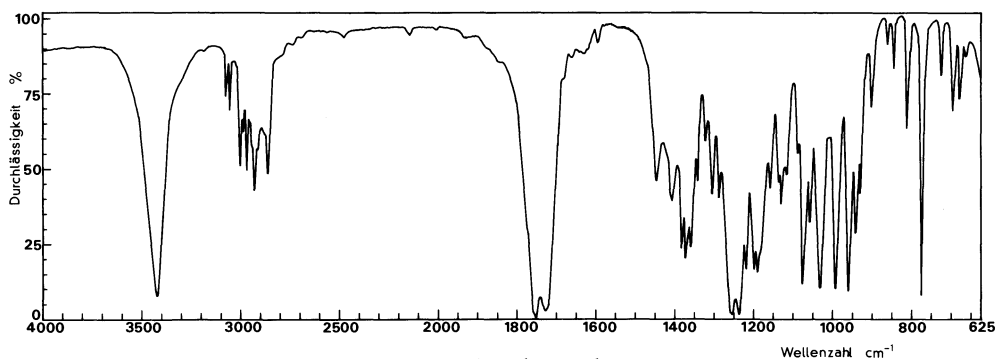
a) DC-Lösung a: 1 mm³ punktförmig.

b) DC-Lösung b: 1 mm³ der 10mal extrahierten Petroletherlösung punktförmig.

c) DC-Lösung c: 1 mm³ punktförmig, vor dem letzten Einengen.

d) DC d: 1 mg isoliertes Matricin in 1 cm³ Dichlormethan lösen, 5 mm³ punktförmig auftragen.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Matricins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Matricin (1 mg/100 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3420	–OH	OH-Streckschwingung
3070 und 3050	olefin. Doppelbindung	CH-Streckschwingung
3000–2860	–CH ₃ , >CH ₂ , –C–H	CH-Streckschwingung
1750	>C=O (Lacton)	C=O-Streckschwingung
1725	>C=O (gesätt. Ester)	C=O-Streckschwingung
1450, 1410	–CH ₃ und >CH ₂	asym. CH-Beugeschwingung
1385, 1375, 1360	–CH ₃	sym. CH-Beugeschwingung

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
1255 und 1240	Ester (Acetat)	CO-Streckschwingung und C–CO–O-Gerüstschwingung
1200 und 1190	Lacton	CO-Beugeschwingung
1075	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{OH} \\ \end{array}$	CO-Streckschwingung
780	vermutl. olef. Doppelbindung (cis u. konj.)	CH-Beugeschwingung

3. Der *Schmelzpunkt und der Zersetzungsbereich* des isolierten Matricins sind zu bestimmen (Schmelzpunkt-Mikroskop).

4. *Thermolyse des Matricins zu Chamazulen*

0,5 mg Matricin werden mittels eines TASOMATs auf eine neutrale Al_2O_3 -DC-Schicht thermolysiert. Man beginnt bei 50°C und unterbricht den Vorgang bei einer Temperatur von 250°C . Die Aufheizrate beträgt $8^\circ/\text{min}$, der Vorschub 2 ($= 0,56 \text{ cm/min}$). Als Trägergas wird Stickstoff eingesetzt ($15 \text{ cm}^3/\text{min}$). Ab einer Temperatur von 200°C erscheint das blaue Chamazulenband auf der DC-Schicht. Man entwickelt mit Hexan unter Standardbedingungen. Der hRf-Bereich der Chamazulenzone liegt bei 60–70. Als Nachweis dient die blaue Eigenfarbe, welche sich nach Besprühen mit EP-Reagenz*) ins Dunkelblaue vertieft, wenn die Zone angehaucht (Wasserdampf) wird.

Ist nur ein TAS-Ofen vorhanden, stellt man diesen auf 220°C und trägt punktförmig auf eine neutrale Al_2O_3 -DC-Schicht auf.

Weitere Aufgaben

- Formulieren Sie den Übergang vom Matricin zum Chamazulen.
- Nennen Sie die Unterschiede zwischen Proazulenen und azulenogenen Verbindungen.
- Welche Drogen liefern azulenhaltige etherische Öle?
- Nennen Sie einen Schnellnachweis für proazulenhaltiges Drogenmaterial.

2.36 Isolierung von Myristicin oder Apiol oder Allyltetramethoxybenzol aus Petersilienfrüchten

Prinzip: Aus Petersilienfrüchten (*Petroselinum hortense* HOFFM.), einer zuvor ausgewählten chemischen Rasse, wird auf dem Wege der Wasserdampfdestillation das eth. Öl gewonnen. Hieraus isoliert man säulenchromatographisch das Myristicin oder das (Petersilien)-Apiol oder das Allyltetramethoxybenzol.

Gehalt

Eth. Öl (Myristicin-Rasse): 2–5 % – darin 55–75 % Myristicin.

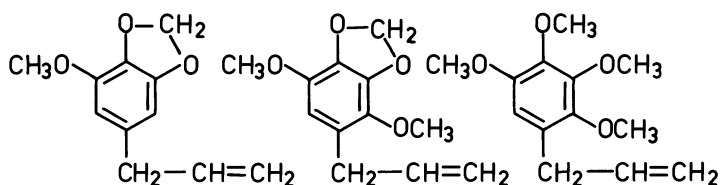
Eth. Öl (Apiol-Rasse): 2–5 % – darin 60–80 % Apiol.

Eth. Öl (Allyltetramethoxybenzol-Rasse): 2–5 % – darin 55 % Allyltetramethoxybenzol.

*) EP-Reagenz nach STAHL: Für Proazulene und Azulene.

0,25 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd werden in einer Mischung aus 45 cm^3 Eisessig, 5 cm^3 o-Phosphorsäure, 85proz. und 45 cm^3 Wasser gelöst. Azulene reagieren hiermit bereits in der Kälte mit starker Farbintensivierung (blau); Proazulene erst nach 3–5 min Erhitzen auf 100°C .

Strukturformeln



Myristicin

 $C_{11}H_{12}O_3$ flüssig

MG 192,2; Sdp: 150°C

(Petersilien)-Apiol

 $C_{12}H_{14}O_4$

MG 222,2; Smp: 30°C

Allyltetramethoxybenzol

 $C_{13}H_{18}O_4$

MG 238,3; Smp: 25°C

Chemikalien

Petroselin fructus, plv. (710), 75 g

Kieselgel zur SC, 0,063–0,2 mm, 100 g

Petrolether (40–60°C), 1500 cm³Dichlormethan, 2000 cm³Pentan, 10 cm³

Natriumsulfat, wasserfrei, 20 g

Eugenolmethylether, 5 mm³ (Vergleich)

Seesand, 10 g

DC-Schichten: Kieselgel F₂₅₄,

Geräte

Apparatur zur kontinuierlichen

Wasserdampfdestillation

1 Mikrokölbchen, 5 cm³1 Rundkolben, 1000 cm³

1 Trichter, Ø 3 cm

3 Spitzkolben, NS 14,5, 50 cm³,25 cm³, 100 cm³ mit Stopfen

1 Chromatographiesäule mit Kühlmantel,

l = 120 cm, Ø_i = 1,5 cm

Allgemeine Geräte

Wasserbad

Rotationsverdampfer

DC-Grundausrüstung

Heizpilz, 1000 cm³

TAS-Ofen mit Zubehör

Wärmeplatte bis 60°

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Durchführung

A. Schnelltest zur Auswahl der speziellen chemischen Rasse

Dünnschicht-Chromatographie

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Dichlormethan, KS, 10 cm.

IV. Nachweis

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren.

b) Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) und anschließend Erhitzen auf 110°C.

V. Untersuchungslösung

a) **Extraktionsverfahren:** 0,1 g frisch gepulverte Petersilienfrüchte werden in einem Reagenzglas mit 4 cm³ Dichlormethan auf dem Wasserbad bei ca. 40°C 5 min mazeriert. Danach wird über Glaswatte mit Natriumsulfatauflage filtriert; das Filtrat auf ca. 0,5 cm³ eingengt, davon trägt man 5 mm³ punktförmig auf.

b) **TAS-Verfahren:** Einwaage: 15 mg frisch gepulverte Petersilienfrüchte; Temperatur: 200°C, Verweilzeit: 90 s, 2 Kügelchen wasserdampfgesättigtes Molekularsieb 4 Å (= 0,4 nm).

VI. Vergleichslösung

5 mm³ Eugenolmethylether werden in 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man 2 mm³ auf.

(bzw. sofern zur Verfügung stehen: Je 5 mm³ Myristicin, Apiol oder Allyltetramethoxybenzol in 1,0 cm³ Dichlormethan, davon trägt man 2 mm³ auf.)

Zur Zuordnung der Triglyceride werden 2 mm³ einer Lösung von 5 mm³ Olivenöl in 1 cm³ Dichlormethan mit aufgetragen.

Auswertung des Chromatogramms

Die Myristicinzone färbt sich violett-braun an (hRf: 60–70), die Apiolzone violett-braun (hRf: 50–55); die Allyltetramethoxybenzolzone violett-blau (hRf: 20–30). Die Eugenol-methyletherzone, die als Vergleich mitaufgetragen wurde, färbt sich violett-grau (hRf: 35–45).

Nach der Größe der Zonen zueinander läßt sich entscheiden, welche chemische Rasse vorliegt.

B. Gewinnung des ätherischen Öles

75 g frisch zerkleinerte Petersilienfrüchte werden mit 600 cm³ Wasser in einem 1000 cm³-Rundkolben 4 Stunden einer kontinuierlichen Wasserdampfdestillation unterworfen. Als Vorlage dient 1 cm³ Pentan. Nach beendeter Destillation wird das eth. Öl-Pentan-Gemisch wasserfrei abgesehen und danach das Pentan auf der Wärmeplatte bei 50°C verdampft.

C. Säulenchromatographie

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 1,5$ cm mit Kühlmantel.

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 100 g.

Elutionsmittelfolge

Petrolether (40–60°) 300 cm³.

Petrolether (40–60°) – Dichlormethan (50 + 50), 500 cm³.

Dichlormethan, 1000 cm³.

Aufgabemenge: 1 cm³ ätherisches Öl.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Faktionen: ca. 10–15 cm³.

D. Dünnschicht-Chromatographie

DC-Bedingungen: wie unter A. (Schnelltest) beschrieben.

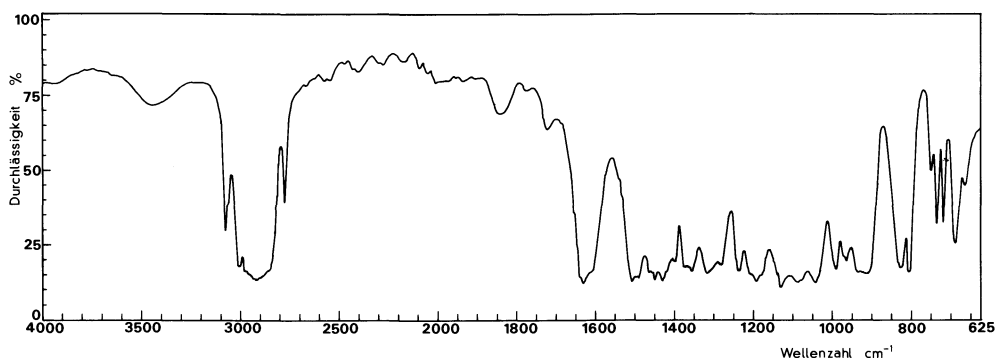
Untersuchungslösung: punktförmige Auftragung.

a) 10 mm³ eth. Öl werden in 2,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon 5 mm³.

b) Ab Fraktion 10 von jeder 3. Fraktion 5–10 mm³.

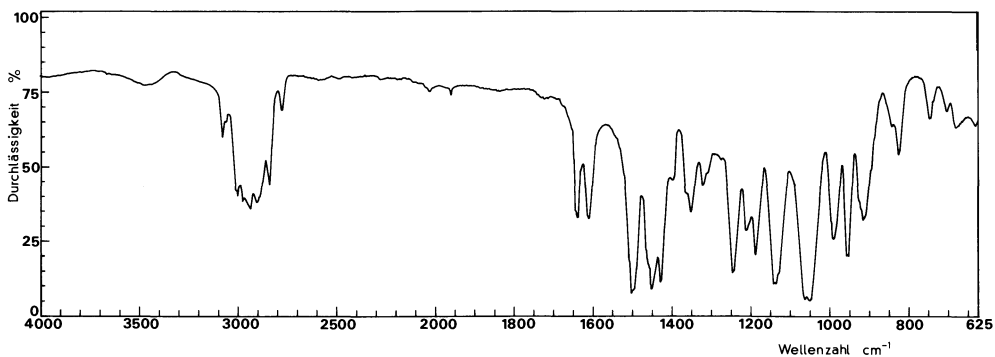
Auswertung

1. Das IR-Spektrum der isolierten Substanz ist aufzunehmen und mit den abgebildeten Spektren und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



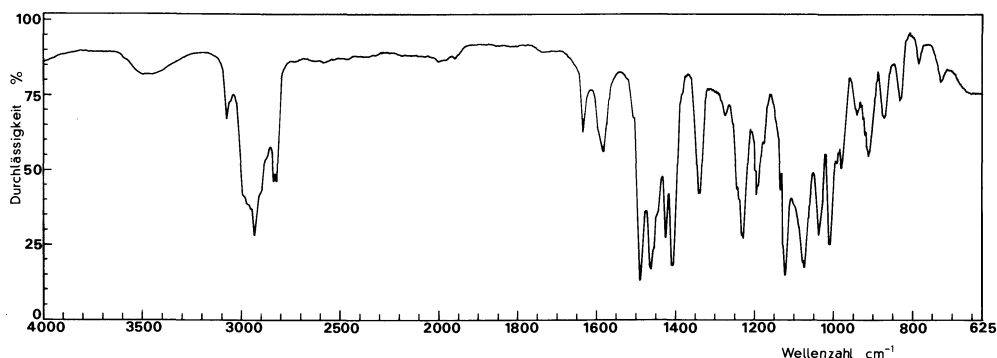
IR-Spektrum von Myristicin (als Film zwischen 2 Kaliumbromid-Presslingen).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3080	monosubst. Doppelbindung	CH-Streckschwingung
3005–2850	$-\text{CH}_3$, $>\text{CH}_2$ und $-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}-\text{H}$	CH-Streckschwingung
2777	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$	CH-Streckschwingung
1640–1600	monosubst. Doppelbindung und Aromat	$\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung
1505	Aromat	CC-Streckschwingung
1450–1430	Aromat und $\text{O}-\text{CH}_3$	CC-Streckschwingung und asym. CO-Streckschwingung
1240–1233 und 1042	Ether ($\text{R}-\text{O}-\text{CH}_3$)	CO-Streckschwingung
990 und 920–910	monosubst. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung



IR-Spektrum von Petersilienapiol (als Film zwischen zwei Kaliumbromid-Preßlingen).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3078	monosubst. Doppelbindung	CH-Streckschwingung
3000–2900	$-\text{CH}_3$, $>\text{CH}_2$ und $-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}-\text{H}$	CH-Streckschwingung
2840	$-\text{OCH}_3$	CH-Streckschwingung
2770	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$	CH-Streckschwingung
1638	monosubst. Doppelbindung	$\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung
1610 und 1500	Aromat	CC-Streckschwingung
1450 und 1428	Aromat u. $\text{O}-\text{CH}_3$	CC-Streckschwingung und asym. C–O-Streckschwingung
1245	Ether ($\text{R}-\text{O}-\text{CH}_3$)	CO-Streckschwingung
1065–1050	Ether ($\text{R}-\text{O}-\text{CH}_3$)	CO-Streckschwingung
990 und 915	monosubst. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung
825	pentasubst. Aromat (vermutl.)	CH-Beugeschwingung



IR-Spektrum von Allyltetramethoxybenzol (als Film zwischen zwei Kaliumbromid-Preßlingen).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3078	monosubst. Doppelbindung	CH-Streckschwingung
3000–2870	$-\text{CH}_3$, $>\text{CH}_2$ u. $-\overset{\textstyle }{\underset{\textstyle }{\text{C}}}-\text{H}$	CH-Streckschwingung
2838–2824	$-\text{OCH}_3$	CH-Streckschwingung
1638	monosubst. Doppelbindung	C=C-Streckschwingung
1590–1585	Aromat	CC-Streckschwingung
1500–1400	Aromat und $-\text{OCH}_3$	CC-Streckschwingung und asym. CH-Beugeschwingung
1230	Ether (R–O–CH ₃)	CO-Streckschwingung
Bereich 1130–1010	Ether (R–O–CH ₃)	CO-Streckschwingung
984 und 915	monosubst. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung
875 und/oder 834	pentasubst. Aromat	CH-Beugeschwingung

2. Das UV-Spektrum ist aufzunehmen (1 mg in 100 cm^3 Dichlormethan) von:

- Myristicin: $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1910$).
- (Petersilien)-Apiol: $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1150$).
- Allyltetramethoxybenzol: $\lambda_{\text{max}} = 282 \text{ nm}$ ($\epsilon = 2920$).

Weitere Aufgaben

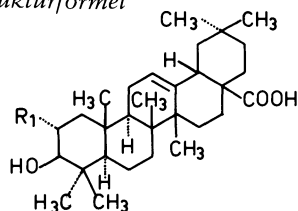
- Formulieren Sie den Biosyntheseweg von Phenylpropanderivaten.
- Welche Strukturisomeren von Phenylpropanderivaten kommen in Drogen vor?
- Was versteht man unter chemischen Rassen bei Arzneipflanzen? – Geben Sie weitere Beispiele an.
- Welches andere Apiol gibt es noch? Nennen Sie den Strukturunterschied.

2.37 und 2.38 Isolierung von Oleanolsäure und Crataegolsäure (= 2 α -Hydroxyoleanolsäure) aus Gewürznelken

Prinzip: Gewürznelkenpulver (*Syzygium aromaticum* (L.) MERRILL et L. M. PERRY) wird zunächst mit Petrolether entfettet und danach mit Ether extrahiert. Aus dem eingedampften Etherextrakt werden die Oleanolsäure und Crataegolsäure säulenchromatographisch abgetrennt. Der von der Entfettung her verbliebene Petroletherrückstand wird zur Isolierung von Eugenol (s. dort) verwendet.

Gehalt: 2% Oleanolsäure.

Strukturformel

 $R_1 = H$

Oleanolsäure

 $C_{30}H_{48}O_3$, MG 456,68

Smp: 307–312°C

 $R_1 = OH$

Crataegolsäure

 $C_{30}H_{48}O_4$, MG 472,68

Smp: 270°C

Chemikalien

Caryophylli flos, pulv. (300), 50 g

Petrolether (40–60°), 450 cm³Diethylether, 2000 cm³, vorher unbedingt auf Peroxidfreiheit prüfen (Testpapier)Methanol, 50 cm³

Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 180 g

Seesand, 20 g

DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm

Oleanolsäure, 5 mg (Vergleich)

Vanillin, 5 mg (Vergleich)

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 500 cm³

Rotationsverdampfer

Vakuumexsikkator

Fraktionssammler mit Zubehör

DC-Grundausrüstung

Geräte

Extraktionsapparatur nach Soxhlet,

100 cm³ mit Rundkolben, NS 29, 500 cm³Rundkolben, NS 29, 500 cm³ (1), 250 cm³ (2)2 Spitzkolben, NS 14,5, 50 cm³

1 Glasfiltertrichter, D3, ca. 4 cm Ø

mit Saugflasche, 250 cm³Bechergläser, 500 cm³ (1), 250 cm³ (2),100 cm³ (2), 50 cm³ (2)

2 Trichter, Ø 5 cm

1 Chromatographiesäule mit Kühlmantel,

 $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 2,5$ cm

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Durchführung

A. Gewinnung der Roholeanolsäure

50 g gepulverte Nelken (300) werden mit 400 cm³ Petrolether in einer Soxhletapparatur 6 h extrahiert. Der Petroletherextrakt (DC-Lösung a) wird in dem 500 cm³-Rundkolben für die Eugenolgewinnung (S. 90) aufbewahrt. Danach wird die vorextrahierte Droge mit 400 cm³ peroxidfreiem Diethylether in der gleichen Soxhletapparatur 6 h extrahiert (DC-Lösung b). Anschließend engt man den Etherextrakt am Rotationsverdampfer schonend auf ca. 30 cm³ ein. Die ausgefallene rohe Oleanolsäure wird über einen Glasfiltertrichter abgesaugt und portionsweise mit 50 cm³ Petrolether nachgewaschen. Die Ausbeute an Roholeanolsäure beträgt 1,5 bis 2 g. (2 mg Roholeanolsäure zur DC aufbewahren.)

B. Säulenchromatographie

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 2,5$ cm mit Kühlmantel.

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC, 0,063–0,2 mm, 180 g.

Elutionsmittel: Diethylether, 700 cm³.

Falls die Crataegolsäure noch isoliert werden soll, wird die Elution fortgesetzt mit 500 cm³ Diethylether-Methanol (50 + 50).

Aufgabemenge: Die isolierte Roholeanolsäure wird mit 10 cm³ Ether versetzt, kurz auf dem Wasserbad aufgekocht und die Suspension auf die Seesandschicht der stationären Phase

aufgegeben. Nach Eindringen in die Seesandschicht wird noch einmal mit einer 1 cm hohen Seesandschicht überschichtet und danach mit Ether eluiert.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Fraktionen: 10–15 cm³.

Die ausschließlich Oleanolsäure-haltigen Fraktionen werden am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

Ausbeute: 500 mg.

Falls die Oleanolsäure nach Abdampfen des Elutionsmittels als gelbliches Produkt anfällt, erfolgt eine Umkristallisation in Ethanol. Die Oleanolsäure wird in gerade so viel Ethanol (5 cm³/100 mg Oleanolsäure) gelöst, daß eine klare, siedende Lösung erhalten wird. Dazu gibt man ungefähr die Hälfte der Menge der eingesetzten Oleanolsäure an Aktivkohle hinzu und kocht auf. Die heiße Lösung wird filtriert, und schon beim Abkühlen auf Zimmertemperatur kristallisiert die Oleanolsäure als farbloses Produkt aus. Nach 3 h wird Oleanolsäure über einen Glasfiltertrichter abgesaugt und an der Luft getrocknet (Ausbeute 250 mg). Aus der Mutterlauge scheidet sich bei längerem Stehenlassen weiterhin Oleanolsäure aus. Die Mischfraktionen von Oleanolsäure und Crataegolsäure wird nicht weiter aufgearbeitet.

Die Fraktionen, die hauptsächlich Crataegolsäure enthalten und oleanolsäurefrei sind, werden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

Ausbeute: ca. 60 mg.

Das noch leicht gelbliche Produkt wird, wie oben beschrieben, umkristallisiert, jedoch aus einem Gemisch von Methanol-Ethanol (1 + 1). Nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur hat sich farblose Crataegolsäure abgeschieden, die wie die Oleanolsäure abfiltriert und getrocknet wird.

Ausbeute: 20 mg.

Zeitbedarf: 2–3 Tage.

C. Dünnschicht-Chromatographie

I. *Standardmethode*: Ja.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: Diethylether, KS.

IV. *Nachweis*

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (die Vergleichssubstanz Vanillin im mittleren R_f-Bereich mindert die Fluoreszenz).

b) Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3), 5–10 min, 110°C (Oleanolsäure liegt im mittleren R_f-Bereich und färbt sich rotviolett an, auf gleicher Höhe liegt die Vergleichssubstanz Vanillin, die sich bräunlich anfärbt. Die Crataegolsäure färbt sich ebenfalls rotviolett an und liegt im unteren Drittel des Chromatogramms.)

V. *Untersuchungslösung*: Punktförmige Auftragung:

a) 2 mg Roholeanolsäure werden in 1 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man 5 mm³ auf.

b) Ab Fraktion 10 von jeder 2. Fraktion 5 mm³.

VI. *Vergleichslösung*

2 mg Vanillin werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 5 mm³ punktförmig auf.

Auswertung

1. *Abschließende DC*: (Punktförmige Auftragung; DC-Bedingungen s. oben unter C).

Untersuchungslösung:

a) Drogenextrakt: 0,1 g gepulverte Nelken werden in 5 cm³ Ether 10 min unter Schütteln mazeriert. Vom Filtrat trägt man 10 mm³ punktförmig auf.

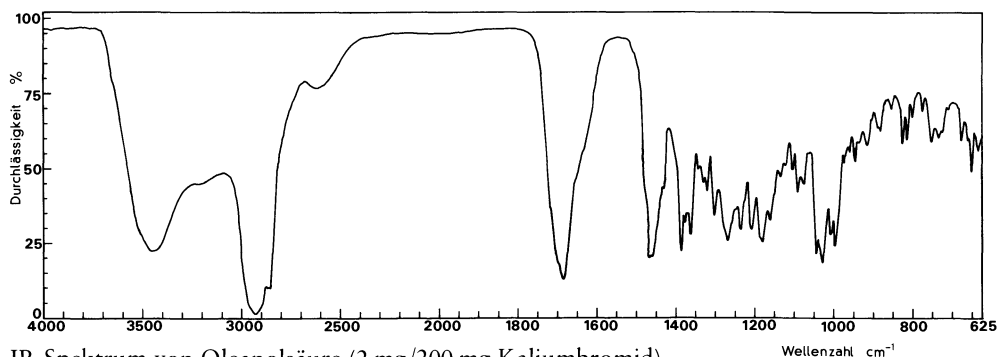
b) DC-Lösung a: 0,1 cm³ werden mit Dichlormethan ad 0,5 cm³ aufgefüllt, davon trägt man 10 mm³ punktförmig auf.

c) DC-Lösung b: 5 mm³.

d) Roholeanolsäure: 2 mg werden in 1 cm³ Dichlormethan gelöst. Davon trägt man 5 mm³ auf.

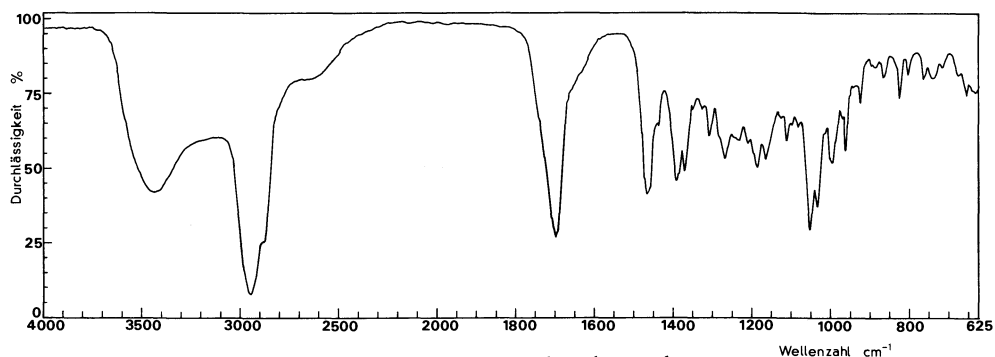
e) Isolierte Oleanolsäure und Crataegolsäure. Wie d).

2. Die IR-Spektren der isolierten Oleanolsäure und Crataegolsäure sind aufzunehmen, mit den abgebildeten Spektren und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Oleanolsäure (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3440	– OH	OH-Streckschwingung
2970–2850	– CH ₃ , >CH ₂ , $\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{H} \end{array}$	CH-Streckschwingung
1685	>C=O	C=O-Streckschwingung
1468–1455	– CH ₃ und >CH ₂	asym. CH-Beugeschwingung und CH-Beugeschwingung
1385 und 1362	gem. Dimethyl	sym. CH-Beugeschwingung
1043–996	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{OH} \text{ (sek.)} \end{array}$	CO-Streckschwingung
825 oder 814	trisub. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung



IR-Spektrum von Crataegolsäure (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

(Auswertung s. Oleanolsäure)

3. Die *Schmelzpunkte* der isolierten Oleanolsäure und Crataegolsäure sind zu bestimmen. – Falls nötig ist das isolierte Produkt aus Methanol umzukristallisieren und im Vakuum zu trocknen.

Weitere Aufgaben

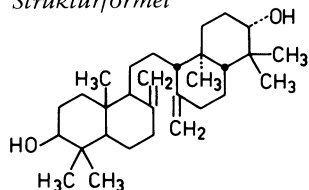
- In welche Stoffklasse sind die Oleanol- und die Crataegolsäure einzuordnen?
- Nennen Sie vier weitere weitverbreitete Verbindungen dieser Stoffklasse.
- Welche Eigenschaften können die am C-3 glykosidierten Verbindungen dieser Stoffklasse haben?

2.39 Isolierung von Onocol (α -Onocerin) aus Hauhechelwurzel

Prinzip: Aus gepulverter Hauhechelwurzel (*Ononis spinosa* L.) werden durch kontinuierliche Extraktion mit Dichlormethan Onocol und andere lipophile Inhaltsstoffe extrahiert. Aus dem eingengten Extrakt wird Onocol säulenchromatographisch abgetrennt und durch Umkristallisation rein erhalten.

Gehalt: 0,2 %.

Strukturformel



Onocol (α -Onocerin)

$C_{30}H_{50}O_2$, MG 442,7; Smp: 202–203°C, $[\alpha]_D^{20} = +18^\circ$ (in Chloroform)

Chemikalien

Ononidis radix, pulv. (300), 100 g
 Dichlormethan, 1200 cm³
 Essigsäureethylester, 500 cm³
 Petrolether (40–60°), 10 cm³
 Seesand, 50 g
 Kieselgel zur SC, 0,063–0,2 mm, 150 g
 Aktivkohle, 200 mg
 Natriumsulfat, wasserfrei, 20 g
 DC-Schichten: Kieselgel F₂₅₄
 Vanillin, 5 mg (Vergleich)

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Geräte

1 Extraktionsapparatur nach Soxhlet (250 cm³),
 mit Rundkolben, 1000 cm³
 Rundkolben, NS 29, 250 cm³ (1), 100 cm³ (1)
 Glasfiltertrichter, D3, Ø 5 cm
 mit pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm³
 Bechergläser, 50 cm³ (2), 100 cm³ (2)
 Trichter, Ø 5 cm (2), Ø 8 cm (2)
 1 Chromatographiesäule, $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 2$ cm

Allgemeine Geräte

Wasserbad
 DC-Grundausrüstung
 Rotationsverdampfer
 Fraktionssammler mit Zubehör

Durchführung

a) **Extrakt:** 100 g Ononidis radix, pulv. (300) werden in einer Soxhlet-Extraktionsapparatur mit 600 cm³ Dichlormethan 4 h extrahiert. Der dunkelbraune, trübe Extrakt wird zunächst über Seesand und danach über wasserfreies Natriumsulfat filtriert (= DC-Lösung a). In einem 250 cm³-Rundkolben wird der Extrakt portionsweise im Vakuum am Rotationsverdampfer eingengt bis zu einem Volumen von ca. 10 cm³.

b) **Säulen-Chromatographie**

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 2$ cm.

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC, 150 g.

Elutionsmittel: Dichlormethan-Essigsäureethylester (50 + 50), 800 cm³.

Aufgabemenge: Der eingengte Extrakt (a).

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Fractionen: 10–15 cm³.

Die hauptsächlich Onocol enthaltenden Fractionen werden vereinigt und im Vakuum am Rotationsverdampfer eingengt bis zu einem Volumen von ca. 10 cm³. Nach Stehenlassen bei 4° über Nacht haben sich aus der gelblichen Lösung farblose Kristalle von Onocol ausgeschieden, die über einen Glasfiltertrichter abgesaugt und mit ca. 1 cm³ Petrolether (40–60°) gewaschen werden. Die gelbe Mutterlauge wird mit einer Spatelspitze Aktivkohle versetzt, kurz aufgekocht, filtriert und zur Hälfte auf dem Wasserbad eingengt. Die eingengte

Mutterlauge wird über Nacht zur weiteren Auskristallisation von Onocol bei 4° aufbewahrt.

Ausbeute: 1. Kristalliat: 200–300 mg; 2. Kristalliat: 30 mg.

Zeitdauer: 2 Tage.

c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode:* Ja; Abweichung: Laufstrecke 15 cm.

II. *Schicht:* Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel:* Dichlormethan-Essigsäureethylester (70 + 30), KS, 15 cm.

IV. *Nachweis*

1. UV₂₅₄: Die Vergleichssubstanz Vanillin zeigt Fluoreszenzminderung.

2. Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) und anschließend 5–10 min auf 110° erhitzen. (Onocol im unteren Drittel des Chromatogramms färbt sich rosarot an. Die etwas oberhalb liegende Vergleichssubstanz Vanillin färbt sich bräunlich an.)

V. *Untersuchungslösung*

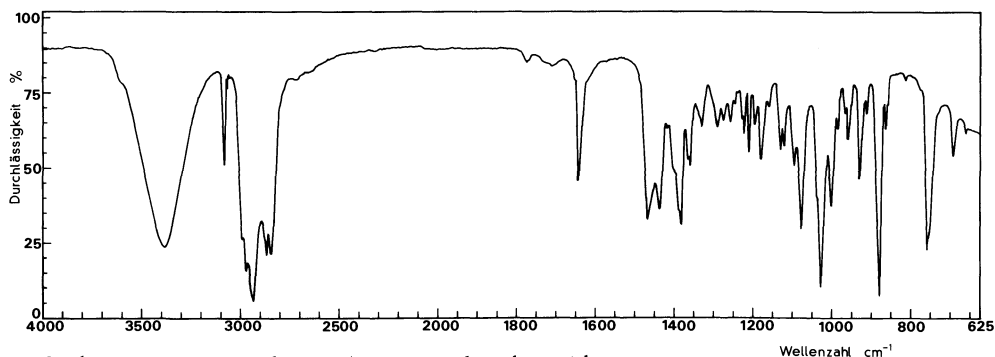
Jede 2. Fraktion ab Fraktion 15: 5–10 mm³ punktförmig.

DC-Lösung a: 10 mm³ punktförmig.

VI. *Vergleichslösung:* 5 mg Vanillin werden in 1,0 cm³ Essigsäureethylester gelöst, davon trägt man 2–3 mm³ punktförmig auf.

Auswertung

1. Das *IR-Spektrum* des isolierten Onocols ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Onocol (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3380	–OH	OH-Streckschwingung
3080	exocycl. Doppelbind.	CH-Streckschwingung
2990–2850	–CH ₃ , >CH ₂ , –C–H	CH-Streckschwingung
1780	exocycl. Doppelbind.	Oberschwingung des Signals bei 885
1645	exocycl. Doppelbind.	C=C-Streckschwingung
1470, 1440	–CH ₃ , >CH ₂	CH-Beugeschwingung
1390–1385	geminale Dimethyl	sym. CH-Beugeschwingung
1370–1365, 1030	sek. –C–OH	CO-Streckschwingung
885	exocycl. Doppelbind.	CH-Beugeschwingung

2. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Onocols ist zu bestimmen. – Beachte, α-Onocerin lagert sich leicht zu β-Onocerin (Smp. 235–238°) um. –

Weitere Aufgaben

- a) Zu welcher Gruppe von Naturstoffen gehört Onocol? Wodurch unterscheidet sich die Struktur des Onocols von der charakteristischen Grundstruktur dieser Stoffklasse?
- b) Welche weiteren Inhaltsstoffe sind in *Ononidis radix* beschrieben?

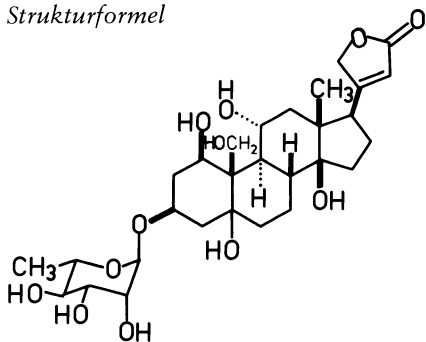
2.40 Isolierung von Ouabain (g-Strophanthin) aus *Strophanthus gratus*-Samen

Vorsicht: Ouabain ist giftig!

Prinzip: Die gepulverten g-Strophanthus Samen (*Strophanthus gratus* (WALL et HOOK) FRANCH.) werden mit Dichlormethan entfettet und danach mit Ethanol extrahiert. Aus der eingedampften Extraktlösung werden die Harze und Eiweißstoffe mit Bleiacetat ausgefällt. Bei weiterem Eindampfen des Filtrats scheidet sich das Ouabain aus.

Gehalt: 4–8 %.

Strukturformel



Ouabain (g-Strophanthin)

$C_{29}H_{44}O_{12} \cdot 8 H_2O$, MG 728,8, $C_{29}H_{44}O_{12}$, MG 584,7;

Smp: 190–200°C (Zersetzungstemperatur), $[\alpha]_D^{20} = -30^\circ - 33^\circ$ ($c = 1$, in Wasser)

Chemikalien

g-Strophanthi semen pulv. (710), 25 g
 Dichlormethan, 400 cm³
 Ethanol, 90proz. (V/V), 400 cm³
 Blei(II)-acetat, 2 g
 n-Butanol, 40 cm³
 Essigsäure, 10 cm³
 Ammoniumsulfat, 1 g
 DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
 Ouabain, 5 mg (Vergleich)

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 500 cm³
 Wasserbad
 Rotationsverdampfer
 Thermometer 0–100°C
 DC-Grundausrüstung

Geräte

Extraktionsapparat nach Soxhlet,
 150 cm³ mit 500 cm³-Rundkolben,
 NS 29 und pass. Rückflußkühler
 1 Rückflußkühler, NS 29
 Rundkolben NS 29, 100 cm³ (1),
 250 cm³ (1), 500 cm³ (1)
 2 Bechergläser, 100 cm³
 Büchner-Trichter, Ø 8 cm mit
 pass. Guko zu Saugflasche, 500 cm³
 2 Trichter, Ø 5 cm
 Glasfiltertrichter, D3, Ø 4 cm mit
 pass. Guko zu Saugrohr, 20 cm³

Durchführung

25 g *Strophanthi grati* semen, pulv. gross. (710) werden in einer Soxhlet-Apparatur mit 400 cm³ Dichlormethan 6 h extrahiert. Der Extrakt (= DC-Lösung a) wird verworfen. Den Drogenrückstand trocknet man an der Luft (Abzug!), bis der Geruch nach Dichlormethan verschwunden ist. Der Drogenrückstand wird danach in einem Rundkolben, 500 cm³, mit 300 cm³ Ethanol, 90proz. (V/V), 30 min unter Rückfluß gekocht und heiß abgesaugt. Mit 100 cm³ Ethanol spült man den Kolben aus und wäscht den Drogenrückstand mit der Spülflüssigkeit nach. Das gelbe Filtrat (= DC-Lösung b) wird portionsweise in einem zuvor gewogenen Rundkolben, 250 cm³, am Rotationsverdampfer vorsichtig eingengt (Schäumen!) bis zu einem Gewicht von ca. 5 g. Man füllt den Rückstand mit Wasser auf 10 g auf, erhitzt auf ca. 70 °C und gibt zunächst 5 Tropfen gesättigte Blei(II)-acetatlösung hinzu. Der ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt. Vom Filtrat entnimmt man einige Tropfen und prüft durch Zusatz von einem Tropfen gesättigter Ammoniumsulfatlösung auf das Vorhandensein freier Bleiionen. Sind diese nicht vorhanden, so fügt man dem Filtrat noch 1–2 Tropfen Bleiacetatlösung zu und prüft nach Filtration in der beschriebenen Weise, bis keine Fällung mehr auftritt. – Einen Überschuss an Bleiionen entfernt man aus der Glykosidlösung durch vorsichtige tropfenweise Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung. Die klar filtrierte Lösung (= DC-Lösung c) wird am Rotationsverdampfer so weit eingengt, bis eine Trübung auftritt. Beim Stehenlassen dieser Lösung bei 4 °C scheiden sich Kristalle von g-Strophanthin aus, die über einen Glasfiltertrichter abgesaugt werden. Aus der Mutterlauge (= DC-Lösung d) kann nach weiterem Einengen noch weiteres g-Strophanthin gewonnen werden.

Ausbeute: 0,3–0,6 g.

Zeitbedarf: 2 Tage.

Auswertung**1. Dünnschicht-Chromatographie**

I. *Standardmethode:* Ja.

II. *Schicht:* Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel:* Oberphase von n-Butanol-Eisessig-Wasser (40 + 10 + 50), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis:* Nach Abdampfen des Fließmittels bei 110 °C

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren. (Die im hRf-Bereich 35–40 liegende Zone von Ouabain zeigt eine schwache Fluoreszenzminderung.)

b) Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) 110 °C, 5 min. (Die Ouabainzone färbt sich gelbgrün an, die beim anschließenden Betrachten im UV₃₆₅ eine gelbe Fluoreszenz zeigt.)

V. *Untersuchungslösung:* Bandförmige Auftragung (20 × 3 mm) von

a) DC-Lösung a: 10 mm³.

b) DC-Lösung b: 10 mm³.

c) DC-Lösung c: 10 mm³ Lösung werden in 0,1 cm³ Ethanol gelöst, davon 10 mm³ aufgetragen.

d) DC-Lösung d (Mutterlauge): 5 mm³ werden in 0,1 cm³ Ethanol gelöst, davon 10 mm³ aufgetragen.

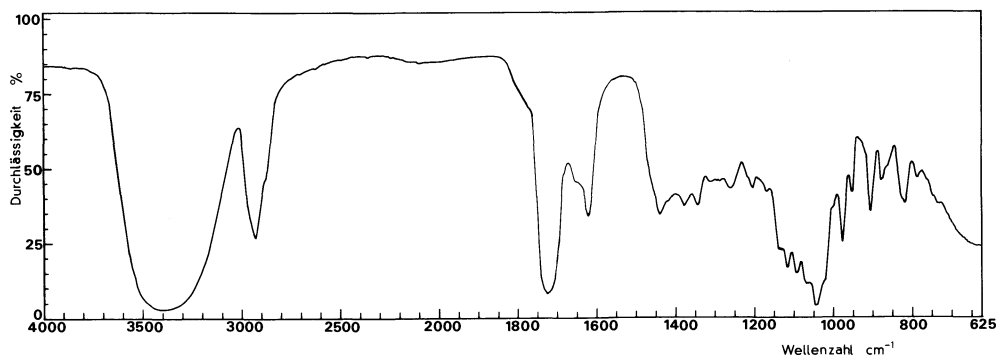
e) isoliertes g-Strophanthin: 5 mg werden in 2 cm³ Ethanol gelöst, davon 10 mm³ aufgetragen.

VI. *Vergleichslösung:* 5 mg Ouabain werden in 2 cm³ Ethanol gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (20 × 3 mm) auf.

Anmerkung: Gleiche Resultate bei kürzerer Laufzeit:

i-Propanol-Butylacetat-Wasser (50 + 30 + 20), KS, 10 cm.

2. Das IR-Spektrum des isolierten g-Strophanthins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Ouabain (g-Strophanthin) (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3400	–OH	OH-Streckschwingung
2940	–CH ₃ , >CH ₂ –C–H	CH-Streckschwingung
1725	>C=O (Lacton)	CO-Streckschwingung
1625	endocycl. trisubst. Doppelb.	CC-Streckschwingung
1450–1440	–CH ₃ , >CH ₂	CH-Beugeschwingung
1350	–OH	assoz. OH-Beugeschwingung
1120	aliph. Ether	asym. CO-Streckschwingung
1075	aliph. cycl. Ether	asym. CO-Streckschwingung
1040–1030	–OH	assoz. OH-Beugeschwingung
915 und 880	aliph. Ether und aliph. cycl. Ether	sym. CO-Streckschwingung
830–820	trisubst. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung

3. Die Zersetzungstemperatur des isolierten Ouabains ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

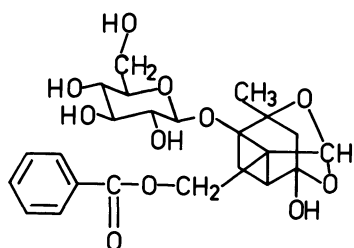
- Wie kann man g- und k-Strophanthin chemisch unterscheiden?
- Welche Gruppen von Herzglykosiden unterscheidet man?
- In welchen anderen Herzglykosiden ist Rhamnose ebenfalls die Zuckerkomponente?

2.41 Isolierung von Paconiflorin aus Pfingstrosenwurzel

Prinzip: Gepulverte Pfingstrosenwurzeln (*Paeonia officinalis* L.) werden mit Aceton extrahiert. Aus dem eingeeengten Extrakt wird Paconiflorin mittels Säulenchromatographie isoliert.

Gehalt: 1–2%.

Strukturformel



Paconiflorin

C₂₃H₂₈O₁₁, MG 380,5; Smp: 135°C, [α]_D²⁰ = –12,8° (in Methanol)

Chemikalien

Paeoniae radix pulv. (300), 100 g
 Aceton, 400 cm³
 Dichlormethan, 1000 cm³
 Methanol, 250 cm³
 Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm) 200 g
 Seesand, 20 g
 DC-Schichten: Kieselgel F₂₅₄
 Fuchsin (Vergleichssubstanz), 5 mg

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Geräte

1 Extraktionsapparat nach Soxhlet,
 250 cm³, mit pass. Rückflußkühler
 Rundkolben, NS 29: 500 cm³ (1),
 250 cm³ (1), 100 cm³ (1)
 1 Chromatographiesäule, $l = 100$ cm,
 $\varnothing_i = 2,5$ cm

Allgemeine Geräte

Wasserbad
 Fraktionssammler mit Zubehör
 DC-Grundausrüstung
 Rotationsverdampfer

Durchführung

a) *Extrakt*: 100 g Paeoniae radix pulv. (300) werden in einer Soxhlet-Extraktionsapparat (250 cm³) mit 400 cm³ Aceton 6 h extrahiert. Der Aceton-Extrakt (= DC-Lösung a) wird am Rotationsverdampfer weitgehend eingengt. Der sirupartige Rückstand wird säulenchromatographisch aufgetrennt.

b) *Säulenchromatographie*

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 100$ cm, $\varnothing_i = 2,5$ cm.

Stationäre Phase Kieselgel zur SC 0,063–0,2 mm, 200 g.

Elutionsmittelfolge: Dichlormethan-Methanol (90 + 10), 500 cm³.

Dichlormethan-Methanol (80 + 20), 800 cm³.

Aufgabemenge: eingengter, sirupartiger Extrakt.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Fraktionen: 10–15 cm³.

Die ausschließliche Paeoniflorin enthaltenden Fraktionen werden am Rotationsverdampfer bei Wasserbadtemperaturen von 60–70°C bis zur Trockene eingengt. Das zunächst sirupartige Produkt bläht sich auf unter Bildung eines Feststoffes und nach vollständiger Trocknung am Rotationsverdampfer läßt sich das reine, farblose Paeoniflorin leicht mit einem Spatel von der Kolbenwand abkratzen.

Ausbeute: 1–1,5 g.

c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode*: Ja.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: Dichlormethan-Methanol (70 + 30), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis*:

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Paeoniflorin ist im hRf-Bereich 35–45 als fluoreszenzmindernde Zone zu erkennen).

b) Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) 5–10 min auf 110°C (Paeoniflorin färbt sich violett).

V. *Untersuchungslösung*: Punktförmige Auftragung.

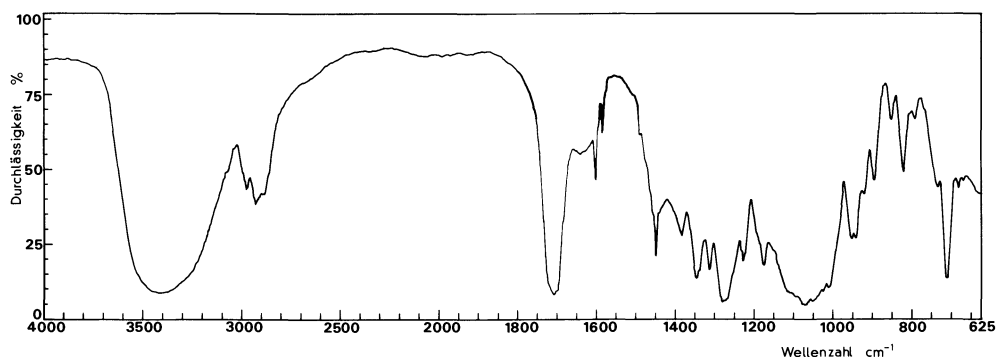
a) DC-Lösung a: 10 mm³.

b) Jede 3. Fraktion 5–10 mm³.

VI. *Vergleichslösung*: 5 mg Fuchsin werden in 5 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 2 mm³ punktförmig auf (hRf-Bereich 50–60).

Auswertung

1. Das *IR-Spektrum* des isolierten Paeoniflorins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Paeoniflorin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3400	–OH-Gruppen	OH-Streckschwingung
2975–2880	–CH ₃ , >CH_2 und $\text{–}\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}\text{–H}$	CH-Streckschwingung
1710	>C=O	C=O-Streckschwingung
1600 und 1585	Aromat	CC-Streckschwingung
1450	–CH ₃ und >CH_2	asym. CH-Beugeschwingung
1385	–CH ₃	sym. CH-Beugeschwingung
1345 und 1315	–OH	freie und assoz. OH-Beugeschwingung
1275	Ester	CO-Streckschwingung und –C–CO–O-Gerüstschwingung
1178	tert. –OH	CO-Streckschwingung
1120–1010	–OH und Ethergruppen	freie OH-Beugeschwingung und asym. CO-Streckschwingung
712	monosubst. Aromat	CH-Beugeschwingung

2. Das *UV-Spektrum* des isolierten Paeoniflorins ist aufzunehmen (10 mg Paeoniflorin/100 cm^3 Ethanol).

$$\lambda_{\text{max}} = 230 \text{ nm } (\epsilon = 13000).$$

$$\lambda_{\text{max}} = 274 \text{ nm } (\epsilon = 1490).$$

3. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Paeoniflorins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

- Wie kann man in einem Glykosid die Zuckerkomponente ermitteln?
- Welche wichtigen Glykosidtypen kann man den Aglyka nach unterscheiden?
- Geben Sie weitere Beispiele für Terpenglykoside an.

2.42 Isolierung von Pepsin aus Schweinemagen

Prinzip: Die pepsinhaltige, rötliche Fundusschleimhaut des Schweinemagens wird mit Wasser extrahiert. Nach Einengung des wäßrigen Auszugs fällt man das Pepsin durch Zusatz von Kochsalz. Die Fällung wird in Wasser aufgenommen, und zur Entfernung des Kochsalzes wird dialysiert. Nach dem Einengen verbleibt das Rohpepsin.

Zur Feststellung der Enzymaktivität wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und ermittelt, welche Konzentration eine bestimmte Menge Hühnereiweiß in einer vorgegebenen Zeit verdaut.

Gehalt: 0,001 %.

Chemikalien

2 Mägen von frisch geschlachteten
Schweinen
Ethanol, 96proz. (V/V), 100 cm³
Natriumchlorid, 50 g
Salzsäure konz., 10 cm³
1 frisches Hühnerei

Allgemeine Geräte

Kunststoffwanne, 5 l
Fleischwolf (Mixer)
Prüfsieb, 0,8 mm Maschenweite
Magnetrührer mit Stäbchen, 30 mm
Zentrifuge mit Zentrifugengläser, 20 cm³
Schüttelmaschine
Wasserbad

Geräte

Bechergläser, 100 cm³ (1), 400 cm³ (1), 1000 cm³ (3)
2 Trichter, Ø 10 cm
Rundkolben, NS 29, 1000 cm³ (1), 100 cm³ (1),
mit Schliffstopfen
Erlenmeyerkolben, 50 cm³ (5), 100 cm³ (2)
Meßpipetten, 0,1 cm³ (1), 1 cm³ (1)
Verbandmull, 65 × 200 cm
Dialysierschlauch Visking 27/32, 60 cm lang,
Ø ca. 21 mm, 34 mm flach
(Lieferant: Fa. Serva, Heidelberg)

Durchführung

Von dem umgestülpten, entleerten und kurz mit wenig Wasser gewaschenen Schweinemagen (je etwa 1 kg schwer) wird die rötliche Fundusschleimhaut von dem darunter liegenden Fleisch abgeschnitten oder abgerissen (ca. 200 g) und in einem Fleischwolf fein zermahlen. Dann werden 600 cm³ Wasser, dem 30 cm³ Ethanol zugesetzt wurde, hinzugefügt und unter schwachem Rühren 45 min mazeriert. Anschließend wird durch eine zweifache Lage Mull filtriert. Die zurückbleibenden Schleimhautreste werden mit 200 cm³ Wasser, das wiederum 5 % Ethanol enthält, suspendiert und 15 min mazeriert. Danach wird wie oben filtriert. Die vereinigten Filtrate werden, falls notwendig, nochmals durch eine vierfache Lage Mull filtriert. Das gereinigte Filtrat engt man bei 40° am Rotationsverdampfer zur Trockne ein. Der Rückstand wird mit 30 cm³ Wasser versetzt und unter Schütteln mit einer entsprechenden Schüttelmaschine unter mehrmaligem Drehen des Kolbens zum Teil gelöst. Evtl. verbleibende Rückstände werden nach Abkratzen von der Wand in weiteren 30 cm³ Wasser suspendiert. Die vereinigten trüben Lösungen werden ca. 5 min zentrifugiert und die überstehende Lösung nach Abgießen mit Kochsalz unter Rühren gesättigt. Das ausgefallene Pepsin wird abzentrifugiert und in 40 cm³ Wasser gelöst. Falls sich der Niederschlag nicht vollständig löst, wird nochmals zentrifugiert. Die klare Lösung wird dann in einen Visking-Dialysierschlauch gegeben und über Nacht gegen fließendes Wasser dialysiert und so das überschüssige Kochsalz entfernt. Die Lösung des so gereinigten Pepsins dampft man am Rotationsverdampfer bei max. 40° zur Trockne ein.

Ausbeute: Ca. 20 mg.

Zeitdauer: 2 Tage.

Aktivitätsbestimmung

Ein frisches Hühnerei wird 10 min gekocht, abgekühlt, geschält und der Eidotter entfernt. Das verbleibende Eiweiß drückt man durch ein Sieb der Maschenweite 0,8 mm. Für die Tests wird jeweils 1 g Eiweiß verwendet. Das gewonnene Pepsin (ca. 20 mg) wird in 100facher Menge Wasser (2 cm³) gelöst.

Ansatz: In fünf 50 cm³-Erlenmeyerkolben wird jeweils 1 g zerkleinertes Eiweiß gegeben und 10 cm³ verdünnte Salzsäure (0,5 cm³ konz. Salzsäure auf 100 cm³ Wasser) zugefügt. Dann versetzt man die Kolben mit steigenden Mengen der Pepsinlösung, und zwar den Kolben 1 mit 0,02 cm³, Kolben 2 mit 0,05 cm³, Kolben 3 mit 0,1 cm³, Kolben 4 mit 0,3 cm³ und Kolben 5 mit 0,5 cm³. Die Kolben werden dann im Trockenschrank oder in einem thermostatisierten Wasserbad bei einer Temperatur von 45° belassen. Die Ansätze schüttelt man alle 15 min um. Nach 3 h wird das Ergebnis protokolliert.

Man stellt fest, bei welcher Konzentration sich das Eiweiß bis auf wenige weißgelbe Häutchen gelöst hat. Die Aktivität des Pepsins wird angegeben durch das Verhältnis der Pepsinmenge zum

verdauten Eiweiß. Bei einem Pepsin «1 : 100» verdauen 10 mg 1 g Hühnereiweiß. Bei einem Präparat «1 : 1000» wird 1 g Hühnereiweiß von 1 mg Pepsin verdaut.

Auswertung

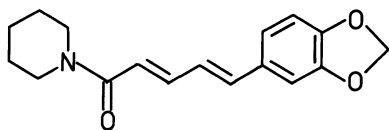
- Wie ist ein Ferment oder Enzym zusammengesetzt?
- Welche speziellen Eigenschaften haben Fermente?
- Nennen Sie wichtige Fermentarten und ihre Eigenschaften.
- Nennen Sie handelsübliche Fermentpräparate, ihre Herkunft und ihre Verwendung.

2.43 Isolierung von Piperin aus schwarzem Pfeffer

Prinzip: Gepulverter schwarzer Pfeffer (*Piper nigrum* L.) wird mit Dichlormethan extrahiert. Zur Entfernung der mitextrahierten fetten Öle wird der eingeeengte Extrakt mit ethanolischer Kalilauge versetzt. Aus dem Filtrat kristallisiert Piperin aus.

Gehalt: 5–9 %.

Strukturformel



Piperin

$C_{17}H_{19}O_3N$, MG 285,35; Smp: 128–130 °C

Chemikalien

Piperis nigri fructus pulv. (300), 20 g
 Dichlormethan, 400 cm³
 Essigsäureethylester, 50 cm³
 Petrolether (40–60 °), 100 cm³
 Kaliumhydroxid, 10proz. (G/V) in
 50proz. Ethanol (V/V), 15 cm³
 Natriumsulfat, wasserfrei 2 g
 DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
 Piperin, 10 mg (Vergleich)

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Geräte

1 Extraktionsapparatur nach Soxhlet,
 70 cm³ mit pass. Rückflußkühler
 1 Rundkolben, NS 29, 250 cm³
 3 Bechergläser, 50 cm³
 Trichter, 5 cm Ø (1), 3 cm Ø (1)
 1 Glasfiltertrichter, D 3, Ø 4 cm mit
 pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm³

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 250 cm³
 DC-Grundausrüstung
 Wasserbad
 Rotationsverdampfer

Durchführung

20 g gepulverter schwarzer Pfeffer (300) werden in einer Soxhlet-Extraktionsapparatur mit 200 cm³ Dichlormethan 6 Stunden lang extrahiert. Der Extrakt (= DC-Lösung a) wird am Rotationsverdampfer vollständig eingeeengt und mit 15 cm³ einer 10proz. ethanolisch-wässrigen (1 + 1) Kaliumhydroxidlösung versetzt. Die Mischung wird filtriert. Aus dem Filtrat scheiden sich beim Stehenlassen bei 0–4 °C gelbe Kristalle von Piperin aus, die über einen Glasfiltertrichter abgesaugt werden und mit wenig (1–2 cm³) Wasser gewaschen werden.

Gegebenenfalls muß das Piperin umkristallisiert werden. Dazu wird das Rohprodukt in möglichst wenig Dichlormethan unter Erhitzen auf dem Wasserbad aufgelöst. Nach der vollständigen Auflösung wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Dem Filtrat setzt man gerade so viel Petrolether (40–60 °C) hinzu, bis eine leichte Trübung eingetreten ist und kocht im Wasserbad kurz auf, bis die Lösung wieder klar ist. Beim Abkühlen und Stehenlassen im Kühlschrank fällt Piperin kristallin aus, das wieder über einen Glasfiltertrichter abgesaugt wird.

Ausbeute: 0,5 g.

Zeitbedarf: 1 Tag.

Auswertung**1. Dünnschicht-Chromatographie**

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Dichlormethan-Essigsäureethylester (75 + 25), KS.

IV. Nachweis

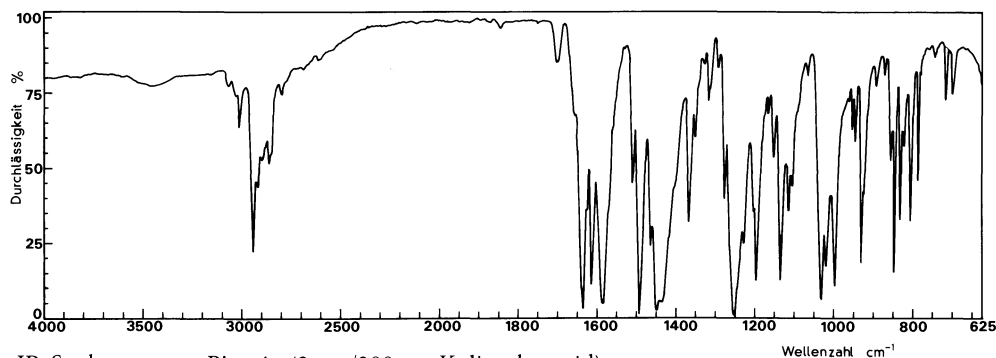
a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (Piperin im mittleren R_f-Bereich zeigt Fluoreszenzminderung).b) UV₃₆₅: Fluoreszierende Zonen markieren (Piperin zeigt blaue Eigenfluoreszenz).

c) Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) anschließend 5–10 min auf 110 °C erhitzen (Piperin färbt sich bei Raumtemperatur sofort gelb, beim Erhitzen braun an).

V. Untersuchungslösung: Bandförmige Auftragung (15 × 3 mm):

a) DC-Lösung a, 10 mm³.b) Rohpiperin } Je 2 mg in 1,0 cm³ Dichlormethanc) Umkrist. Piperin } davon je 10 mm³ auftragen.VI. Vergleichslösung: 2 mg Piperin werden in 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (15 × 3 mm) auf.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Piperins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Piperin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3065–3010	Aromat. und olef. Doppelbindung	CH-Streckschwingung
2940–2850	>CH_2 und $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—H}$	CH-Streckschwingung
2800	$\text{—O—CH}_2\text{—O—}$	CH-Streckschwingung
1630	>N—CO—	C=O-Streckschwingung
1630–1580	olef. Doppelbindung und Aromat	CC-Streckschwingung
1485	Aromat	CC-Streckschwingung
1440–1430	>CH_2 und Aromat	CC-Streck-, CH-Beugeschwingung
1250, 1190, 1030	Ether	CO-Streckschwingung
995	disubst. olef. Doppelbindungen (trans.)	CH-Beugeschwingung
855–700	asym. subst. Aromat	CH-Beugeschwingung

3. Das UV-Spektrum des isolierten Piperins ist aufzunehmen (10 mg in 50 cm³ Ethanol, davon 1,0 cm³ zu 25 cm³ mit Ethanol auffüllen). $\lambda_{\text{max}} = 343\text{--}345 \text{ nm}$ ($\epsilon = 32000$).

4. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Piperins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

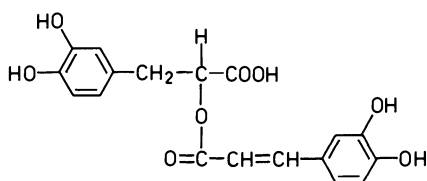
- Welche Strukturelemente sind für die Scharfstoffe Capsaicin und Piperin charakteristisch?
- Welche stereoisomeren Verbindungen sind von Piperin denkbar, welche davon kommen ebenfalls in Pfeffer vor?
- Was sind die Unterschiede zwischen weißem, schwarzem und grünem und rosa Pfeffer?
- Welche andere pflanzliche Scharfstoffe gibt es? Wo kommen sie vor und wie sind sie chemisch aufgebaut?

2.44 Isolierung von Rosmarinsäure aus Melissenblättern

Prinzip: Grob gepulverte Melissenblätter (*Melissa officinalis* L.) werden mit heißem Wasser extrahiert und der Auszug mit Salzsäure angesäuert. Daraus wird die Rosmarinsäure mit Diethylether extrahiert. Der getrocknete und eingedampfte Etherextrakt wird in 70proz. Methanol aufgenommen und mit dem gleichen Lösungsmittel über eine kleine Säule mit Polyamid als stationärer Phase eluiert. Das eingedampfte Eluat wird über Aktivkohle geklärt, aus dem eingedampften Filtrat kristallisiert die Rosmarinsäure bei längerem Stehen aus.

Gehalt: 1–1,5 %.

Strukturformel



Rosmarinsäure (Caffeoyl- α -hydroxydihydrokaffeesäure)

$C_{18}H_{16}O_8$, MG 360,2; Smp: 171–173 °C, $[\alpha]_D^{20} = +122^\circ$ ($c = 1,2$ in EtOH)

Chemikalien

Melissae folium, grob gepulvert,

(1000), 50 g

Salzsäure 25proz. (G/V), 10 cm³

Diethylether, 2,5 l

Calciumchlorid, 250 g

Methanol, 70proz. (V/V), 300 cm³

Polyamid SC 6 (Polycaprolactam),

Korngröße 0,07 mm, 5 g

Aktivkohle, 500 mg

Theophyllin, 2 mg (Vergleich)

Kaffeesäure, 2 mg (Vergleich)

Essigsäureethylester, 100 cm³

Essigsäure, 5 cm³

DC-Schichten, Kieselgel F₂₅₄

Geräte

Bechergläser, 2 l (2), 600 cm³ (1), 250 cm³ (2),
100 cm³ (3), 50 cm³ (2)

1 Büchnertrichter, $\varnothing_1 = 11$ cm mit pass. Guko
zu Saugflasche, 2 l

Erlenmeyerkolben, 2 l (1), 1 l (1),

Rundkolben, NS 29, 2 l (1), 1 l (1), 250 cm³ (1),
100 cm³ (2), 50 cm³ (2)

3 Schliffstopfen, NS 29

1 Scheidetrichter, 1 l

Trichter, \varnothing 10 cm (1), 7 cm (1), 6 cm (2)

1 Chromatographiesäule, $l = 20$ cm, $\varnothing_i = 2$ cm

2 Glasfiltertrichter, D 3, \varnothing 5 cm mit pass.

Guko zu Saugflasche, 100 cm³

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reag. Nr. 3 oder

Naturstoffreagenz (Diphenylboryloxyethylamin) Reag. Nr. 12 oder

Echtblausalzlösung (Reag. Nr. 15)

Allgemeine Geräte

Heizplatte

Spezial-pH-Papier

Thermometer

Wasserbad

KPG-Rührer mit Rührwerk

Rotationsverdampfer

DC-Grundausrüstung

Fraktionssammler mit Zubehör

Magnetrührer mit Stäbchen, 5 cm

Durchführung

50 g grob gepulverte (1000) Melissenblätter werden mit 1000 cm³ Wasser von 80–100 °C versetzt und unter Rühren 45 min lang extrahiert, anschließend wird portionsweise über einen Büchnertrichter abgesaugt, wobei je nach Filtrationsgeschwindigkeit das Filterpapier gewechselt wird. Der Drogenrückstand im Büchnertrichter wird mit Hilfe eines Becherglases als Stempel ausgepreßt und danach erneut mit 1000 cm³ Wasser von 80–100 °C 45 min lang unter Rühren bei dieser Temperatur extrahiert und danach filtriert. Die vereinigten Filtrate (= DC-Lösung a) werden mit 25proz. (G/V) Salzsäure auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt (Verbrauch ca. 5 cm³ 25proz. (G/V) Salzsäure). Die Lösung trübt sich, und es flockt ein bräunlicher Niederschlag aus, von dem abgesaugt wird. Je 500 cm³ dieses Filtrats (= DC-Lösung b) werden viermal mit je 150 cm³ Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten etherischen Phasen (= DC-Lösung c) werden über Calciumchlorid getrocknet und am Rotationsverdampfer bei Wasserbadtemperaturen von ca. 50 °C bis zur Trockene eingengt. Die grünlich gelbe Masse wird bei Wasserbadtemperaturen von 50–60 °C in 10 cm³ 70proz. (V/V) Methanol gelöst, wobei sich wiederum eine grünliche Ausflockung (ca. 5 mg) bildet. Diese Lösung wird über Polyamid zur SC eluiert.

5 g Polyamid SC 6 (Polycaprolactam), Korngröße < 0,07 mm, werden in 30 cm³ 70proz. (V/V) Methanol aufgeschlämmt und danach in eine Chromatographiesäule von 20 cm Länge und 2 cm Ø; gegossen (s. S. 11, Allgemeine Durchführung). Nach Absetzen des Polyamids wird die stationäre Phase zunächst mit 50 cm³ 70proz. (V/V) Methanol gewaschen. Anschließend wird auf die Polyamidschicht der in 70proz. (V/V) Methanol gelöste eingengte Etherextrakt gegeben, wobei der Kolben mit ca. 5 cm³ 70proz. (V/V) Methanol nachgespült wird. Dann wird mit 150 cm³ 70proz. (V/V) Methanol eluiert, und man sammelt Fraktionen zu ca. 15 cm³. Die Rosmarinsäure-haltigen Fraktionen (DC-Bedingungen: siehe bei Auswertung) werden auf ca. 10 cm³ am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von ca. 60 °C bis zu einem Gewicht von ca. 20 g eingengt mit 500 mg Aktivkohle versetzt und auf dem siedenden Wasserbad aufgeköcht und portionsweise heiß filtriert. Der Kolben und der Filtrerrückstand werden noch zweimal mit je 5 cm³ Wasser von ca. 70 °C nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden am Rotationsverdampfer bei Wasserbadtemperaturen von 60–80 °C auf ca. 8 g eingengt und über Nacht bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt. Die ausgefallene Rosmarinsäure wird über einen Glasfiltertrichter abgesaugt. (10 mm³ der Mutterlauge werden mit 0,1 cm³ Methanol verdünnt = DC-Lösung d).

Ausbeute: 400 mg (feucht) Roh-Rosmarinsäure.

Aus der Mutterlauge kristallisiert nach weiterem Stehenlassen bei 4 °C noch weitere Rosmarinsäure aus.

Die noch schwach bräunliche Roh-Rosmarinsäure wird in 4 cm³ Wasser unter Erwärmen auf dem Wasserbad gelöst. (2 mm³ werden mit 0,1 cm³ Methanol verdünnt = DC-Lösung e). Nach Abkühlen im Kühlschrank auf 4 °C beginnt nach ca. 2 h die Kristallisation von farbloser Rosmarinsäure, die nach ca. 12 h über einen Glasfiltertrichter abgesaugt wird und mit ca. 1 cm³ kaltem Wasser gewaschen wird. Das farblose Produkt wird im Vakuum bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 200 mg.

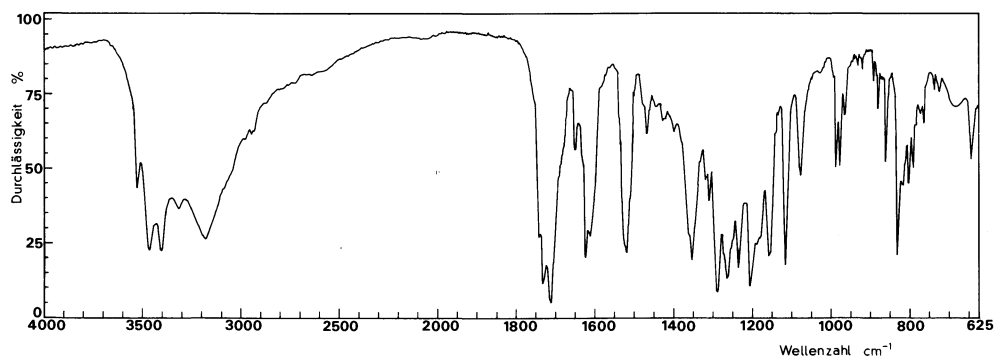
Zeitbedarf: 4 Tage.

Auswertung**1. Dünnschicht-Chromatographie**I. *Standardmethode*: Ja.II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.III. *Fließmittel*: Essigsäureethylester-Essigsäure (95 + 5), KS, 10 cm.IV. *Nachweis*: Nach Abdampfen des Fließmittels im Luftstrom

- a) UV₃₆₅: Rosmarinsäure im mittleren R_f-Bereich zeigt wie die im oberen Drittel des Chromatogramms liegende Kaffeesäure eine hellblaue Eigenfluoreszenz.
- b) UV₂₅₄: Rosmarinsäure zeigt eine schwache Fluoreszenzminderung, im unteren Drittel des Chromatogramms erkennt man eine stark fluoreszenzmindernde Zone einer Begleitsubstanz in den entsprechenden Auftragungen. Die zwischen diesen beiden Substanzen liegende Vergleichssubstanz Theophyllin zeigt ebenfalls Fluoreszenzminderung.
- c) Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz Nr. 3 und anschließend 5–10 min auf 110 °C erhitzen. Rosmarinsäure und die polarere Begleitsubstanz färben sich rosa-rot an.
- d) *Oder*: Besprühen mit Naturstoff-Reagenz (Reag. Nr. 12) und Nachsprühen mit Polyethylenglykol 400 (s. Reag. Nr. 12), anschließend mit langwelligem UV-Licht betrachten. Rosmarinsäure und Kaffeesäure zeigen eine hellgrün-gelbe Fluoreszenz.
- e) *Oder*: Besprühen mit Echtblausalz-Reag. Nr. 15. Rosmarinsäure und die polarere Begleitsubstanz färben sich rotbraun an.

V. *Untersuchungslösung*

- 1) SC von jeder Fraktion 3 mm³ punktförmig
- 2) Bandförmige (10 × 3 mm) Auftragung
DC-Lösungen a–e je 10 mm³ auftragen.
- f) 2 mg umkristallisierte, isolierte Rosmarinsäure werden in 1,0 cm³ Methanol gelöst, davon 10 mm³ auftragen.

VI. *Vergleichslösung*: 2 mg Theophyllin und 2 mg Kaffeesäure werden in 1,0 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) auf.2. Das *IR-Spektrum* der isolierten Rosmarinsäure ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.

IR-Spektrum von Rosmarinsäure (1,5 mg/200 mg Kaliumbromid)

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3520, 3480, 3410, 3330, 3190	–OH in –COOH und Phenole	OH-Streckschwingung
2950	>CH ₂	CH-Streckschwingung
1740	C=O in alip. –COOH	C=O-Streckschwingung

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
1710	C=O in konj. Ester	C=O-Streckschwingung
1655	–CH=CH–C=O	C=C-Streckschwingung
1630, 1620, 1520	Aromat	CC-Streckschwingung
1360	–OH in Phenol	OH-Beugeschwingung
1290, 1270, 1240, 1205	–C–O–	CO-Streckschwingung
980	C=C–C=O, =CH	CH out of plane Schw.
830	CH, asym. Subst. am Aromat	CH-Beugeschwingung

3. Das *UV-Spektrum* der isolierten Rosmarinsäure ist aufzunehmen (1 mg 100 cm^3 Methanol).

$$\lambda_{\text{max}} = 331 \text{ nm } (\epsilon = 17\,300).$$

$$\lambda_{\text{sh}} = 293 \text{ nm } (\epsilon = 14\,000).$$

4. Der *Schmelzpunkt* der isolierten Rosmarinsäure ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

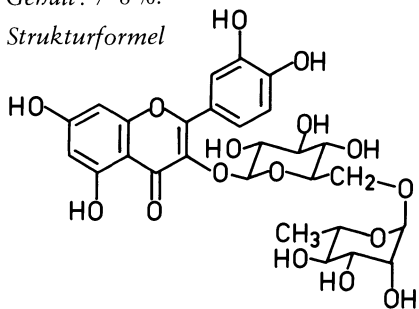
- Wie sind Depsidone allgemein aufgebaut? – Geben Sie noch mindestens zwei weitere natürlich vorkommende Depsidone an.
- Geben Sie eine Definition für Gerbstoffe an? – Welche Gruppen pflanzlicher Gerbstoffe kann man den Grundstrukturen nach unterscheiden?

2.45 Isolierung von Rutin aus Weinrautenkraut (*Rutae herba*)

Prinzip: Gepulvertes Weinrautenkraut (*Ruta graveolens* L.) wird zur Entfernung der lipophilen Begleitstoffe kontinuierlich mit Dichlormethan extrahiert. Aus dem Drogenrückstand wird Rutin durch kontinuierliche Extraktion mit Methanol extrahiert. Aus dem eingeeengten Extrakt wird Rutin durch Umkristallisation mit Wasser rein dargestellt.

Gehalt: 7–8 %.

Strukturformel



Rutin (Quercetin-3-rutinosid = Quercetin-3-(α -L-Rhamnosido-6- β -D-glucosid))

$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, MG 664,6; Smp: 190 °C (Erweichung), 215 °C (Zersetzung)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37$ bis -40° (in wasserfreiem Pyridin)

Chemikalien

Rutae herba, pulv. (300), 50 g

Dichlormethan, 400 cm^3

Methanol, 400 cm^3

Aktivkohle, 2 g

Schwefelsäure, 4proz. (G/V), 1 cm^3

Natriumcarbonat, 5 g

Dichlorethan, 55 cm^3

Eisessig, 30 cm^3

Ameisensäure, 15 cm^3

Essigsäureethylester, 65 cm^3

DC-Schichten Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm

Rutin, 5 mg (Vergleich)

Quercetin, 5 mg (Vergleich)

Rhamnose, 5 mg (Vergleich)

Glucose, 5 mg (Vergleich)

Geräte

1 Soxhlet-Extraktionsapparatur,
 250 cm³ mit 500 cm³-Rundkolben
 1 Rundkolben, NS 29, 500 cm³
 Bechergläser, 400 cm³ (2), 250 cm³ (2)
 2 Trichter, Ø 8 cm
 1 Glasfiltertrichter, D3,
 Ø 5 cm mit pass. Guko zu
 1 Saugflasche, 500 cm³

Allgemeine Geräte

1 Heizpilz, 500 cm³
 DC-Grundausrüstung
 Heizplatte
 Rotationsverdampfer
 Wasserbad

Reagenzien

- a) Diphenylboryloxyethylamin-Reagenz (Reag. Nr. 12) = Naturstoff-Reagenz
- b) Diphenylamin-Reagenz (Reag. Nr. 11)
- c) Aminohipursäure (Reag. Nr. 2)

Durchführung

50 g *Rutae herba* pulv. (300) werden in einer 250 cm³-Soxhlet-Extraktionsapparatur mit 400 cm³ Dichlormethan 8 h extrahiert, bis das rücklaufende Eluat fast farblos ist. Der Extrakt (= DC-Lösung a) wird verworfen. Der Drogenrückstand wird an der Luft getrocknet und danach in der gleichen Soxhlet-Extraktionsapparatur mit 400 cm³ Methanol 5 h extrahiert. Der methanolische Extrakt (= DC-Lösung b) wird am Rotationsverdampfer im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 100–150 cm³ siedendem Wasser gelöst, mit 2–3 Spatelspitzen Aktivkohle versetzt, kurz aufgekocht und heiß filtriert. Beim Abkühlen über Nacht im Kühlschrank bei 4° fällt ein gelblicher Niederschlag (= Roh-Rutin) aus, der abgesaugt wird (Mutterlauge = DC-Lösung c). Der Niederschlag von Roh-Rutin wird in möglichst wenig siedendem Wasser aufgelöst, mit 1–2 Spatelspitzen Aktivkohle versetzt, kurz aufgekocht und heiß filtriert. Aus dem Filtrat scheidet sich beim Abkühlen über Nacht im Kühlschrank reines Rutin aus, das über einen Glasfiltertrichter abgesaugt, mit 5–10 cm³ kaltem Wasser gewaschen und im Vakuumexsikkator über Blaugel getrocknet wird.

Ausbeute: 100–200 mg

Zeitdauer: 2–3 Tage.

Auswertung**1. Dünnschicht-Chromatographie****A. Verfolgung der Isolierungsschritte**

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Essigsäureethylester-Ameisensäure-Wasser (65 + 15 + 20), KS, 10 cm.

IV. Nachweis: Nach Abdampfen des Fließmittels bei 100°:

1. UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren.
2. UV₃₆₅: Fluoreszierende Zonen markieren (Rutin fluoresziert gelb).
3. Besprühen mit Diphenylboryloxyethylamin-Reagenz (Reag. Nr. 23) und anschließend im UV₃₆₅ die fluoreszierenden Zonen markieren. (Die gelbe Eigenfluoreszenz von Rutin wird nach orange verstärkt.)

V. Untersuchungslösung: Bandförmige Auftragung (20 × 3 mm):

1. DC-Lösung a: 10 mm³.
2. DC-Lösung b: 10 mm³.
3. Roh-Rutin: 1 mg wird in 2 cm³ Methanol gelöst, davon 10 mm³.
4. DC-Lösung c: 10 mm³.
5. Rein-Rutin: 1 mg wird in 2 cm³ Methanol gelöst, davon 10 mm³.

VI. Vergleichslösung: 5 mg Rutin werden in 10 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (20 × 3 mm) auf.

B. Nachweis der Hydrolyseprodukte: (Quercetin, Rhamnose, Glucose, Rutinose)

I. Standardmethode: Ja; Abweichung: Laufstrecke 15 cm.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm.

III. Fließmittel: Dichlorethan-Eisessig-Methanol-Wasser (54 + 28 + 11 + 7), KS, 15 cm.

IV. Nachweis: Nach Abdampfen des Fließmittels bei 110 °C:

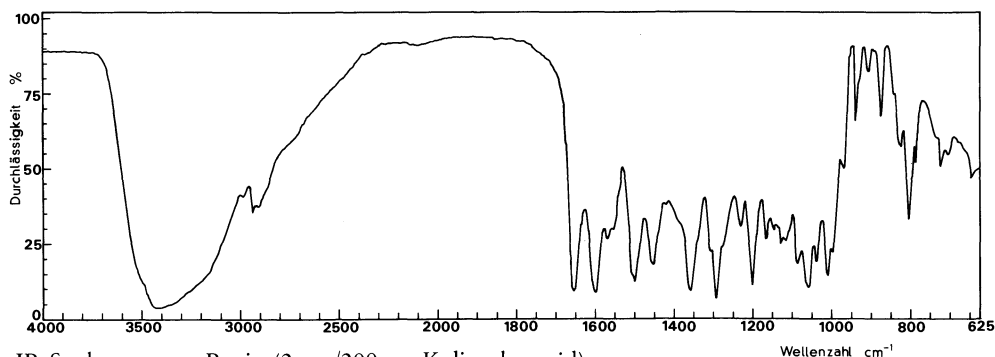
1. UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren (die im mittleren R_f-Bereich liegende Zone von Quercetin zeigt Fluoreszenzminderung).
2. UV₃₆₅: Fluoreszierende Zonen markieren (die Quercetin-Zone zeigt eine hellgrüne Fluoreszenz).
3. Diphenylamin-Reagenz (Reag. Nr. 11) und 10 min 100 °C: Rhamnose (hR_f: 35–40); Rutin (hR_f: 25–30); Glucose (hR_f: 20–25) und Rutinose (hR_f: 15–20) färben sich grau-blau an.
4. Aminohippursäure-Reagenz (Reg. Nr. 2), 10 min 110 °C, im Tageslicht und langwelligem UV-Licht auswerten.

V. Untersuchungslösung: 50 g Rutin werden mit 1,0 cm³ 4proz. Schwefelsäure versetzt und 5 min auf dem siedenden Wasserbad erhitzt (besser mit Bunsenbrenner). Nach dem Abkühlen wird mit festem Natriumcarbonat neutralisiert und mit Methanol im Verhältnis 1:1 verdünnt; davon trägt man 10 mm³ bandförmig (20 × 3 mm) auf.

VI. Vergleichslösung: Je 5 mg Glucose und Rhamnose werden in je 5 cm³ Methanol-Wasser (1 + 1) gelöst, davon trägt man je 10 mm³ bandförmig auf. 5 mg Rutin und 5 mg Quercetin werden in 10 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (20 × 3 mm) auf.

Anmerkung: Die DC-Schicht ist zur Entwicklung erst in die Kammer zu stellen, nachdem mit Hilfe eines Warmluftstromes das Lösungsmittel an der Startzone verdampft ist.

2. Das IR-Spektrum des isolierten Rutins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Rutin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3400	alkoh. und phenol. –OH	OH-Streckschwingung
2990–2810	–CH ₃ , >CH ₂ , –CH	CH-Streckschwingung
1655	beidseitig conj. >C=O	C=O-Streckschwingung
1597, 1570, 1500	Aromat	CC-Streckschwingung
1452	Aromat, –CH ₃ , >CH ₂	asym. CH-Beugeschwingung
1360	phenol.-OH	asoz. OH-Beugeschwingung
1295	alkohol. und phenol. –OH	und CO-Streckschwingung
1203	phenol.-OH	CO-Streckschwingung
	arom.-aliph. Ether	asym. CO-Streckschwingung

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
1090	cycl. Ether	asym. CO-Streckschwingung
1060–1010	alkohol.-OH	CO-Streckschwingung
1060	arom.-aliphat. Ether	sym. CO-Streckschwingung
880	asym. 1, 2, 4. Subst. am Aromat und 1, 2, 3, 5. Subst.	CH-Beugeschwingung

3. Das *UV-Spektrum* des isolierten Rutins ist aufzunehmen (1 mg/50 cm^3 Methanol)

$\lambda_{\text{max}} = 259 \text{ nm}$ ($\epsilon = 21\,660$). $\lambda = 266 \text{ nm}$ (Schulter).

$\lambda_{\text{max}} = 359 \text{ nm}$ ($\epsilon = 18\,230$). $\lambda = 299 \text{ nm}$ (Schulter).

4. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Rutins ist zu bestimmen!

Weitere Aufgaben

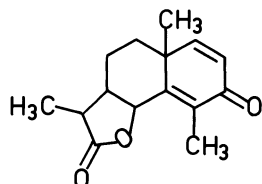
- In welchen Drogen und Nutzpflanzen ist Rutin in größeren Mengen ferner enthalten?
- Welche Flavonoidgrundstrukturen kann man unterscheiden, zu welcher gehört Rutin?
- Welche anderen Glykoside (1 Beispiel) kennen Sie, die als Zuckerkomponente ebenfalls Ruti-nose enthalten?
- Welche andere Flavonglykoside kennen Sie, die das gleiche Aglykon wie Rutin aufweisen?
- Geben Sie Zucker an, die häufig in Glykosiden vorkommen.

2.4.6 Isolierung von α -Santonin aus Zitwerblüten

Prinzip: Die gepulverten Zitwerblüten (*Artemisia cina* (BERG) WILLKOMM) werden mit einer Calciumhydroxidlösung gekocht. Hierbei öffnet sich der Lactonring des Santonins und das Calciumsalz geht in die wäßrige Lösung. Nach Ansäuern (Rückbildung des Lactonrings) wird das Santonin mit Chloroform extrahiert. Aus dem Chloroformextrakt wird das Santonin kristallin isoliert.

Gehalt: 2%.

Strukturformel



α -Santonin

$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_3$, MG 246,3; Smp: 170°C , $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = -173^\circ$ (in Ethanol)

Chemikalien

Cinae flos, pulv. (300), 20 g

Calciumhydroxid, 4 g

Salzsäure, konz., 10 cm^3

Natriumhydrogencarbonatlösung,

4proz. (G/V), 100 cm^3

Aktivkohle, 1 g

Natriumsulfat, wasserfrei, 10 g

Dichlormethan, 600 cm^3

Petrolether (40–60°), 30 cm^3

Aceton, 10 cm^3

DC-Schicht: Kieselgel F_{254} , 20 \times 20 cm

Vanillin, 5 mg (Vergleich)

Geräte

Bechergläser: 1000 cm^3 (2), 100 cm^3 (2)

1 Büchnertrichter, \varnothing 8 cm mit pass. Guko zu

1 Saugflasche, 1000 cm^3

1 Scheidetrichter, 1000 cm^3

1 Erlenmeyerkolben, 500 cm^3

2 Trichter, \varnothing 6 cm

1 Rundkolben, NS 29, 500 cm^3

1 Glasfiltertrichter, D 3, \varnothing 5 cm

mit pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm^3

Allgemeine Geräte

Rotationsverdampfer

DC-Grundausrüstung

Indikatorpapier

Magnetrührer mit Stäbchen, 30 mm

Wasserbad

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

oder Molybdatophosphorsäure (Reag. Nr. 21)

Durchführung

20 g *Cinae flos*, pulv. (300) werden mit 4 g Calciumhydroxid in 500 cm³ Wasser unter Rühren 10 min gekocht. Die heiße Suspension wird abgesaugt über einen Büchnertrichter. Der Drogenrückstand wird portionsweise mit 200 cm³ heißem Wasser nachgewaschen. Das wäßrige Filtrat wird mit konz. Salzsäure auf pH = 1 angesäuert. Die saure wäßrige Lösung wird sechsmal mit je 50 cm³ Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Dichlormethanphasen werden zweimal mit je 50 cm³ einer 4proz. (G/V) Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt (= DC-Lösung a), anschließend mit 1–2 Spatelspitzen Aktivkohle versetzt, kurz aufgekocht und über wasserfreies Natriumsulfat filtriert (= DC-Lösung b). Die getrocknete Dichlormethanphase wird portionsweise am Rotationsverdampfer im Vakuum eingengt bis zu einem Volumen von ca. 5 cm³. Man versetzt die Lösung mit gerade so viel Petrolether, bis eine leichte Trübung eintritt, die beim Erhitzen im Wasserbad wieder verschwindet und stellt die Lösung über Nacht in den Kühlschrank. Die danach ausgefallenen Kristalle von Santonin werden über einen Glasfiltertrichter abgesaugt (Mutterlauge = DC-Lösung c).

Falls das Produkt noch nicht dc rein ist, wird erneut aus Dichlormethan und Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 200–500 mg.

Zeitdauer: 1,5 Tage.

Auswertung**1. Dünnschicht-Chromatographie**

I. *Standardmethode:* Ja.

II. *Schicht:* Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel:* Dichlormethan-Aceton (95 + 5), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis:* Nach Abdampfen des Fließmittels:

1. UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren. (Santonin im mittleren R_f-Bereich und die direkt darunterliegende Vergleichssubstanz zeigen Fluoreszenzminderung).
2. Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) und anschließend 5–10 min auf 100–110° erhitzen. (Santonin färbt sich gelb und nach längerem Lagern rosa an) oder
3. Molybdatophosphorsäure (Reag. Nr. 21) und anschließend 5–10 min auf 105–110° erhitzen (Blaufärbung).

V. Untersuchungslösung

a) *Cinae flos*-Extrakt: 0,1 g *Cinae flos* pulv. werden mit 10 cm³ Dichlormethan unter Schütteln 10 min extrahiert, vom Filtrat trägt man 10 mm³ bandförmig (15 × 3 mm) auf.

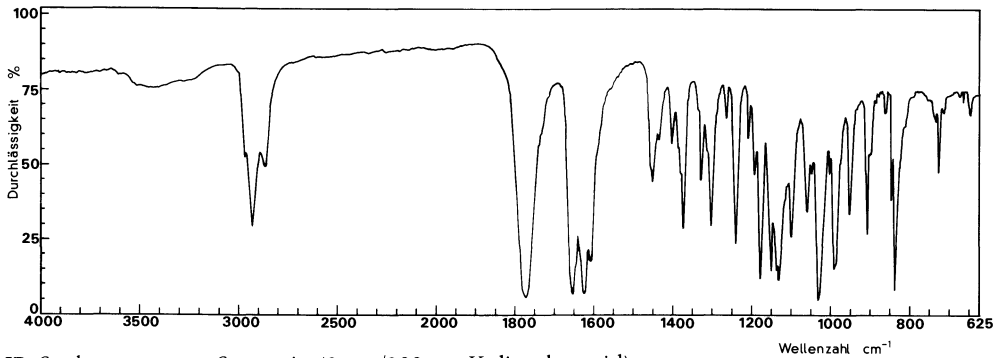
b) DC-Lösung a }
c) DC-Lösung b } Je 20 mm³ bandförmig (15 × 3 mm).

d) Isoliertes Santonin: 5 mg werden in 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (15 × 3 mm) auf.

e) DC-Lösung c: 5 mm³ bandförmig (15 × 3 mm).

VI. *Vergleichslösung:* 5 mg Santonin und 5 mm³ 1.8-Cineol werden in 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig (15 × 3 mm) auf. (Falls Santonin nicht zur Verfügung steht, kann Vanillin eingesetzt werden.)

2. Das IR-Spektrum des isolierten α -Santonins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.

IR-Spektrum von α -Santonin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
2970–2870	$-\text{CH}_3, >\text{CH}_2, -\overset{\textstyle }{\underset{\textstyle }{\text{C}}}-\text{H}$	CH-Streckschwingung
1780	$>\text{C}=\text{O}$ (Lacton)	C=O-Streckschwingung
1655	$>\text{C}=\text{O}$ (konj.)	C=O-Streckschwingung
1630, 1610	olefinische Doppelbindung	C=C-Streckschwingung
1450	$-\text{CH}_3$ und $>\text{CH}_2$	asym. CH-Beugeschwingung und CH-Beugeschwingung
1374	$-\text{CH}_3$	sym. CH-Beugeschwingung
1302 oder 1240	$-\overset{\textstyle }{\underset{\textstyle }{\text{C}}}-\text{CO}-\overset{\textstyle }{\underset{\textstyle }{\text{C}}}-$	vermutl. CC-Beugeschwingung
1240–1100	Lactonring	vermutl. CO-Beugeschwingung
990	disubst. Doppelbind. (trans)	vermutl. CC-Beugeschwingung

3. Das *UV-Spektrum* des isolierten α -Santonins ist aufzunehmen. (5 mg-Santonin werden in 25 cm^3 Ethanol gelöst, davon werden 5 cm^3 mit Ethanol auf 100 cm^3 aufgefüllt.)

$\lambda_{\text{max}} = 240 \text{ nm}$ ($\epsilon = 10000$).

$\lambda_{\text{max}} = 268 \text{ nm}$ ($\epsilon = 6000$).

4. Der *Schmelzpunkt* des isolierten α -Santonins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

- Welche weiteren Sesquiterpenlactone als Drogeninhaltsstoffe kennen Sie? Geben Sie die entsprechenden Drogen an.
- Zeigen Sie an der Strukturformel des α -Santonins die Verknüpfungen der Isopreneinheiten an.
- Welche andere vermifuge Droge kennen Sie? Geben Sie die entsprechenden Inhaltsstoffe an.

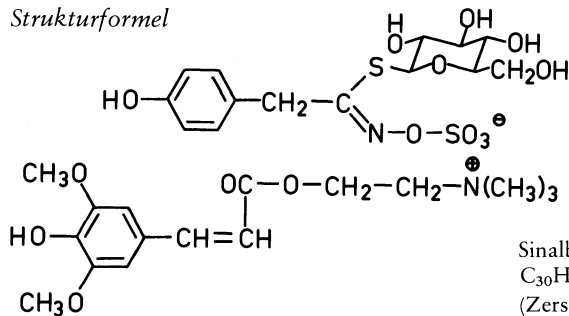
2.47 Isolierung von Sinalbin aus weißem Senf

Vorsicht: Konzentrierte Sinalbinextrakte und Sinalbin verursachen Blasenbildung auf der Haut!

Prinzip: Gepulverte weiße Senfsamen (*Sinapis alba* L.) werden mit Dichlormethan entfettet. Aus dem Drogenrückstand wird das Sinalbin mit Ethanol extrahiert; aus dem eingeeengten Extrakt kristallisiert das Sinalbin aus.

Gehalt: 2,5%.

Strukturformel



Sinalbin

$C_{30}H_{42}O_{14}NS_2$, MG 704,8; Smp: 138–140 °C
 (Zersetzung)

Chemikalien

Erucae semen, pulv. gross (710), 50 g
 Dichlormethan, 400 cm³
 Ethanol, 96proz. (V/V), 700 cm³
 Aceton, 200 cm³
 Ether, 100 cm³
 n-Butanol, 30 cm³
 n-Propanol, 10 cm³
 Eisessig, 10 cm³
 Brassicae nigrae semen, pulv. (710), 0,5 g
 DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄,
 Sinalbin, 5 mg (Vergleich)
 Sinigrin, 5 mg (Vergleich)

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 500 cm³
 Ölbad mit Thermometer
 DC-Grundausrüstung
 Magnetrührer mit Heizung und Stäbchen
 (25 mm)
 Rotationsverdampfer
 Exsikkator, Ø ca. 10 cm

Geräte

1 Extraktionsapparatur nach Soxhlet,
 250 cm³ mit Rundkolben NS 29, 500 cm³
 mit pass. Rückflußkühler
 Rundkolben, NS 29, 500 cm³ (1), 250 cm³ (2)
 1 Zweihalsrundkolben, NS 29, 500 cm³
 2 Bechergläser, 100 cm³
 1 Erlenmeyerkolben, 500 cm³
 1 Rückflußkühler, NS 29
 2 Trichter, Ø 4 und 5 cm
 1 Büchner-Trichter, Ø 11 cm mit pass.
 Guko zu Saugflasche, 1000 cm³
 1 Glasfiltertrichter D 3, Ø 4 cm
 mit pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm³

Reagenzien

a) Trichloressigsäure,
 25proz. (G/V) in Dichlormethan
 b) Kaliumhexacyanoferrat (III),
 1proz. (G/V) wäßrig, frisch bereiten
 c) Eisen(III)chlorid, 5proz. (G/V) wäßrig
 oder: Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Durchführung

50 g Erucae semen pulv. gross (710) werden in einer Extraktionsapparatur nach Soxhlet (250 cm³) mit 400 cm³ Dichlormethan 2 Tage lang extrahiert. Die Extraktlösung (= DC-Lösung a) wird verworfen. Zur Entfernung des anhaftenden Dichlormethan wird der Drogenrückstand auf einem Filterpapierbogen an der Luft ausgebreitet (Abzug!). Der entfettete und lufttrockene Drogenrückstand wird in einen 500 cm³ Rundkolben überführt, mit 300 cm³ Ethanol versetzt und unter Rühren 1 h unter Rückfluß gekocht. Die noch heiße Suspension wird über einen Büchner-Trichter abgesaugt (Filtrat = DC-Lösung b). Dieses Filtrat wird portionsweise in einem 250 cm³-Rundkolben am Rotationsverdampfer eingengt bis zur beginnenden Kristallisation. Der Drogenrückstand wird noch einmal mit 300 cm³ Ethanol 1 h unter Rückfluß und Rühren gekocht und anschließend heiß abgesaugt. Dieses zweite Filtrat (= DC-Lösung c) wird ebenfalls portionsweise eingengt und mit dem ersten vereinigt. Die vereinigten bis zu einem Volumen von ca. 20 cm³ eingengten Filtrate werden über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Das danach auskristallisierte Sinalbin wird über einen Glasfiltertrichter abgesaugt, mit ca. 5 cm³ Ether gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet (Mutterlauge = DC-Lösung d). Ausbeute an Roh-Sinalbin ca. 1 g. 200 mg Roh-Sinalbin werden in 30 cm³ Ethanol (96proz. V/V) unter Erhitzen im siedenden Wasserbad gelöst. Beim Abkühlen auf Zimmertemperatur beginnt nach

2–3 h die Kristallisation. Die Lösung wird danach 2–3 h bei 4 °C aufbewahrt. Die ausgefallenen Sinalbinkristalle werden über einen Glasfiltertrichter (Porosität D3) abgesaugt und mit ca. 5 cm³ Ether gewaschen.

Ausbeute: 100–110 mg.

Aus der Mutterlauge scheiden sich nach weiterem Stehenlassen im Gefrierfach eines Kühlschranks noch weitere Kristalle aus, die wie oben beschrieben weiter behandelt werden.

Ausbeute: 50–60 mg.

Zeitbedarf: 3–4 Tage.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: n-Butanol-n-Propanol-Eisessig-Wasser (30 + 10 + 10 + 10), KS.

IV. Nachweis

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren. Das Sinalbinanion im mittleren hRf-Bereich (35–40) und das Sinalbinkation (Sinapin) im unteren hRf-Bereich (10–15) zeigen Fluoreszenzminderung.

b) UV₃₆₅: Fluoreszierende Zonen markieren. Sinapin zeigt blaue Eigenfluoreszenz.

c) 25proz. (G/V) Trichloressigsäure 10 min bei 140 °C, anschließend mit einem Gemisch aus gleichen Anteilen von 1proz. (G/V) Kaliumhexaxyanoferrat (III) und 5proz. (G/V) Eisen(III)chlorid. Das Sinalbinanion, das Sinigrinanion (hRf-Bereich 25–30) und Sinapin färben sich blau auf leicht gelbgrünem Untergrund.

oder

d) Anisaldehyd-Schwefelsäure, 5–10 min auf 105–110 °C erhitzen.

V. Untersuchungslösung: Bandförmige Auftragung (15 × 3 mm):

1. DC-Lösung a: 10 mm³.

2. DC-Lösung b: 10 mm³.

3. DC-Lösung c: 10 mm³.

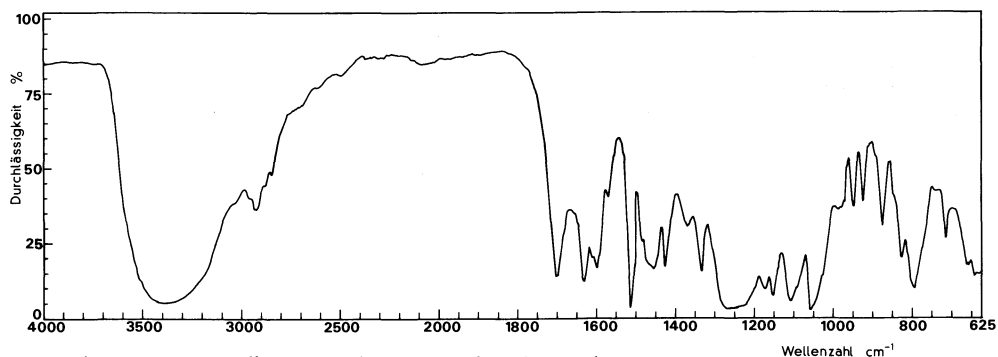
4. DC-Lösung d: 5 mm³.

5. Isoliertes Sinalbin: 5 mg werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon 10 mm³.

6. Brassicae semen-Extrakt: 0,5 g der gepulverten Droge werden 2 × mit je 5 cm³ Dichlormethan auf dem Wasserbad aufgeköcht. Nach Dekantieren des Dichlormethans wird der an der Luft getrocknete Drogenrückstand mit 1 cm³ Ethanol versetzt und einige min auf dem Wasserbad gekocht. Vom erhaltenen Filtrat trägt man 10 mm³ auf.

VI. Vergleichslösung: Je 5 mg Sinalbin und Sinigrin werden in 1 cm³ Methanol gelöst, davon je 10 mm³ auftragen.

2. Es ist das IR-Spektrum des isolierten Sinalbins aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Sinalbin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3380	–OH (Zucker und Phenol)	OH-Streckschwingung
2920	>CH_2	CH-Streckschwingung
2850	–OCH ₃ und –N(CH ₃) ₃	CH-Streckschwingung
1700	>C=O	C=O-Streckschwingung
1690	$\text{–}\overset{\textstyle }{\text{C}}=\text{N}\text{–}$	CN-Streckschwingung
1635	–CH=CH– (cis)	CH-Streckschwingung
1600 und 1510	Aromat	CC-Streckschwingung
1460–1450	>CH_2 , –OCH ₃ und Aromat	CH-Beugeschwingung
1450 oder 1425	–CH ₃ am –N<	asym. Beugeschwingung
1422	–C=CH– (cis)	CH-Beugeschwingung
1335	–OH	asoz. OH-Beugeschwingung
1270–1230	–OH, Ester	freie OH Beuge, CO-Streck- und C–CO–O-Gerüstschwingung
	und –OSO ₃	SO-Streckschwingung
1270–1180	Aromat –O–CH ₃ und Ar-OH	CO-Streck-, freie OH-Beugeschwingung
1150–1050	–O–SO ₃	SO-Streckschwingung
1100	Ether in Zucker	asym. CO-Streckschwingung
1053	$\text{–}\overset{\textstyle }{\text{C}}\text{–OH}$ (in Zucker)	asym. CO-Streckschwingung
825	p-subst. Aromat und vermutl. –O– in Zucker	CH-Beugeschwingung sym. CO-Streckschwingung
794	vic. subst. Aromat	CH-Beugeschwingung
717	–CH=CH– (cis)	CH-Beugeschwingung

3. Das UV-Spektrum des isolierten Sinalbins in Methanol ist aufzunehmen ($c = 1 \text{ mg in } 25 \text{ cm}^3$ Methanol).

$$\lambda_{\text{max}} = 231 \text{ nm } (\epsilon = 24930).$$

$$\lambda_{\text{max}} = 334 \text{ nm } (\epsilon = 17805).$$

4. Der Schmelzpunkt des isolierten Sinalbumins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

- Zu welcher Gruppe von Glykosiden gehören Sinigrin und Sinalbin?
- Zeigen Sie an einer Reaktionsgleichung die Bildung von Senföl aus Sinalbin beim fermentativen Abbau.
- Welche Reaktionsprodukte entstehen anstatt der Senföle beim thermischen Abbau von Sinalbin und Sinigrin?
- Nennen Sie andere Pflanzen, die Glykoside der gleichen Art enthalten.

2.48 Isolierung von β -Sitosterin (Sitosterol) aus Maiskeimöl

Prinzip: Die Triglyzeride des Maiskeimöls werden mit Kaliumhydroxid verseift. Von den wasserlöslichen Verseifungsprodukten wird β -Sitosterin durch Extraktion mit Ether abgetrennt und aus Ethanol umkristallisiert.

Gehalt: 1%.

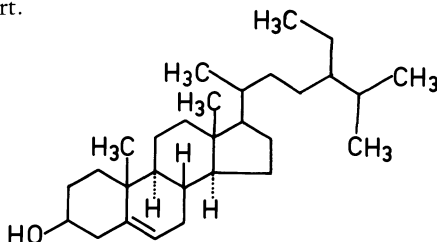
Strukturformel

β -Sitosterin

$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, MG 414,7;

Smp: 139–140 °C (aus Ethanol),

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -36^\circ$ (in Chloroform)



Chemikalien

Maydis oleum (Mazola-Öl), 50 g
 Ether, 900 cm³
 Ethanol, 96proz. (V/V), 10 cm³
 Ethanol, wasserfrei, 100 cm³
 Dichlormethan, 90 cm³
 Essigsäureethylester, 10 cm³
 Ethanolische Kaliumhydroxidlösung,
 20proz. (G/V) (20 g KOH werden in
 10 cm³ Wasser gelöst und mit Ethanol
 auf 100 cm³ aufgefüllt)
 Natriumhydroxidlösung, 0,4proz. (G/V), 200 cm³
 Natriumchlorid, 30 g
 Natriumsulfat, wasserfrei, 50 g

Reagenzien

Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)
 Phenolphthaleinlösung (Reag. Nr. 22)

Geräte

Rundkolben, NS 29, 250 cm³ (3)
 1 Rückflußkühler, NS 29
 Erlenmeyerkolben, 1000 cm³ (2),
 500 cm³ (2)
 Scheidetrichter, 2000 cm³ (1),
 1000 cm³ (1)
 Bechergläser, 250 cm³ (1), 100 cm³ (2)
 1 Trichter, Ø 10 cm
 1 Glasfiltertrichter, D 3,
 Ø 5 cm mit pass. Guko zu
 1 Saugflasche, 250 cm³

Allgemeine Geräte

1 Heizpilz, 250 cm³
 DC-Grundausrüstung
 Rotationsverdampfer

Durchführung

50 g Maiskeimöl (z.B. Mazola-Öl) werden in einem 250 cm³-Rundkolben mit 100 cm³ einer 20proz. (G/V) alkoholischen Kaliumhydroxidlösung versetzt und unter Zusatz einiger Siedesteinchen 2 h unter Rückfluß gekocht. Danach wird der Alkohol im Vakuum am Rotationsverdampfer weitgehend entfernt. – Übermäßiges Schäumen ist durch Regulierung des Vakuums zu unterbinden. – Der Rückstand wird in einen 2000 cm³-Scheidetrichter mit insgesamt 700 cm³ dest. Wasser als Spülflüssigkeit überführt. Zu dieser Lösung werden 10 cm³ Ethanol gegeben. Nach Zugabe von 400 cm³ Ether wird umgeschüttelt. Die gebildete Emulsion wird nach Zugabe von 10 g Natriumchlorid und weiterem Umschütteln bis zur Auflösung des Salzes zerstört. Nach längerem Absetzenlassen (ca. 1 h) ist eine Phasentrennung erkennbar. Die etherische Phase wird abgetrennt und aufbewahrt. Die wäßrige Lösung wird noch zweimal mit je 200 cm³ Ether extrahiert, wobei auch jeweils wieder 10 g Natriumchlorid zur Zerstörung der Emulsion hinzugegeben werden. Die Phasentrennung tritt auch hier jeweils erst nach längerer Zeit ein. Die Etherphasen werden vereinigt und mit 200 cm³ einer 0,4proz. (G/V) Natriumhydroxidlösung gewaschen. Auch hier tritt erst nach längerer Zeit eine Phasentrennung der milchig-trüben Emulsion ein. Die untere wäßrige Phase wird verworfen und die etherische Lösung mehrmals (ca. 10mal) mit je 100 cm³ dest. Wasser gewaschen, bis die wäßrige Phase mit Phenolphthaleinlösung keine Rotviolett-färbung mehr zeigt. Die etherische Lösung wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Der Natriumsulfatrückstand wird mit 100 cm³ Ether nachgewaschen. Die Etherlösung wird portionsweise am Rotationsverdampfer bei Zimmertemperatur bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in der kleinstmöglichen Menge heißem absoluten Ethanol (ca. 20 cm³) gelöst (= DC-Lösung a) und in ein 100 cm³-Becherglas überführt. Aus der schwach gelben Lösung scheiden sich beim Abkühlen und insbesondere beim Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank farblose Kristalle aus, die über einen Glasfiltertrichter abgesaugt werden. Falls das Produkt noch nicht dc rein ist, erfolgt eine weitere Umkristallisation aus heißem Ethanol.

Ausbeute: 250–300 mg.

Zeitbedarf: 2 Tage.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. Standardmethode: Ja.

II. Schicht: Kieselgel F₂₅₄.

III. Fließmittel: Dichlormethan-Essigsäureethylester (90 + 10), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis*: Nach Abdampfen des Fließmittels:

Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Reag. Nr. 3) und anschließend 5–10 min auf 105–110° erhitzen (β -Sitosterin ist im unteren Drittel des Chromatogramms als rotviolette Zone zu sehen).

V. *Untersuchungslösung*: Bandförmige Auftragung (10 × 3 mm):

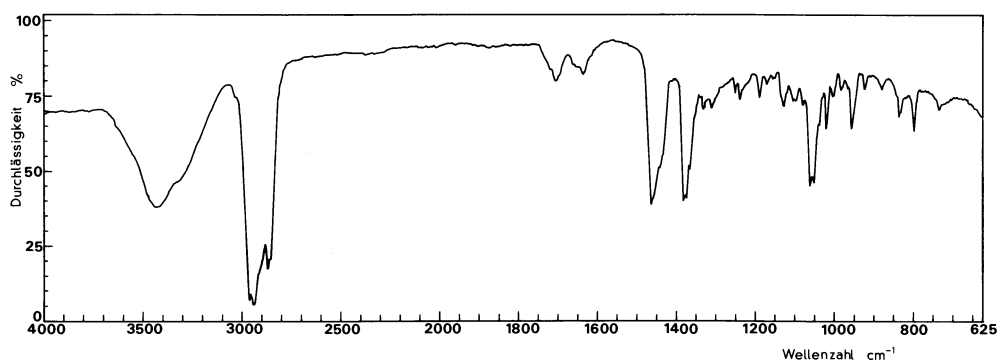
1. DC-Lösung a, 5 mm³.

2. Isoliertes β -Sitosterin: 5 mg werden in 0,5 cm³ Essigsäureethylester, gelöst, davon 5 mm³.

3. Mutterlauge, 5 mm³.

VI. *Vergleichslösung*: 5 mg β -Sitosterin werden in 0,5 cm³ Essigsäureethylester gelöst, davon trägt man 5 mm³ bandförmig (10 × 3 mm) auf.

2. Das IR-Spektrum des isolierten β -Sitosterins ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von β -Sitosterin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
3420	–OH	OH-Streckschwingung
2980–2850	–CH ₃ , >CH ₂ , –CH	CH-Streckschwingung
1460–1440	–CH ₃ und >CH ₂	CH-Beugeschwingung
1380 und 1375	–CH ₃	sym. CH-Beugeschwingung
1060 und 1050	sek. –C–OH	CO-Streckschwingung
836 oder 800	trisubst. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung

3. Der *Schmelzpunkt* des isolierten β -Sitosterins ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

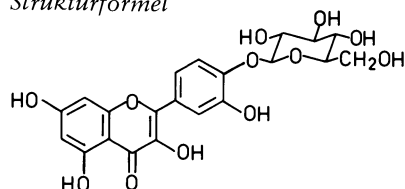
- Nennen Sie weitere in der Natur vorkommende weitverbreitete Sterine.
- Welche pflanzlichen Naturstoffgruppen mit einem Steroidgrundgerüst sind Ihnen bekannt?
- Was sind Lipide und was sind Lipoide?
- Welches sind die meist gebrauchten Speiseöle?

2.49 Isolierung von Spiraeosid aus Blüten der Spierstaude

Prinzip: Gepulverte Spierblumen (*Filipendula ulmaria* (L.) MAXIM) werden zur Extraktion der lipophilen Begleitstoffe kontinuierlich mit Dichlormethan extrahiert. Aus dem Drogenrückstand wird Spiraeosid neben anderen lipophilen Begleitstoffen durch kontinuierliche Extraktion mit Methanol ausgezogen. Die Abtrennung von Spiraeosid aus dem eingengten Extrakt erfolgt durch Säulenchromatographie.

Gehalt: 1,2 %.

Strukturformel



Spiraeosid (Quercetin-4'-β-D-glucosid)

$C_{21}H_{20}O_{12}$, MG 464,4; Smp: 209–211 °C (aus verd. Aceton),
 $[\alpha]_D^{17} = -69^\circ$ (in Methanol)

Chemikalien

Spiraeae flos, pulv. (300), 50 g
 Dichlormethan, 1500 cm³
 Methanol, 1000 cm³
 Aceton, 50 cm³
 Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 150 g
 Seesand, 80 g
 DC-Schicht, Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
 Aktivkohle, 1 g
 Rutin, 5 mg (Vergleich)

Allgemeine Geräte

Rotationsverdampfer
 DC-Grundausrüstung
 Wärmeplatte
 Vakuumexsikkator
 Heizpilz, 500 cm³

Geräte

1 Extraktionsapparat nach Soxhlet,
 250 cm³ mit 500 cm³-Rundkolben
 Rundkolben, NS 29, 250 cm³ (1), 100 cm³ (1)
 Bechergläser, 250 cm³ (2), 100 cm³ (2), 50 cm³ (2)
 1 Mörser, Ø 6 cm mit Pistill
 1 Trichter, Ø 6 cm
 1 Kristallisierschale, Ø 8 cm
 1 Glasfiltertrichter, Ø 5 cm mit
 pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm³
 1 Chromatographiesäule, $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 2$ cm

Reagenzien

Naturstoff-Reagenz
 (= Diphenylboryloxyethylamin, Reag. Nr. 12)
 Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3)

Durchführung

a) **Extrakt:** 50 g Spiraeae flos, pulv. (300) werden in einer 250 cm³-Soxhlet-Extraktionsapparat mit 400 cm³ Dichlormethan 8 h extrahiert. Der Extrakt (= DC-Lösung a) wird verworfen. Der Drogenrückstand wird an der Luft getrocknet und danach in der gleichen Soxhlet-Extraktionsapparat mit 400 cm³ Methanol 8 h extrahiert. Der methanolische Extrakt (= DC-Lösung b) wird am Rotationsverdampfer weitgehend eingengt bis zur beginnenden Ausfällung (ca. 10 g sirupöser Extrakt).

b) Säulenchromatographie

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 2$ cm

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 150 g.

Elutionsmittel: Dichlormethan-Methanol (80 + 20), 1200 cm³.

Dichlormethan-Methanol (70 + 30), 500 cm³.

Aufgabemenge: Der sirupartige Extrakt (a) wird mit ca. 50 g Seesand in einer Kristallisierschale verrieben und die Mischung auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Diese Mischung wird in einem Mörser verrieben und die pulvrige Masse wird auf die Kieselgelschicht in der Chromatographiesäule derart aufgegeben, daß sie vom überstehenden Elutionsmittel stets sofort befeuchtet wird.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Fraktionen: 15 cm³.

Nach Einengen der Spiraeosid-haltigen Fraktionen zur Trockne fällt Spiraeosid als gelbe, amorphe, pulvrige Masse an. Das noch wenig Begleitsubstanzen enthaltende Produkt wird in der vierfachen Menge von 75proz. (V/V) Aceton gelöst, mit einer Spatelspitze Aktivkohle versetzt, kurz auf dem Wasserbad aufgeköcht und abfiltriert. Beim Einengen im Vakuumexsikkator scheiden sich gelbe Kristalle aus, die über einen Glasfiltertrichter abgesaugt werden. Falls keine Auskristallisation erfolgt, wird die Lösung erneut zur Trockne eingengt und mit gerade so viel eines Gemisches aus 5 Volumenteilen Dichlormethan und 1 Volumteil Methanol versetzt, bis beim Erhitzen auf dem Wasserbad eine klare Lösung entsteht. Diese Lösung wird wiederum mit einer Spatelspitze Aktivkohle versetzt, kurz auf dem Wasserbad aufgeköcht und filtriert. Beim Abkühlen im Kühlschrank scheidet sich Spiraeosid amorph aus.

Ausbeute: 200–300 mg.

Zeitdauer: 3–4 Tage.

c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode:* Ja.

II. *Schicht:* Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel:* Essigsäureethyl-ester-Ameisensäure-Wasser (65 + 15 + 20), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis:* Nach Abdampfen des Fließmittels auf der Wärmeplatte:

a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren.

b) UV₃₆₅: Fluoreszierende Zonen markieren.

c) Besprühen mit Naturstoffreagenz (= Diphenylboryloxyethylamin, Reg. Nr. 12) und anschließend im langwelligen UV-Licht auswerten. (Spiraeosid mit mittleren R_f-Bereich des Chromatogramms zeigt eine deutliche gelbgrüne Fluoreszenz. Die im unteren Drittel des Chromatogramms liegende Vergleichssubstanz Rutin zeigt eine orangefarbene Fluoreszenz). Oder

d) Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3), 5–10 min, 110 °C.

V. *Untersuchungslösung*

a) 10 mm³ des eingengten Extrakts (a) (= DC-Lösung b) werden in 0,1 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 5 mm³ punktförmig auf.

b) Ab Fraktion 20 trägt man von jeder 3. Fraktion 5–10 mm³ punktförmig auf.

VI. *Vergleichslösung:* 5 mg Rutin werden in 1,0 cm³ Methanol gelöst, davon trägt man 2 mm³ punktförmig auf.

Auswertung

1. *Abschließende Dünnschicht-Chromatographie*

DC-Bedingungen: I., II., III., IV. und VI. wie bei c)

V. *Untersuchungslösung:* Bandförmige Auftragung (20 × 3 mm):

a) Spiraeae flos-Extrakt: 0,5 g Spiraeae flos pulv. (300) werden mit 5 cm³ Methanol kurz auf dem Wasserbad aufgeköcht und danach filtriert. Vom Filtrat trägt man 10 mm³ auf.

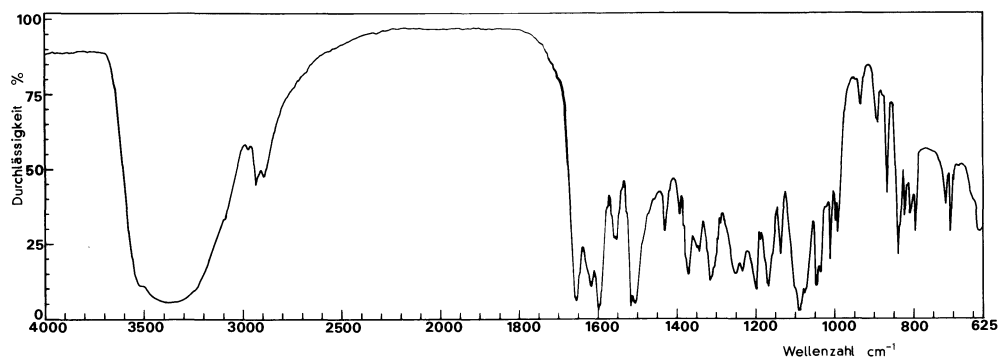
b) DC-Lösung a: 10 mm³.

c) DC-Lösung b: Verdünnung 1:10 (vgl. c, V, a) 10 mm³.

d) Isoliertes Spiraeosid: 5 mg werden in 1,0 cm³ Methanol gelöst, davon 10 mm³.

VI. *Vergleichslösung:* Siehe c, VI: 10 mm³ werden bandförmig (20 × 3 mm) aufgetragen.

2. Das *IR-Spektrum* des isolierten Spiraeosids ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Spiraeosid (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3540–3100	alkohol. und phenol. –OH	OH-Streckschwingung
2930–2890	>CH_2	CH-Streckschwingung
1657	>C=O	C=O-Streckschwingung
1619	trisubst. olef. Doppelbind. (konj.)	C=C-Streckschwingung
1598, 1556, 1520–1505	Aromat	CC-Streckschwingung
1430	>CH_2 , Aromat und prim. Alkohol	CH-Beugeschwingung CC-Streckschwingung asso. OH-Beugeschw.
1370	phenol. OH	OH-Beugeschwingung
1345	trisub. olef. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung
1315	phenol. OH	freie OH-Beugeschw.
1250–1170	alkohol. und phenol. OH	freie OH-Beugeschw. CO-Streckschwingung
1050–1010	alkohol. OH	CO-Streckschwingung
1088	Ether	asym. CO-Streckschw.
890–790	Ether, Subst. am Aromat und trisub. olef. Doppelbind.	sym. CO-Streckschw. CH-Beugeschwingung

3. Das *UV-Spektrum* des isolierten Spiraeosids ist aufzunehmen. (5 mg Spiraeosid werden in 100 cm^3 Methanol gelöst, davon werden 10 cm^3 mit Methanol auf 25 cm^3 aufgefüllt.)

$$\lambda_{\text{max}} = 366 \text{ nm } (\epsilon = 14900).$$

$$\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm } (\epsilon = 14300).$$

4. Der *Schmelzpunkt* des isolierten Spiraeosids ist zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

- Welche weitere Quercetinglykoside kommen als Pflanzeninhaltsstoffe vor? Geben Sie die entsprechenden Zuckerkomponenten und deren Substitutionsstellen an.
- Was sind Iso- und Neoflavone?
- Geben Sie weitere natürlich vorkommende flavonoide Strukturen an.

2.50 und 2.51 Isolierung von Strychnin und Brucin aus Strychnos-Samen

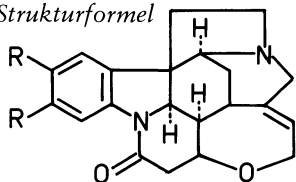
Vorsicht: Strychnin ist sehr giftig!

Prinzip: Die gepulverten Strychnos-Samen (*Strychnos nux-vomica* LINNÉ) werden mit Petrolether entfettet und anschließend alkalisiert; daraus werden die Alkaloidbasen mit Dichlormethan

extrahiert. Aus dem Dichlormethanextrakt werden die Alkaloide mit verdünnter Säure als Salze abgetrennt. Nach Alkalisieren fallen die wasserunlöslichen Alkaloidbasen kristallin an. Eine Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten in 50proz. Ethanol; Brucin ist leichter löslich als Strychnin.

Gehalt: 2–3 % Alkaloide; davon ca. 50 % Strychnin und ca. 40 % Brucin.

Strukturformel



R = H: Strychnin, $C_{21}H_{22}N_2O_2$, MG 334,4;

Smp: 286–288 °C, $[\alpha]_D^{18} = -139,3^\circ$ (Chloroform)

R = OCH₃: Brucin, $C_{23}H_{26}N_2O_4$, MG 394,4;

Smp: 176–178 °C, $[\alpha]_D^{20} = -149,5^\circ$ (Chloroform)

Chemikalien

Strychni semen pulv. (710), 100 g
 Petrolether (40–60°), 1000 cm³
 Dichlormethan, 1200 cm³
 Ethanol, 50proz. (V/V), 100 cm³
 Aceton, 20 cm³
 Calciumhydroxid, 20 g
 Schwefelsäure, 5proz. (G/V), 100 cm³
 Schwefelsäure, 16proz. (G/V), 100 cm³
 Natriumhydroxid, 10 g
 Aktivkohle, 1 g
 Natriumcarbonat, 10 g
 Methanol, 100 cm³
 Natriumsulfat, wasserfrei, 10 g
 konz. Ammoniaklösung, 5 cm³
 DC-Schicht: Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm
 Strychnin, 2 mg (Vergleich)
 Brucin, 2 mg (Vergleich)

Reagenzien

Dragendorff-Reagenz (Reag. Nr. 13)

Geräte

1 Extraktionsapparatur nach Soxhlet,
 500 cm³ mit 1000 cm³ Rundkolben,
 NS 29 und pass. Rückflußkühler
 Rundkolben NS 29, 1000 cm³ (1),
 100 cm³ (2), 50 cm³ (2)
 Erlenmeyerkolben, 50 cm³ (2)
 Bechergläser, 400 cm³ (1),
 250 cm³ (1), 100 cm³ (2), 50 cm³ (2)
 Trichter, Ø 7 cm (1), Ø 5 cm (2)
 1 Scheidetrichter, 500 cm³
 2 Glasfiltertrichter, D 3, Ø 4 cm mit
 pass. Guko zu Saugrohr, 25 cm³
 1 Porzellanabdampfschale, Ø 20 cm

Allgemeine Geräte

Rotationsverdampfer
 pH-Papier
 Wasserbad
 Magnetrührer mit Stäbchen, 10 mm
 DC-Grundausrüstung

Durchführung

a) *Strychnin-Isolierung:* 100 g Strychni semen plv. gross. werden in einer Soxhletapparatur mit 900 cm³ Petrolether 5–6 h extrahiert (DC-Lösung a). Den Drogenrückstand trocknet man im Abzug auf Filterpapier und mischt ihn danach in einer Porzellanabdampfschale mit 200 cm³ einer 10proz. wäßrigen Calciumhydroxid-Suspension innig durch. Nach mehrstündigem Stehen füllt man die Masse in eine Soxhletapparatur und extrahiert 3 h mit 900 cm³ Dichlormethan. Den Dichlormethanextrakt (DC-Lösung b) engt man am Rotationsverdampfer auf 200 cm³ ein und schüttelt 3 × mit je 25 cm³ 5proz. Schwefelsäure aus. Die wäßrigen Phasen und die Emulsionsschichten werden vereinigt und mit 10proz. Natronlauge alkalisiert. Die beim mehrstündigen Kühlen ausfallenden Kristalle nutschts man ab (2 mg der Kristalle werden in 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst = DC-Lösung c). In einem 100 cm³-Rundkolben werden die Kristalle in 20 cm³ 50proz. Ethanol unter Schütteln am Rückfluß unter Zusatz von 0,5 g Aktivkohle bis zur Lösung erhitzt. Dann wird heiß filtriert (0,1 cm³ des Filtrats werden mit 0,1 cm³ Dichlormethan verdünnt = DC-Lösung d) und das Filtrat einige h bei 4 °C kaltgestellt. Die Kristalle werden abgenutschts und mit wenig kaltem 50proz. (V/V) Ethanol gewaschen. (0,1 cm³ des Filtrats werden mit 0,1 cm³ Dichlormethan verdünnt = DC-Lösung f). *Ausbeute:* 150–200 mg Roh-Strychnin (2 mg in 0,5 cm³ Dichlormethan = DC-Lösung e). Die Mutterlauge dient zur Gewinnung des Brucins.

Reinigung des Roh-Strychnins über das Sulfat: 200 mg Strychnin werden in einem 50 cm³

Erlenmeyerkolben in 2 cm³ kochendem Wasser aufgenommen und unter Rühren (Magnetrührer) tropfenweise 16proz. (G/V) Schwefelsäure zugegeben, bis sich die Kristalle gerade eben gelöst haben. Nach Zugabe einer Spatelspitze Aktivkohle wird heiß filtriert. Nach längerem Stehenlassen im Kühlschrank fällt das Strychninsulfat aus und wird abgenutscht. Das Strychninsulfat wird unter Erwärmen in einigen cm³ Wasser gelöst und mit 10proz. (G/V) Natriumcarbonatlösung alkalisiert. Beim Kühlen fällt die Strychninbase aus. Sie wird abgesaugt und mit wenig Eiswasser gewaschen und dann aus heißem Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: Ca. 120 mg.

- b) *Brucin-Isolierung:* Aus der Mutterlauge der Strychnin-Isolierung wird am Rotationsverdampfer der Alkohol entfernt und danach mit verdünnter Schwefelsäure auf ein pH von 5–6 angesäuert. Anschließend konzentriert man weiter auf 1–2 cm³. Nach längerem Stehen bei 4° kristallisiert Brucinsulfat aus. Man saugt ab und wäscht mit wenigen cm³ Eiswasser nach. Die Reinigung und Überführung in die Base kann in gleicher Weise wie beim Strychninsulfat erfolgen. Eine Umkristallisation der Brucinbase erfolgt in einem Aceton-Wasser-Gemisch (1 + 1).
Ausbeute: Ca. 100 mg.

Auswertung

1. Dünnschicht-Chromatographie

I. *Standardmethode:* Ja.

II. *Schicht:* Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel:* Methanol-Ammoniaklösung, konz. (95 + 5), KS.

IV. Nachweis

1. UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren. (Strychnin (hRf 50–60) und Brucin (hRf 40–50) zeigen Fluoreszenzminderung).

2. Dragendorff-Reagenz (Reag. Nr. 13) und mit ca. 0,1 N Schwefelsäure nachsprühen. (Strychnin und Brucin färben sich braun an).

V. *Untersuchungslösung:* Bandförmige Auftragung (15 × 3 mm) je 10 mm³:

1. DC-Lösung a

2. DC-Lösung b

3. DC-Lösung c (Brucin/Strychnin-Kristallisat)

4. DC-Lösung d

5. DC-Lösung e (Roh-Strychnin)

6. DC-Lösung f

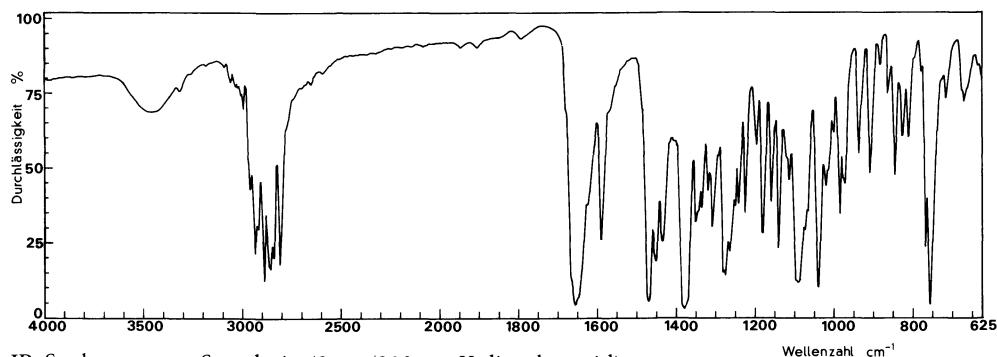
7. isoliertes Strychnin

8. isoliertes Brucin

} je 2 mg werden in 1,0 cm³ Chloroform gelöst.

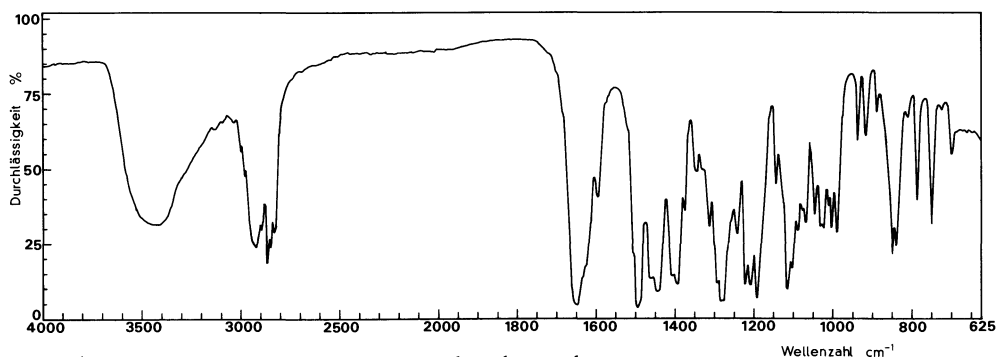
VI. *Vergleichslösung:* Je 2 mg Strychnin und Brucin werden in je 1,0 cm³ Chloroform gelöst, davon trägt man 10 mm³ bandförmig auf.

2. Die IR-Spektren des isolierten Strychnins und Brucins sind aufzunehmen, mit den abgebildeten Spektren und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Strychnin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3100–3000	Aromat	CH-Streckschwingung
2965–2850	$>\text{CH}_2$	CH-Streckschwingung
2812	$>\text{CH}_2$ benachbart zu $-\text{NR}_2$	CH-Streckschwingung
1655	$>\text{C}=\text{O}$ (in tert. Amid)	C=O-Streckschwingung
1594, 1473, 1455	Aromat	CC-Streckschwingung
1439	$>\text{CH}_2$ in α -Stellung zu $>\text{C}=\text{O}$	CH-Beugeschwingung
1100	cycl. Ether	asym. CO-Streckschwingung
834 und/oder 817	endocycl. trisubst. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung
774–760	ortho-disubst. Aromat	CH-Beugeschwingung



IR-Spektrum von Brucin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
2940–2848	$>\text{CH}_2$	CH-Streckschwingung
2868 und 2852	$-\text{CH}_3$ (als $-\text{O}-\text{CH}_3$)	CH-Streckschwingung
2832	$>\text{CH}_2$ benachbart zu $-\text{NR}_2$	CH-Streckschwingung
1654	$>\text{C}=\text{O}$ (in tert. Amid)	C=O-Streckschwingung
1620, 1596, 1495 und 1460	Aromat	CC-Streckschwingung
1448	$>\text{CH}_2$	CH-Beugeschwingung
1435	$>\text{CH}_2$ in α -Stellung zu $>\text{C}=\text{O}$	CH-Beugeschwingung
1110	cycl. Ether	asym. CO-Streckschwingung
846	tetra-subst. Aromat	CH-Beugeschwingung
837 und/oder 735	endocycl. trisubst. Doppelbindung	CH-Beugeschwingung

3. Die UV-Spektren des isolierten Strychnins und Brucins sind aufzunehmen. (Je 5 mg werden in je 10,0 cm^3 Ethanol gelöst, davon wird je 1 cm^3 auf je 25,0 cm^3 Ethanol aufgefüllt.)

Strychnin: $\lambda_{\text{max}} = 255 \text{ nm}$ ($\epsilon = 12\,600$).

Brucin: $\lambda_{\text{max}} = 264 \text{ nm}$ ($\epsilon = 10\,300$).

$\lambda_{\text{max}} = 301 \text{ nm}$ ($\epsilon = 8\,700$).

4. Die Schmelzpunkte des isolierten Strychnins und Brucins sind zu bestimmen.

Weitere Aufgabe

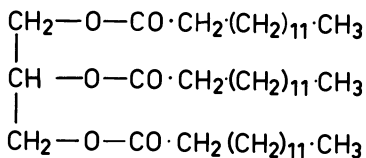
- Zu welcher Gruppe von Alkaloiden gehören Strychnin und Brucin der Biogenese nach? – Welche anderen Alkaloide gehören in diese Gruppe?
- Worauf beruht die unterschiedliche Farbauscheidung von Strychnin und Brucin nach Zugabe von konzentrierter Salpetersäure?
- Wie unterscheiden sich Strychnin und Brucin in ihrer Toxizität?

2.52 Isolierung von Trimyristin aus Muskatnuß

Prinzip: Gepulverte Muskatnüsse (*Myristica fragrans* HOUTT.) werden mit Dichlormethan extrahiert. Aus dem eingeeengten Extrakt kristallisiert das rohe Trimyristin aus, das mehrmals in Ethanol umkristallisiert wird.

Gehalt: Ca. 25 %.

Strukturformel



Trimyristin

$\text{C}_{45}\text{H}_{36}\text{O}_6$, MG 723,04; Smp: 56–57 °C

Chemikalien

Myristicae semen, pulv. (710), 25 g

Dichlormethan, 300 cm³

Ethanol, 300 cm³

1 N-ethanolische Kaliumhydroxidlösung, 25 cm³

Salzsäure, konz., 10 cm³

DC-Schicht: Kieselgel, 20 × 20 cm

Petrolether (40–60 °), 90 cm³

Ether, 20 cm³

Eisessig, 2 cm³

Reagenzien:

2',7'-Dichlorfluorescein (Reag. Nr. 8)

oder ANSA (Reag. Nr. 4)

Geräte

2 Rundkolben, NS 29, 500 cm³

1 Rückflußkühler, NS 29

1 Büchner-Trichter, Ø 8 cm mit

pass. Guko zu Saugflasche, 100 cm³

2 Trichter, Ø 10 cm und 8 cm

2 Erlenmeyerkolben-Weithals, 250 cm³

2 Bechergläser, 250 cm³

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 500 cm³

Wasserbad

Rotationsverdampfer

pH-Papier

Durchführung

25 g gepulverte Muskatnußsamen (710) werden in einem 500 cm³-Rundkolben mit 300 cm³ Dichlormethan 2 h unter Rückfluß gekocht und mit 50 cm³ Dichlormethan nachgewaschen. Das vereinigte Filtrat (= DC-Lösung a) wird in einem 500 cm³-Rundkolben am Rotationsverdampfer weitgehend eingeeengt. Nach Zugabe von 50 cm³ Ethanol erhitzt man bis zur Lösung des ausgefallenen Trimyristins, läßt ca. 30 min bei 4 °C abkühlen und saugt den entstandenen Kristallbrei ab. Anschließend wird in der gleichen Weise umkristallisiert, bis das Produkt geruchlos ist.

Ausbeute: 5 g.

Zeitbedarf: 1 Tag.

Auswertung

1. Verseifung von Trimyristin zu Myristinsäure.

(CH₃ · (CH₂)₁₁ · CH₂ · COOH, C₁₄H₂₈O₂, MG 228, 36; Smp: 51–52 °C)

Durchführung: 2,5 g Trimyristin werden in einem 100 cm³-Rundkolben mit 25 cm³ 1 N-ethanolischer Kaliumhydroxidlösung 1 h unter Rückfluß gekocht. Man fügt danach 50 cm³ Wasser hinzu und säuert mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 an. Nach mehrstündigem Stehenlassen bei 4 °C wird der Niederschlag abgesaugt und aus Ethanol unter Zugabe von Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 2 g.

Zeitbedarf: 5–6 h.

2. *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode:* Ja.

II. *Schicht:* Kieselgel.

III. *Fließmittel*: Petrolether (40–60 °C)-Ether-Eisessig (84 + 15 + 1), KS, 10 cm.

IV. *Nachweis*: 0,2proz. (G/V) 2',7'-Dichlorfluorescein oder ANSA-Reag., anschließend im langwelligem UV-Licht betrachten (Trimyristin, hRf 30–40 und Myristinsäure, hRf 10–20).

V. *Untersuchungslösung*: Bandförmige Auftragung (15 × 3 mm):

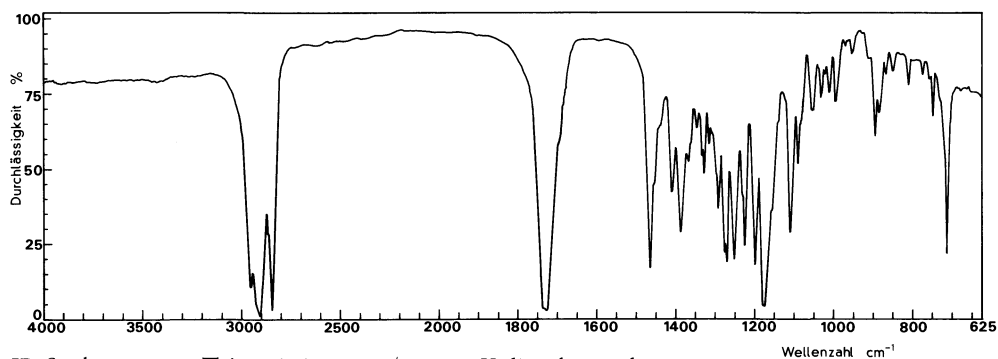
1. DC-Lösung a: 10 mm³.

3. Isoliertes Trimyristin: 10 mg werden in 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon 10 mm³.

3. Isolierte Myristinsäure: 10 mg werden in 1,0 cm³ Dichlormethan gelöst, davon 10 mm³.

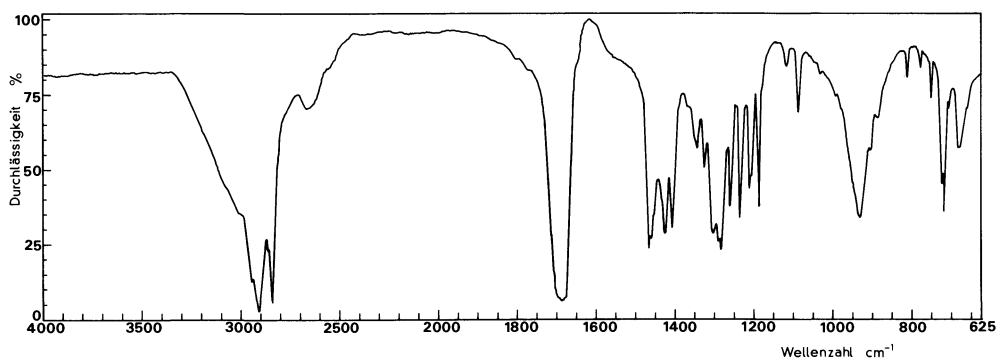
VI. *Vergleichslösung*: Je 10 mg Trimyristin und 10 mg Myristinsäure werden in 1,0 cm³ Chloroform gelöst, davon je 10 mm³ bandförmig (15 × 3 mm).

3. Die IR-Spektren des isolierten Trimyristins und der hergestellten Myristinsäure sind aufzunehmen, mit den abgebildeten Spektren und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Trimyristin (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm ⁻¹	Zuordnung	Schwingungsart
2950–2850	–CH ₃ und >CH ₂	CH-Streckschwingung
1730	>C=O (Ester)	C=O-Streckschwingung
1470–1455	–CH ₃ und >CH ₂	asym. CH-Beugeschwingung
1388	–CH ₃	sym. CH-Beugeschwingung
1271–1291	>CH ₂	CH ₂ -Kippschwingung
1250 oder 1198 } 1180, 1110 }	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{O}- \\ \end{array}$ (Ester)	$\left\{ \begin{array}{l} \text{CO-Streckschwingung und} \\ \text{C-CO-O-Gerüstschwingung} \end{array} \right.$
710	>CH ₂	Schaukelschwingung



IR-Spektrum von Myristinsäure (2 mg/200 mg Kaliumbromid).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3350–3000	–OH	freie OH-Streckschwingung
2900–2850	–CH ₃ und >CH_2	CH-Streckschwingung
2670	–OH	gebundene OH-Streckschwingung
1700	>C=O	C=O-Streckschwingung
1465	>CH_2	CH-Beugeschwingung
1430 oder 1410	–OH (dimer)	OH-Beugeschwingung
1285	–C–O– (dimer)	CO-Streckschwingung
1285	–OH (monomer)	OH-Beugeschwingung
930	typisch für die Dimerform von Carbonsäuren	OH – O – aus der Ebene
720	>CH_2	Schaukelschwingung

4. Die *Schmelzpunkte* sind zu bestimmen.

Weitere Aufgaben

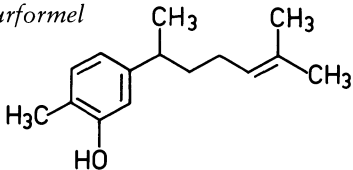
- Welche Fettsäuren in Triglyzeriden sind für die menschliche Ernährung wichtig? Geben Sie Nutzpflanzen mit fetten Ölen an.
- Geben Sie die Unterschiede zwischen fetten Ölen, ätherischen Ölen, Fetten und Wachsen an.
- In welcher Reihenfolge trennen sich die Bestandteile fetter Öle bei der Adsorptions-DC und bei der «Phasenumkehr»-DC?

2.53 Isolierung von Xanthorrhizol aus javanischer Gelbwurz

Prinzip: Gewinnung des etherischen Öls pulverisierter javanischer Gelbwurz (*Curcuma xanthorrhiza* ROXBURGH), anschließend säulenchromatographische Auftrennung des etherischen Öls an Kieselgel als stationäre Phase und Elutionsmittel mittlerer Polarität.

Gehalt: Eth. Öl-Gehalt, mind. 3,5 %, darin 15–20 % Xanthorrhizol.

Strukturformel



Xanthorrhizol

$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ (flüssig), MG 218, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -52,5^\circ$

Chemikalien

Curcuma xanthorrhizae rhizoma, pulv. (300), 50 g
 Petrolether (40–60°), 1200 cm^3
 Essigsäureethylester, 50 cm^3
 Dichlormethan, 100 cm^3
 Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 200 g
 DC-Schichten, Kieselgel F₂₅₄
 Thymol (Vergleich)

Reagenzien

- Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Reag. Nr. 3)
- Echtblausalzlösung (Reag. Nr. 15)

Geräte

Apparatur zur kontinuierlichen Wasserdampfdestillation
 Spitzkolben, HS 14,5; 10 cm^3 (1), 100 cm^3 (2)
 1 Erlenmeyerkolben, 5 cm^3
 Rundkolben, NS 29, 2000 cm^3 (1), 250 cm^3 (1)
 1 Chromatographiesäule mit Kühlmantel, $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 2$ cm

Allgemeine Geräte

Heizpilz, 2000 cm^3
 Fraktionssammler mit Zubehör
 Wärmeplatte
 Rotationsverdampfer
 DC-Grundausrüstung

Durchführung

- a) *Gewinnung des etherischen Öles*: 50 g gepulverte *Curcumae xanthorrhizae rhizoma* werden in einem 2000 cm³-Rundkolben mit 1500 cm³ Wasser versetzt und in der Apparatur zur kontinuierlichen Wasserdampfdestillation 6 h destilliert. Als Vorlage werden 1 cm³ Pentan eingesetzt. Das eth. Öl-Pentan-Gemisch wird wasserfrei abgelassen und das Pentan auf einer Wärmeplatte bei 50° verdampft.

Ausbeute: 2–3 g.

- b) *Säulenchromatographie*:

Allgemeine Durchführung: Siehe S. 11: «Säulenchromatographische Trennungen».

Chromatographiesäule: $l = 120$ cm, $\varnothing_i = 2$ cm, mit Kühlmantel.

Stationäre Phase: Kieselgel zur SC (0,063–0,2 mm), 200 g

Elutionsmittel: Petrolether (40–60°)-Essigsäureethylester (97 + 3), 1200 cm³

Aufgabemenge: 1,5 g eth. Öl.

Tropfgeschwindigkeit: 2–3 Tropfen/s.

Fraktion: 10–15 cm³.

Ausbeute: 150–250 mg.

Zeitbedarf: 2 Tage.

- c) *Dünnschicht-Chromatographie*

I. *Standardmethode*: Ja.

II. *Schicht*: Kieselgel F₂₅₄.

III. *Fließmittel*: Dichlormethan, KS, 10 cm.

IV. *Nachweis*:

- a) UV₂₅₄: Fluoreszenzmindernde Zonen markieren. (Xanthorrhizol, das etwas höher im Chromatogramm liegt als die Vergleichssubstanz Thymol, zeigt Fluoreszenzminderung).

- b) Besprühen mit einer 0,5proz. (G/V) wäßrigen Lösung von Echtblausalz (Reag. Nr. 15). (Die Xanthorrhizolzone färbt sich orange bis braungelb an; die Vergleichssubstanz Thymol färbt sich gelb- bis rotbraun an). Zur Detektion nichtphenolischer Inhaltsstoffe nachsprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure (Reag. Nr. 3) und anschließend 5–10 min auf 110°C erhitzen. (Die Xanthorrhizolzone färbt sich blauviolett an.)

V. *Untersuchungslösung*

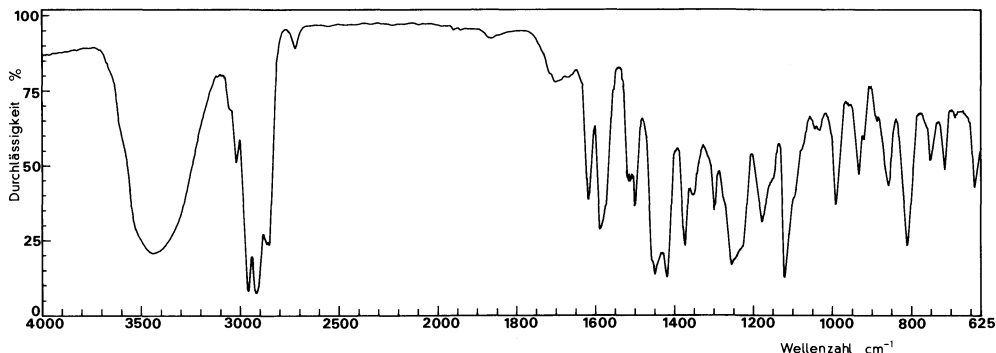
- a) 5 mm³ einer 0,5proz. (V/V) Lösung des etherischen Öls in Essigsäureethylester, punktförmig.

- b) Ab Fraktion 10 von jeder Fraktion 5 mm³, punktförmig.

VI. *Vergleichslösung*: 5 mm³ einer 0,2proz. (G/V) Lösung von Thymol werden punktförmig aufgetragen.

Auswertung

1. Das IR-Spektrum des isolierten Xanthorrhizols ist aufzunehmen, mit dem abgebildeten Spektrum und den wiedergegebenen Daten zu vergleichen.



IR-Spektrum von Xanthorrhizol (als Film zwischen zwei Kaliumbromidpreßlingen).

Wellenzahl cm^{-1}	Zuordnung	Schwingungsart
3410	–OH	OH-Streckschwingung
3090	–CH=C<	CH-Streckschwingung
3015	Aromat	CH-Streckschwingung
1665	–CH=C<	C=C-Streckschwingung
1610 und 151	Aromat	CC-Streckschwingung
1460–1420	–CH ₃ und CH ₂ <	asym. CH-Beugeschwingung und CH-Beugeschwingung
1375	–CH ₃	sym. CH-Beugeschwingung
1355	–CH=C<	CH-Beugeschwingung
1375–1355	–OH	asoz. OH-Beugeschwingung
1305	>CH ₂	Kipp- oder Drillschwingung
1250	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{OH} \end{array}$	CO-Streckschwingung
885 oder 864	ein isol. H am Aromat	CH-Beugeschwingung
814	2 benachbarte H am Aromat	CH-Beugeschwingung
720	>CH ₂	Schaukelschwingung

Weitere Aufgaben

- Welche weiteren Terpenphenole kommen in welchen Drogen vor?
- Leiten Sie die Biogenese der Sesquiterpene am Beispiel des Farnesols her.
- Zeigen Sie an der Strukturformel von Xanthorrhizol die Verknüpfungsstellen der Isopreneinheiten.
- Worauf beruht die Farbreaktion des Xanthorrhizols mit Echtblausalz?

3 Reagenzien-Verzeichnis

1. **Aluminiumchlorid-Reagenz:** Zum Flavonnachweis.
2,0 g Aluminiumchloridhexahydrat werden in 100 cm³ 5proz. (V/V) methanolischer Essigsäurelösung gelöst.
2. **Aminohippursäure:** Zum Zuckernachweis.
3,0 g Phthalsäure und 0,3 g Aminohippursäure werden in Alkohol (96 % V/V) gelöst und damit auf 100,0 cm³ aufgefüllt. Auch im UV₃₆₅-Licht Fluoreszenzfarben betrachten.
3. **Anisaldehyd-Schwefelsäure:** Zum Nachweis diverser Naturstoffe, insbesondere für Terpen-derivate geeignet.
0,5 cm³ Anisaldehyd werden mit 10 cm³ Eisessig, 85 cm³ Methanol und 5 cm³ konz. Schwefelsäure in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Nur begrenzt haltbar. Beim Auftreten einer Rot-Violett-färbung ist das Reagenz zu verwerfen.
4. **ANSA-Reagenz:** Fluoreszenzindikator für Lipide.
0,1 g 8-Anilo-1-Naphthalinsulfonsäure (Fa. Sigma) werden in 100 cm³ Wasser gelöst. Stabil bei 4°C in brauner Flasche für einige Wochen. Aufsprühen und Betrachten im langwelligen UV-Licht 365 nm. Nachweisempfindlichkeit 0,05 bis 0,2 µg.
5. **Antimon(III)-chlorid:** Für Terpenderivate (Mono- bis Polyterpene, Steroide).
25,0 g Antimon(III)-chlorid werden in 100 cm³ Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff gelöst. Nach dem Aufsprühen von 10 cm³ der Lösung erhitzt man 10 min auf 100–110 °C. Die Auswertung erfolgt im Tages- und im UV₃₆₅-Licht.
6. **Dianisidin:** Für Aldehyde und Ketone.
2,5 g 3,3'-Dimethoxybenzidin (o-Dianisidin) werden in 10 cm³ Eisessig gelöst und aufgesprüht. Die Farbdifferenzierung tritt ohne Erwärmen ein.
7. **Dichlorchinonchlorimid-Reagenz:** Zum Nachweis von Arbutin und Capsaicin.
100 mg 2,6-Dichlorchinonchlorimid werden in 10 cm³ Methanol gelöst. Nach dem Aufsprühen wird mit Ammoniak bedampft. Arbutin und Capsaicin färben sich blau.
8. **Dichlorfluoreszein:** Fluoreszenzindikator für Lipide (s. Reag. Nr. 4).
0,2 g 2',7'-Dichlorfluoreszein werden in 100 cm³ Ethanol gelöst und hiervon 10 cm³ auf die DC-Schicht gesprüht. Eine verbesserte Erkennung ergibt sich, wenn man die danach im Warmluftstrom getrocknete Schicht über Wasserdampf hält oder vorsichtig Wasser aufsprüht. Man betrachtet die Fluoreszenz im UV₃₆₅-Licht.
9. **Dinitrophenylhydrazin:** Für Keto- und Aldehydgruppen.
0,1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin wird in 100 cm³ Methanol gelöst und 1,0 cm³ Salzsäure, 36proz. zugesetzt. Die Verbindungen reagieren in der Kälte unter Gelborange-Färbung.
10. **DNPH-Eisessig-Salzsäure:** Für Valepotriate (Baldrian).
In einem Gemisch aus 40 cm³ Eisessig, 40 cm³ 25proz. (G/V) Salzsäure und 20 cm³ Methanol werden 0,2 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin gelöst; 10 cm³ aufsprühen. Chromogene Valepotriate reagieren bereits bei Zimmertemperatur, anschließend 5–10 min auf 105° erhitzen.
11. **Diphenylamin-Reagenz:** Zum Nachweis von Zuckern und Glykolipiden.
500 mg Diphenylamin werden in 25 cm³ Aceton gelöst, mit 2,5 cm³ o-Phosphorsäure, 85proz. (G/G) und mit 0,5 cm³ Anilin versetzt. Nach dem Aufsprühen wird 5–10 min auf 110° erhitzt. Anschließend im Tageslicht und im langwelligen UV-Licht betrachten.
12. **Diphenylboryloxyethylamin-Reagenz** (Naturstoff-Reag. nach NEU) zum Nachweis von α- und γ-Pyrenen.
100 mg Diphenylboryloxyethylamin werden in 10 cm³ Methanol gelöst. Nach dem Aufsprühen betrachtet man die Fluoreszenz im UV₃₆₅-Licht. Zur besseren Farbdifferenzierung und Verstärkung der Fluoreszenzen ist es vorteilhaft, mit einer Lösung von 0,5 ml Polyethylenglykol 400 in 10 cm³ Methanol nachzusprühen. In einigen Fällen erreichen die Fluoreszenzen erst nach etwa 30 min ihre volle Leuchtkraft.
13. **Dragendorff-Reag. (mod.)** (Natriumwismutjodid-Lösung; Natriumtetraiodobismutat (III)): Zum Nachweis N-haltiger Verbindungen, insbesondere von Alkaloiden.
StammLösung: Eine Mischung von 2,6 g basischem Wismutcarbonat, 7,0 g Natriumjodid und 25 cm³ Eisessig wird einige min zum Sieden erhitzt. Nach 12 h wird, falls erforderlich, durch einen Glassinterriegel filtriert. 20 cm³ Filtrat werden mit 80 cm³ Essigsäureethylester versetzt.

Sprühlösung: 2 cm³ Stammlösung werden mit 20 cm³ Eisessig und 40 cm³ Essigsäureethylester gemischt.

Diese Lösung wird auf das Chromatogramm gesprüht, anschließend vorsichtig unter Beobachtung eine 0,4proz. (G/V) Lösung von Schwefelsäure; hierdurch wird die Empfindlichkeit erhöht.

14. Dragendorff-Reagenz nach PUECH: Zum Nachweis von Alkaloiden.

Stammlösung: 1,7 g basisches Wismutnitrat und 20 g Weinsäure werden in 40,0 cm³ Wasser gelöst und mit einer Mischung von 16,0 g Kaliumjodid in 40,0 cm³ Wasser 1 h unter Rühren gemischt. Die Lösung wird anschließend filtriert. (Diese Stammlösung ist in brauner Flasche einige Tage haltbar.)

Sprühlösung: 5 cm³ Stammlösung werden mit 15 cm³ Wasser gemischt (jeweils frisch bereiten). Anschließend sprüht man mit einer Natriumnitrit-Lösung nach. Man löse hierzu jeweils frisch 1,0 g Natriumnitrit in 10 cm³ Wasser.

15. Echtblausalz B: Für Phenole und andere kupplungsfähige Verbindungen.

50 mg Echtblausalz B werden jeweils vor Gebrauch in 10 cm³ Wasser gelöst und aufgesprüht. Nach dem Abtrocknen der Schicht sprüht man 0,1 N-alkoholische oder wäßrige Alkalilauge nach.

16. Jod-Dampf: Universalreagenz.

In eine der üblichen dichtschießenden Entwicklungskammern zur DC werden auf den Boden 10–20 g Jodkristalle geschüttet. In die mit violettem Joddampf gefüllte Kammer stellt man dann die fließmittelfreien Chromatogramme für einige min ein. Nach dem Herausnehmen dampft das Jod von der Schicht schneller als von den braunen Substanzzonen ab. Zur Fixierung dieser Zonen kann man Stärkelösung (Reag. Nr. 24) nachsprühen und erhält so blaue Flecke.

17. Jod-Salzsäure: Für Xanthinderivate.

Lösung I: 1,0 g Kaliumjodid und 2,0 g Jod werden in 100 cm³ Ethanol, 96proz. gelöst.

Lösung II: 5 cm³ Salzsäure, 25proz. werden mit 5 cm³ Ethanol, 96proz. gemischt.

Vorgang: Zunächst sprüht man 10 cm³ von Lösung I auf, wartet 1–2 min und sprüht dann mit 5–10 cm³ Lösung II nach: Es erscheinen blauviolette bis rotbraune Zonen.

18. Kaliumhydroxidlösung, 10proz. methanolische:

10 g Kaliumhydroxid werden in 30 cm³ Wasser gelöst und mit Methanol zu 100 cm³ verdünnt.

19. Kaliumpermanganat-Schwefelsäure: Aggressives Universalreagenz.

0,5 g Kaliumpermanganat werden vorsichtig in 15 cm³ konz. Schwefelsäure gelöst (Explosionsgefahr, Manganheptoxid). Zum Fenchon-Nachweis sprüht man zunächst Molybdato-phosphorsäure (Reag. Nr. 21) auf, erhitzt 10 min auf 100°C und sprüht auf die heiße Schicht 4–8 cm³ Kaliumpermanganat-Schwefelsäure und erwärmt nochmals 5 min auf 100°C. Erst danach ergeben das schwer nachweisbare Fenchon und der Campher eine Blaufärbung.

20. Ninhydrin-Reagenz zum Nachweis von Aminosäuren und Aminen.

30 mg Ninhydrin werden in 10 cm³ n-Butanol gelöst und mit 0,3 cm³ Eisessig versetzt. Nach dem Aufsprühen wird unter Beobachtung 5–10 min auf 110°C erhitzt.

21. Molybdato-phosphorsäure: Universalreagenz; für reduzierende Verbindungen u. a. Monobis Polyterpenderivate und ungesättigte Glyceride.

10,0 g Molybdato-phosphorsäure werden in 100 cm³ Ethanol gelöst und hiervon 10 cm³ aufgesprüht. Man erhitzt 5–10 min auf 105–110°C und erhält blaue Zonen auf gelbem Grund. Beim Einstellen des Chromatogramms in eine Kammer mit Ammoniakdämpfen wird der gelbe Untergrund der Schicht weiß.

22. Phenolphthalein-Lösung: Indikator bei Säure-Base-Titrationen.

100 mg Phenolphthalein werden in 80 cm³ 80proz. (V/V) Ethanol gelöst und mit Wasser auf 100 cm³ aufgefüllt.

23. Phenylendiamin: Zum Nachweis von Flechtensäuren.

10 mg p-Phenylendiamin werden in 10 cm³ Ethanol jeweils frisch gelöst. Neben der Betrachtung im Tageslicht erfolgt eine Auswertung der Fluoreszenz im UV₃₆₅-Licht.

24. Stärkelösung: Zur Fixierung jodhaltiger Zonen bei der DC.

2,0 g lösliche Stärke werden mit 5 cm³ Wasser angerieben und in 45 cm³ siedendes Wasser eingetragen. Das Gemisch wird 2 min gekocht und ist nach dem Erkalten gebrauchsfertig.

4 Sachregister

A

Acaciae gummi 57
 Acacia senegal 57
 Adsorptions-Chromatographie, Grundregeln der 9
 Adsorptionsverfahren, chrom. 9
 Aescin 42
 –, IR-Spektrum 44
 Aesculin 45
 –, IR-Spektrum 47
 Aesculus hippocastanum 42, 45
 Aktivitätsstufe 9
 Aleuritinsäure 49
 –, IR-Spektrum 50
 Allyltetramethoxybenzol 127
 –, IR-Spektrum 131
 Aloe ferox 63
 Aloin A und B 63
 Aluminiumchlorid-Reagenz 173
 Aminosäure, Gelatine 98
 Aminosäure-Nachweis 174
 Aminohippursäure 173
 Ammeos visnagae fructus 111
 Ammi visnaga 110
 Ammi visnaga-Früchte 110, 114
 Amygdalin 51
 –, IR-Spektrum 53
 Anethol 54
 –, IR-Spektrum 56
 Anisaldehyd-Schwefelsäure 173
 Ansa-Reagenz 173
 Anthocyanglykoside 122
 Antimon (III)-chlorid 173
 Apiol 127
 Arabinose 57
 –, IR-Spektrum 59
 Arabisches Gummi 57
 Arbutin 59
 –, IR-Spektrum 62
 Arctostaphylos uvae ursi 59
 Artemisia cina 151
 Atropa belladonna 104
 Auftragegerät, DC 22
 Austauschverfahren 11
 Auswertung, visuelle, DC 27
 Azulen 127

B

Baldrianwurzel, pakistanische 84
 Barbaloin 63
 –, IR-Spektrum 64
 Bärentraubenblätter 59
 Barringtonenol-C 42
 Belladonna-Blätter 104
 Benzaldehyd 53
 Bitterstoff 73

Blausäureglykosid 51

Brucin 161

–, IR-Spektrum 164

C

Camellia sinensis 76
 Capsanthin 65
 –, IR-Spektrum 67
 Capsi fructus 66
 Capsicum annum 65
 Cardui benedicti herba 73
 Carminsäure 68
 –, IR-Spektrum 70
 Carotinoide 65
 Carum carvi 71
 Carvi fructus 71
 Carvon 71
 –, IR-Spektrum 72
 Cetrarsäure 92
 Chamazulen 127
 Chamomilla recutita 124
 Chromatographie-Arten 8
 Cichorium intybus 107
 Citrus sinensis 102
 Cnicin 73
 –, IR-Spektrum 75
 Cnicus benedictus 73
 Cochenille 68
 Cocionella grisea 68
 Coffein 76
 –, IR-Spektrum 77
 Colchicin 78
 –, IR-Spektrum 80
 –, UV-Spektrum 33
 Colchici semen 79
 Colchicum autumnale 78
 Cubebae fructus 82
 –, IR-Spektrum 134
 Crataegolsäure 131
 Cubebin 81
 –, IR-Spektrum 83
 Cumarine 45
 Curcuma xanthorrhiza 167

D

Dactylopius coccus 68
 DC, Definition und Prinzip 17
 –, Standardbedingungen 18
 – – Schicht 18,20
 – –, imprägnieren 20
 DCCC 7
 Depsidone 145
 Detektion 14
 Dianisidin 173
 Dichlorchinonchlorimid-Reagenz 173

Dichlorfluoreszein 173
 Didrovaltrat 84
 –, IR-Spektrum 86
 Digestion 4
 Diphenylamin-Reagenz 173
 Diphenylboryloxyethylamin-Reagenz 173
 Dinitrophenylhydrazin 173
 DNPH-Eisessig-Salzsäure 173
 Dokumentation, DC 27
 Dokumentation der Chromatogramme 26
 Dragendorff-Reagenz 173
 – nach Puech 174
 Dreiecks-Schema 10
 Dünnschicht-Chromatographie (DC) 17

E

Echtblausalz B 174
 eluotrope Reihe 10
 Elutionswirkung 10
 Entwicklung 23
 Enzymaktivität 141
 Ephedrakraut 87
 Ephedrae herba 87
 Ephedra sinica 87
 Ephedrin 87
 Ephedrinhydrochlorid, IR-Spektrum 89
 EP-Reagenz 127
 Eugenol 90
 –, IR-Spektrum 91
 Erucae semen 154

F

Fenchelfrüchte 54
 Fenchon 54
 –, IR-Spektrum 56
 Fertigplatten 20
 Filipendula ulmaria 159
 Flavonnachweis 173
 Flavonoid 102, 148, 159
 Flechte 92
 Fließmittel 21
 Fluoreszenzanregung 24
 Fluoreszenzindikator 18, 173
 Foeniculum vulgare 54
 Fraktionssammler 13
 Fraxin 45
 –, IR-Spektrum 48
 Fumarprotocetrarsäure 92
 –, IR-Spektrum 94
 Furanocumarine 110

G

Galaktose 57
 Gallae 95
 Galläpfel 95
 Gallusgerbstoff 95
 Gaschromatographie (GC) 16
 Gase zur Extraktion 5
 Gelatine 97

Gelbwurz, javanische 167
 Gegenstromverteilung 7
 Gewürznelken 90, 131
 Glycyrrhetinsäure 99
 –, IR-Spektrum 101
 Glycyrrhiza glabra 99, 120
 Glycyrrhizin 99
 Gradientelution 13
 Grundregeln der Adsorptions-Chromatographie 9
 Gummi arabicum 57

H

Hauhechelwurzel 135
 Heizplatte 26
 Herbstzeitlosensamen 78
 Hesperidin 102
 –, IR-Spektrum 104
 Hibisci flos 123
 Hippocastani cortex 45
 – semen 42
 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) 15
 HP-UVIS 24
 Hydroxyoleanolsäure 131
 Hyoscyamin 104
 –, IR-Spektrum 106

I

imprägnieren, DC-Schicht 20
 Infrarot-Spektroskopie (IR) 34
 Instrumentation und Meßmethodik, IR 35
 Inulin 107
 –, IR-Spektrum 110

J

Jod-Dampf 174
 Jod-Salzsäure 174

K

Kaliumpermanganat-Schwefelsäure 174
 Kamillenblüten 124
 Kammersättigung 21
 Kammer zur DC 21
 Kap-Aloe 63
 Kardobenediktenkraut 73
 Khellin 110
 –, IR-Spektrum 112
 Khellinin 114
 –, IR-Spektrum 116
 Khellolglucosid 114
 Kieselgele zur DC 18
 Kohlendioxyd 5
 Kollagen 97
 Kryptoaescin 42
 Kubebenpfeffer 81
 Kümmel 71

L

Labiatergerbstoffe 145
 Lacca 49
 Lakshadia indica 49
 Lavendelblüten 116
 Lavendula angustifolia 116
 Lichen islandicus 92
 Lignanderivat 81
 Linalool 116
 –, IR-Spektrum 118
 Linalylacetat 116
 –, IR-Spektrum 119
 Liquiritiae radix 99
 Liquiritin 120
 –, IR-Spektrum 121
 Lösungsmittel 10

M

Malva arborea 123
 Malvinchlorid 122
 Matricin 124
 –, IR-Spektrum 126
 Maiskeimöl 156
 Malva sylvestris 122
 Malvenblüten 122
 Mandeln, bittere 51
 Mandelsäurenitril 51
 Massenspektrometrie 38
 Mazeration 4
 Mazola-Öl 157
 Mehrzweckschablone 22
 Melissa officinalis 145
 Melissenblätter 145
 Mikrosublimation 28, 32
 Mikrotechnik, IR 36
 Molybdätophosphorsäure 174
 Moos, isländisches 92
 Myristica fragrans 165
 Myristicin 127
 –, IR-Spektrum 129
 Myristinsäure 165
 –, IR-Spektrum 166
 Muskatnuß 165

N

Nachweis, DC 23
 Natriumwismutjodid-Lösung 173
 Naturstoff-Reagenz 173
 Nelken 90
 Newtonsche's Verteilungsgesetz 6
 Ninhydrin-Reagenz 174
 NMR-Spektroskopie 37

O

Oleanolsäure 131
 –, IR-Spektrum 134
 Onocerin 135
 Onocol 135
 –, IR-Spektrum 136

Ononis spinosa 135
 Orangenschalen 102
 Ouabin 137
 –, IR-Spektrum 139

P

Paeonia officinalis 139
 Paeoniae radix 140
 Paeoniflorin 139
 –, IR-Spektrum 141
 Paprika 65
 Pepsin 141
 Perkolation 4
 Petersilienapiol, IR-Spektrum 130
 Petersilienfrüchte 127
 Petroselinum hortense 127
 Pfeffer, schwarzer 143
 Pfingstrosenwurzel 139
 Phase, mobile 9
 –, stationäre 9
 Phasenumkehr-Methode 11
 Phenolphthalein-Lösung 174
 Phenylendiamin 174
 Piper cubeba 81
 – nigrum 143
 Piperin 143
 –, IR-Spektrum 144
 Piperis nigri fructus 143
 Polarität einer Verbindung 21
 Polysaccharid 107
 Polysacchariddroge 57
 Proazulen 124
 Prunus amygdalus 51
 Protoaescigenin 42
 Protocetrarsäure 92

Q

Quercetinderivat 159
 Quercetinglykosid 148
 Quercus infectoria 95

R

Reagenzien 171
 R_f-Werte 26
 Rhamnose 57
 Rosmarinsäure 145
 –, IR-Spektrum 147
 Roßkastanienrinde 45
 Roßkastaniensamen 42
 Rotationsverdampfer 7
 Ruta graveolens 148
 Ruta herba 148
 Rutin 148
 –, IR-Spektrum 150

S

Säulen-Chromatographie 11, 12
 Santonin 151
 α-Santonin, IR-Spektrum 153

Saponine 42
 Schellack 49
 Schweinemagen 141
 Schweineschwarte 97
 Senf, weißer 153
 Sesquiterpenlacton 73, 124, 151
 Sichtbarmachung, DC 25
 Sinalbin 153
 –, IR-Spektrum 155
 Sinapis alba 153
 β -Sitosterin 156
 –, IR-Spektrum 158
 Sitosterol 156
 S-Kammer 21
 Soxhlet-Extraktion 5
 Spectro-Tip 36
 Spektralphotometer 33
 Spektroskopie (200–800 nm) 32
 Spierblumen 159
 Spierstaude 159
 Spiraeae flos 159
 Spiraeosid 159
 –, IR-Spektrum 161
 Spray-Gun 25
 Sprühkabine, DC 26
 Stärkelösung 175
 Sterin 156
 g-Strophanthin 137
 Strophanthus 137
 Strychnin 161
 –, IR-Spektrum 163
 Strychnos nux-vomica 161
 Strychnos-Samen 161
 Süßholzwurzel 99, 120
 Syzygium aromaticum 90, 131

T

Tachardia lacca 49
 Tannin 95
 –, IR-Spektrum 96

TAS-Ofen 28
 TAS-Verfahren 28
 Tee, schwarzer 76
 Terpenglykosid 139
 Terpenketon 54, 71
 Theae folium 76
 Thermoplatte 26
 Transfer, DC-IR 36
 Treibmittel, TAS 31
 Triglycerid 165
 Trimyristin 165
 –, IR-Spektrum 166
 Triterpenderivate 131
 Tropfen-Gegenstromchromatographie 7

U

Untersuchungslösung zur DC 23
 UV-Lampen 24

V

Valepotriate 84
 Valeriana wallichii 84
 Vergleichslösung zur DC 23
 Verteilungsverfahren 6, 11
 Visnagin 110
 –, IR-Spektrum 113

W

Weinrautenkraut 148
 Wick-Stick 36

X

Xanthorrhizol 167
 –, IR-Spektrum 168

Z

Zichorienwurzel 107
 Zitwerblüten 151
 Zuckernachweis 173