

QUANTITATIVE BESTIMMUNG EINES QUATERNÄREN ALKALOIDES NACH DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG

P. HAEFELFINGER

Kontrollabteilung der Firma Hoffmann-La Roche & Cie., Basel (Schweiz)

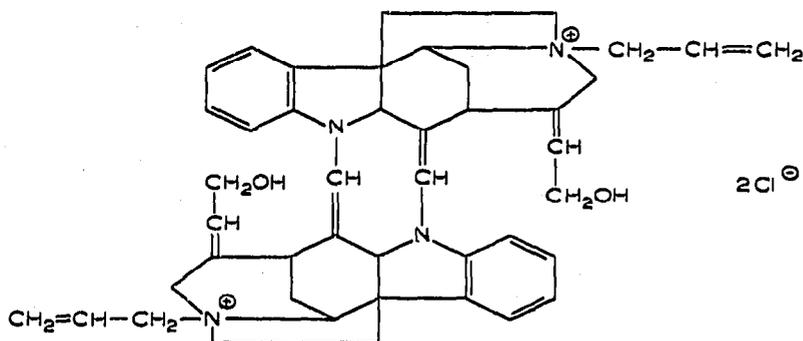
SUMMARY

Quantitative determination of a quaternary alkaloid after separation by thin-layer chromatography

A method for the quantitative determination of diallyl-bis-nortoxiferine-dichloride has been worked out. The quaternary alkaloid is first separated by thin-layer chromatography. The spots are localized under shortwave U.V.-light. The alkaloid is determined by means of a dye complex with bromothymol blue, which is extracted with an organic solvent. The method has a good reproducibility. It seems that this method of extraction is also suitable for other cases where it is difficult to extract a substance from the adsorbent after thin-layer chromatography. It was possible to show that the optical rotation is more specific for the determination of the unchanged quaternary alkaloid than the U.V.-absorption.

ALLGEMEINES

Die Analytik des quaternären Alkaloides Diallyl-bis-nortoxiferin-dichlorid bietet erhebliche Schwierigkeiten.



Ursprünglich wurde die U.V.-spektroskopische Gehaltsbestimmung als zuverlässiges Kriterium für unzersetzte Wirksubstanz angesehen. Zusätzlich wurden Papierchromatogramme durchgeführt, die jedoch schwierig zu interpretieren waren, da Doppelflecke auftraten. Aus diesem Grunde wurde versucht, die Papierchromatographie durch die Dünnschichtchromatographie zu ersetzen. Mit Kieselgel-Platten

ist es uns gelungen, die bekannten Verunreinigungen ohne Artefakt-Bildung abzutrennen.

Diallyl-bis-nortoxiferin-dichlorid wird als wässrige Ampullenlösung* verwendet. Zur Prüfung der Haltbarkeit wurden Ampullen mit 0.5%iger Lösung längere Zeit bei erhöhter Temperatur gelagert. Dabei ergab sich eine Diskrepanz zwischen dem spektroskopisch bestimmten Gehalt und der dünn-schichtchromatographisch abgeschätzten Menge der Umwandlungsprodukte. Im Dünnschichtchromatogramm wurden 5–10% veränderte Wirksubstanz gefunden, während der spektroskopisch bestimmte Gehalt nahezu konstant blieb. Bei der Kontrolle der Reinsubstanz sind solche Unstimmigkeiten nicht aufgetreten.

Um unsere Befunde besser belegen zu können, versuchten wir die Dünnschichtchromatographie quantitativ auszuwerten. Eine Ausmessung der Fleckengrösse im kurzwelligen U.V.-Licht kam wegen der geringen Genauigkeit dieser Methode nicht in Frage¹. Durch Besprühen mit Cersulfat sind die Substanzen auf dem Chromatogramm anfärbbar, die Farben verblassen jedoch rasch, sodass eine Auswertung dieser Flecke nicht möglich war. Wir haben uns darum entschlossen, die Zone mit Diallyl-bis-nortoxiferin-dichlorid von der Platte abzukratzen und die Substanz vom Kieselgel zu extrahieren. Das Alkaloid weist eine hohe U.V.-Absorption auf, sodass der Gehalt spektroskopisch bestimmbar schien. Leider war es jedoch im günstigsten Falle möglich 40% der aufgetragenen Substanzmenge vom Kieselgel zu eluieren. Bei der U.V.-Messung der Kieselgel-Extrakte besteht zudem die Gefahr, dass störende Stoffe eingeschleppt werden².

Organische Basen bilden bekanntlich mit sauren Farbstoffen Komplexe, die, zum Unterschied von den Farbstoffen selbst, mit bestimmten organischen Lösungsmitteln ausgeschüttelt und so vom überschüssigen Farbstoff abgetrennt werden können^{3,4}. Bei Kombinationspräparaten von tertiären Amininen haben wir nach der dünn-schichtchromatographischen Trennung dieses Verfahren erfolgreich angewendet. Die Vorteile der Methode sind einerseits die grosse Empfindlichkeit, andererseits stören Verunreinigungen des Kieselgels sowie Spuren des Fließmittels wesentlich weniger als bei der U.V.-Spektroskopie.

Für unser Problem der quantitativen Auswertung des Dünnschichtchromatogrammes eines quaternären Alkaloides mussten die üblichen Bestimmungsmethoden etwas modifiziert werden. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass nach der dünn-schichtchromatographischen Abtrennung die Zone mit Diallyl-bis-nortoxiferin abgekratzt und bei einem pH 9.8 mit Bromthymolblau das entsprechende Farbsalz gebildet wird. Dieser Komplex wird mit Chloroform ausgeschüttelt und die Lösung kolorimetriert. Wie die Versuche zeigen, ist die Elution bei diesem Verfahren quantitativ. Es ist uns so mit einfachen Mitteln gelungen, das Extraktionsproblem zu lösen.

EXPERIMENTELLER TEIL**

Verwendete Geräte

Zeiss Spektralphotometer PMQ 2

* Alloferin "Roche".

** Die experimentelle Bearbeitung des Problems wurde von Herrn B. SALADIN durchgeführt.

Ultraviolett-Strahlungsquelle zum Nachweis der Flecken auf den Dünnschichtplatten: Universal U.V.-Lampe der Firma Camag
 Streichgerät der Desaga zur Herstellung der Sorptionsschichten
 Glastrennkammern der Firma Shandon Scientific für 20 cm Platten
 10 μ l Pipetten (geeicht) nach Dr. BARROLIER

Reagentien und Lösungen

Kieselgel GF (Merck)

Formamid p.a. (Merck)

Pyridin p.a. (Merck)

Ammoniak 1%

Chloroform p.a. (Merck)

Bromthymolblau-Lösung: 50 mg Bromthymolblau (Merck) werden in 1 ml 1 M NaOH gelöst, mit Wasser wird auf 250 ml verdünnt.

Puffer pH 9.8: 0,5 M Na_2HPO_4 -Lösung wird mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 9.8 eingestellt.

Sprühreagenz zum Anfärben der Chromatogramme (nur für qualitative Versuche): 0.1 g Cer(IV)-sulfat wird in 4 ml Wasser aufgeschlämmt. Nach der Zugabe von 1 g Trichloressigsäure wird aufgeköcht und langsam tropfenweise Schwefelsäure (konz.) zugegeben, bis die Lösung klar geworden ist. Die Flecken werden sofort nach dem Besprühen sichtbar, Erwärmen ist nicht nötig. Nach kurzer Zeit verblassen die Flecken.

Durchführung der Versuche

(a) *Dünnschichtchromatographische Trennung.* Es werden 20 cm Kieselgelplatten

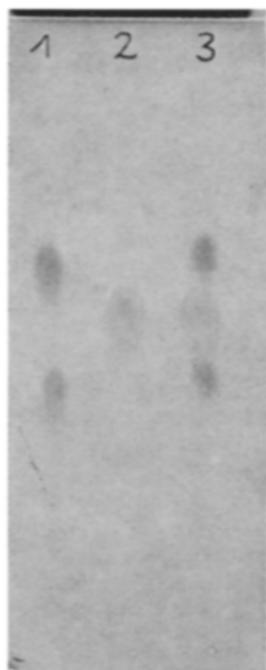


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm von Diallyl-bis-nortoxiferin. 1 = Zersetzungsprodukte: Wieland-Gumlich-Aldehyd-chlorallylat und Caracurin-V-bis-chlorallylat; 2 = Diallyl-bis-nortoxiferin-dichlorid; 3 = Gemisch von 1 + 2.

GF mit einer Schichtdicke von $250\ \mu$ verwendet, die nach den üblichen Verfahren hergestellt und aktiviert worden sind. Zur kolorimetrischen Gehaltsbestimmung benötigt man $200\ \mu\text{g}$ Diallyl-bis-nortoxiferin-dichlorid. Von der 0.5% igen Ampullenlösung werden 2 Punkte zu je $20\ \mu\text{l}$ aufgetragen. Um möglichst kleine Flecke zu erhalten, haben wir vorgezogen, zweimal $10\ \mu\text{l}$ mit einer geeichten Pipette $2\ \text{cm}$ vom unteren Plattenrand aufzubringen. Als Fließmittel hat sich am besten folgende Mischung bewährt: 1% NH_3 -Formamid-Pyridin ($25:8:1$).

Zur Kammersättigung wird der Trog mit Filterpapier ausgekleidet und nach *ca.* $0.5\ \text{h}$ verwendet. Die Trennstrecke beträgt 15 – $18\ \text{cm}$. Nach dem Abdampfen des Fließmittelmisches mit einem kalten Luftstrom wird die Zone von Diallyl-bis-nortoxiferin im kurzwelligen U.V.-Licht markiert, anschliessend abgekratzt und quantitativ in einen $100\ \text{ml}$ Scheidetrichter gebracht.

Die dünnschichtchromatographische Abtrennung der Zersetzungsprodukte von Diallyl-bis-nortoxiferin wird in Fig. 1 gezeigt, wo einerseits die Substanzen einzeln und andererseits als Gemisch aufgetragen sind.

(b) *Kolorimetrische Bestimmung.* Zum abgekratztem Kieselgel werden $5\ \text{ml}$ Bromthymolblau-Lösung, $7.5\ \text{ml}$ Puffer pH 9.8 und $10\ \text{ml}$ Chloroform gegeben. Nach $1\ \text{Min.}$ Schütteln trennt man die Chloroform-Schicht ab und bringt sie in einen $25\ \text{ml}$ Messkolben. Das Ausschütteln wird einmal mit $5\ \text{ml}$ und dreimal mit $3\ \text{ml}$ Chloroform wiederholt. Es ist darauf zu achten, dass von der wässrigen Schicht so wenig als möglich mitgerissen wird. Nach dem Auffüllen zur Marke mit Chloroform wird ein Teil der Lösung zentrifugiert und anschliessend die Extinktion gegen reines Chloroform bei $420\ \text{m}\mu$ gemessen. Kontrollbestimmungen haben ergeben, dass unter den gewählten Bedingungen der Kieselgelblindwert vernachlässigbar klein ist. Im Bereich von 100 – $200\ \mu\text{g}$ Alkaloid pro $25\ \text{ml}$ Endlösung verläuft die Eichkurve linear. Zur Auswertung der Versuche wird eine Testlösung von Diallyl-bis-nortoxiferin-dichlorid mitgeführt.

ERGEBNISSE

(a) *Vergleich der direkten Gehaltsbestimmung mit der Bestimmung nach der dünnschichtchromatographischen Trennung*

Um Anhaltspunkte über die Vollständigkeit der Elution des Alkaloids vom Kieselgel zu erhalten, wurde Diallyl-bis-nortoxiferin-dichlorid einerseits direkt mit Bromthymolblau andererseits nach der dünnschichtchromatographischen Trennung bestimmt. Die direkte Bestimmung ergab durchschnittlich *ca.* 2% höhere Werte als die dünnschichtchromatographisch-kolorimetrische Methode. Die statistische Auswertung der Zahlen zeigt jedoch, dass dieser Unterschied nicht signifikant ist. In der Differenz von 2% ist zudem noch der Auftragsfehler enthalten. Der Unterschied zwischen den beiden Methoden spielt für die Bestimmungen in den Ampullenlösungen keine Rolle, da jeweils ein Standard mitgeführt wurde.

Die Versuche beweisen, dass nach diesem Verfahren Diallyl-bis-nortoxiferin quantitativ von Kieselgel eluiert wird.

(b) *Genauigkeit der Methoden*

Um die Genauigkeit der Methode zu prüfen, wurden von der gleichen Ampullen-

TABELLE I

BESTIMMUNG VON DIALLYL-BIS-NORTOXIFERIN-DICHLORID IN AMPULLEN

Ampulle	Gehalt an Diallyl-bis-nortoxiferin-dichlorid pro ml		
	Einzelwerte (mg)	Mittelwert (mg)	Relative Standardabweichung (%)
1	4.80	4.84	± 0.7
	4.83		
	4.86		
	4.87		
2	5.00	5.03	± 0.6
	5.02		
	5.04		
	5.07		
3	4.56	4.57	± 0.1
	4.57		
	4.57		
4	4.90	4.96	± 1.2
	4.95		
	5.02		

lösung mehrere voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. In der Tabelle I haben wir von vier verschiedenen Ampullen die gefundenen Werte zusammengestellt, die Ergebnisse sind nach der Grösse geordnet.

Aus einer grossen Anzahl von Daten, die mit mehr als 20 Ampullen erhalten worden sind, haben wir die relative Standardabweichung berechnet. Dabei sind aus der gleichen Ampulle Doppel- bis Vierfachbestimmungen durchgeführt worden. Als relative Standardabweichung wurde ein Wert von $\pm 0.7\%$ gefunden. Die Methode weist also eine sehr gute Reproduzierbarkeit auf. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass nur bei sorgfältigem Arbeiten eine so kleine relative Standardabweichung erreicht wird.

Für unsere weiteren Versuche war die gute Reproduzierbarkeit von grosser Wichtigkeit, da wir nur so genaue Aussagen über den tatsächlichen Gehalt an unveränderter Wirksubstanz in den Ampullenlösungen machen konnten.

(c) Vergleich von verschiedenen Methoden

Mit der neu entwickelten Methode war es möglich pro Tag ca. 8 Bestimmungen durchzuführen. Für grosse Versuchsserien kam daher dieses Verfahren nicht in Frage. Diallyl-bis-nortoxiferin weist eine hohe molare Drehung auf. Wir vermuteten, dass die polarimetrische Bestimmung eine spezifischere Methode darstellt als die Messung der U.V.-Absorption. Um diese Behauptung belegen zu können, war es notwendig, die dünnschichtchromatographisch-kolorimetrisch bestimmten mit polarimetrisch, resp. U.V.-spektroskopisch erhaltenen Werten zu vergleichen. Zu diesem Zwecke wurden Ampullen sofort nach der Herstellung und nach 3 Monaten Lagerung bei

TABELLE II

VERGLEICH DER DREI BESTIMMUNGSMETHODEN

	Gehalt an Diallyl-bis-nortoxiferin-dichlorid pro ml		
	U.V.- Bestimmung (mg)	Polarimetrische Bestimmung (mg)	DSC-kolori- metrische Bestimmung (mg)
<i>Ampullen frisch hergestellt</i>			
Muster 1	5.09	5.07	5.07
Muster 2	5.10	5.08	5.11
<i>Ampullen nach 3 Monaten Lagerung bei 45°</i>			
Muster 1	5.01	4.77	4.71
Muster 2	4.93	4.75	4.75
Muster 3	4.96	4.81	4.75

45° analysiert. Aus der gleichen Ampulle wurde der Gehalt nach den drei verschiedenen Methoden bestimmt.

In der Tabelle II sind die Werte von verschiedenen Mustern zusammengestellt.

Bei den Ampullen, die direkt nach der Herstellung analysiert wurden, ergeben die drei Methoden den gleichen Gehalt. Es treten keine signifikanten Unterschiede auf. In diesen Mustern sind dünnschichtchromatographisch keine Zersetzungsprodukte nachweisbar. Die 3 Monate bei 45° gelagerten Muster enthalten dagegen nach dem Dünnschichtchromatogramm ca. 5–10% veränderte Wirksubstanz. Aufgrund der U.V.-spektroskopischen Gehaltsbestimmung würde man so nur mit ca. 2–3% Um-

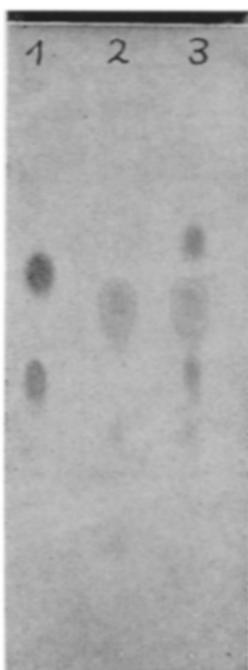


Fig. 2. Dünnschichtchromatogramm von gelagerter Diallyl-bis-nortoxiferin. Ampullenlösung. 1 = Zersetzungsprodukte von Diallyl-bis-nortoxiferin; 2 = Gelagerte Ampullenlösung; 3 = Gelagerte Ampullenlösung mit Zusatz der Zersetzungsprodukte.

wandlungsprodukten rechnen. Sowohl die polarimetrische als auch die dünnschicht-chromatographisch-kolorimetrische Methode ergeben einen Gehaltsabfall von 6–7%. Die Versuche beweisen also, dass die U.V.-spektroskopische Gehaltsbestimmung weniger spezifisch ist als die polarimetrische resp. die neu entwickelte Methode.

In den bei erhöhter Temperatur gelagerten Ampullen konnte im Dünnschicht-chromatogramm neben den Zersetzungsprodukten der Reinsubstanz ein unbekannter Fleck nachgewiesen werden. Aufgrund unserer Befunde wurde die unbekannte Substanz isoliert und identifiziert. Es handelt sich dabei nicht um ein eigentliches Zersetzungsprodukt, sondern um eine reversible Veränderung von Diallyl-bis-nortoxiferin, die unter bestimmten Versuchsbedingungen wieder rückgängig gemacht werden kann. Es zeigte sich, dass in den Ampullenlösungen von Diallyl-bis-nortoxiferindichlorid bei der Lagerung hauptsächlich dieses Umwandlungsprodukt enthalten ist (Fig. 2).

DISKUSSION

Die vorliegenden Versuche zeigten, dass Diallyl-bis-nortoxiferin nicht ohne weiteres vom Kieselgel eluiert werden kann. Es war daher erstaunlich, dass mit Hilfe des Bromthymolblau-Farbkomplexes eine quantitative Extraktion möglich war. Es soll versucht werden, für diese Erscheinung eine Erklärung zu geben.

Bei der direkten Extraktion des quaternären Alkaloides vom Kieselgel und der U.V.-spektroskopischen Gehaltsbestimmung hat man es mit dem System Kieselgel-wässrige Phase zu tun. Diallyl-bis-nortoxiferin wird vom Kieselgel so stark adsorbiert, dass nur ein kleiner Teil in der wässrigen Phase enthalten ist. Die Verteilungskonstante

$$k_{K/W} = \frac{\text{Diallyl-bis-nortoxiferin pro g Kieselgel}}{\text{Diallyl-bis-nortoxiferin pro g wässrige Phase}}$$

ist relativ gross, wir vermuten *ca.* 50–100. Auch durch mehrmaliges Ausschütteln ist es nicht möglich, die Base vom Kieselgel quantitativ zu lösen. Bei der Bildung des Farbkomplexes hat man es mit folgendem System zu tun: Kieselgel-wässrige Phase-Chloroform.

Diallyl-bis-nortoxiferin verteilt sich mit dem Verteilungskoeffizient $k_{K/W}$ zwischen Kieselgel und wässriger Phase. Wir nehmen dabei an, dass Chloroform dieses Gleichgewicht nicht beeinflusst. In der wässrigen Phase bildet sich mit Bromthymolblau der Farbkomplex, der sich zwischen Kieselgel, wässriger Phase und Chloroform verteilt. Unsere Versuche haben nun gezeigt, dass der Farbkomplex hauptsächlich in der Chloroformschicht vorliegt. In der wässrigen Phase wird Diallyl-bis-nortoxiferin einerseits durch die Komplexbildung, andererseits durch die Verteilung dieses Komplexes zwischen Chloroform und der wässrigen Phase verbraucht. Zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Kieselgel und wässriger Phase mit der Konstanten $k_{K/W}$, das ja weiterhin aufrecht erhalten wird, muss vom Kieselgel adsorbiertes Diallyl-bis-nortoxiferin nachgeliefert werden. Es gelingt so durch die Komplexbildung und Extraktion des Komplexes eine quantitative Ablösung des Alkaloides vom Kieselgel zu erzielen.

Verschiedentlich stösst man in der Literatur auf Arbeiten, die sich mit der Elution von Substanzen vom Sorptionsmittel nach der Dünnschichtchromatographie

beschäftigen⁵. Wir sind überzeugt, dass unser Prinzip auch auf andere Probleme anwendbar ist. Mit der am Kieselgel adsorbierten Substanz wird in einem flüssigen System eine Reaktion durchgeführt. Dadurch wird das Verteilungsgleichgewicht der Substanz zwischen Kieselgel-flüssiger Phase gestört und die Substanz wird desorbiert. Neben dem Vorteil, dass die Ablösung quantitativ verläuft, treten auch störende Einflüsse des Kieselgels weniger in Erscheinung.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der quantitativen Dünnschichtchromatographie von Diallyl-bis-nortoxiferin bereitet die Elution der Substanz vom Kieselgel Schwierigkeiten. Durch Bildung des Farbkomplexes mit Bromthymolblau und Extraktion dieses Komplexes mit einem organischen Lösungsmittel gelang es jedoch das quaternäre Alkaloid vollständig vom Sorptionsmittel zu lösen. Die Reproduzierbarkeit der Methode ist sehr gut. Wir konnten damit beweisen, dass für Stabilitätsprüfungen von Diallyl-bis-nortoxiferin die U.V.-spektroskopische Gehaltsbestimmung nicht spezifisch ist und dass die Drehung ein besseres Mass für unveränderte Wirksubstanz darstellt.

LITERATUR

- 1 H. G. GÄNSHIRT UND J. POLDERMAN, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 510.
- 2 F. GEISS, A. KLOSE UND A. COPET, *Z. Anal. Chem.*, 211 (1965) 37.
- 3 M. E. AUERBACH, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 15 (1943) 492.
- 4 C. W. BALLARD, J. ISAACS UND P. G. W. SCOTT, *J. Pharm. Pharmacol.*, 6 (1954) 971.
- 5 J. ATTAL, S. M. HENDELES, J. A. ENGELS UND K. B. EIK-NES, *J. Chromatog.*, 27 (1967) 167.

J. Chromatog., 33 (1968) 370-377