

CHROM. 3486

## Trennung der Herzglykoside Digitoxin und Digoxin von ihren 20,22-Dihydroderivaten durch Mehrfach-Dünnschichtchromatographie an Cellulose-Schichten

In Verbindung mit analytischen und präparativen radiodünnschichtchromatographischen Untersuchungen an Cardenolidtridigitoxosiden<sup>1</sup> benötigten wir DC-Systeme, die die Trennung der Glykoside Digitoxin und Digoxin von ihren entsprechenden 20,22-Dihydroderivaten in einem für diese Zwecke erforderlichen guten Differenzierungsgrad gestatten. Angaben zur Trennung der genannten Glykoside von ihren Dihydroglykosiden liegen bisher nicht vor. Ebenso enthalten vergleichende Untersuchungen zum Stoffwechsel dieser Verbindungen<sup>2</sup> keine näheren Angaben zu ihrer chromatographischen Trennung. Einige von uns dahingehend überprüfte Systeme zur dünnschichtchromatographischen<sup>3-5</sup> und papierchromatographischen<sup>6-9</sup> Analyse von Herzglykosiden erbrachten, abgesehen von einer Angabe zur Digoxin-Charakterisierung nach DOHERTY<sup>9</sup> ( $PC/hR_F$ : Digoxin 49, Dihydrodigoxin 54), keine brauchbare oder überhaupt keine Differenzierung.

Durch Heranziehung von Systemen des Zaffaroni-Typs und Verwendung mobiler Phasen mit stark lipophilem Charakter erhielten wir nach Mehrfach-Dünnschichtchromatographie (MDC) an Cellulose-Schichten gut differenzierte Trennungen innerhalb der Paare Digitoxin-Dihydrodigitoxin und Digoxin-Dihydrodigoxin bei zugleich konzentrierter Abscheidung, wie sie für dünnschichtchromatographische Verfahren charakteristisch ist. Eine gleichzeitige Analyse beider Paare mit einem System war infolge der für diese Verbindungen extrem lipophilen mobilen Phasen, die nur auf eine optimale Cardenolid-Cardenolid-Trennung abgestimmt waren, nicht möglich. Als Träger fand gesiebte Cellulose (Schleicher & Schüll Nr. 123) mit einer Teilchengröße von 0.04 mm Verwendung, die sich verschiedenen kommerziellen Cellulose-Typen zur DC, wie dem MN-Cellulosepulver 300 zur DC (Macherey, Nagel & Co, Düren), im Trenneffekt überlegen zeigte.

Die günstigste Trennwirkung ergab sich durch eine dreifache Entwicklung (MDC,  $n = 3$ ) mit folgenden Systemen (Fig. 1):

- (a) Digitoxin:  $hR_F (n = 3) = 25$   
 Dihydrodigitoxin:  $hR_F (n = 3) = 45$   
 stationäre Phase: Propylenglykol (PG)-Aceton, 1:4  
 mobile Phase: Benzol-Essigsäureäthylester, 90:10, PG-gesättigt
- (b) Digoxin:  $hR_F (n = 3) = 55$   
 Dihydrodigoxin:  $hR_F (n = 3) = 71$   
 stationäre Phase: Formamid (Fmd)-Aceton, 1:4  
 mobile Phase: Chloroform-Benzol, 95:5, Fmd-gesättigt.

Für das Paar Digitoxin-Dihydrodigitoxin ergibt sich damit bei einer Laufstrecke von 15 cm eine Differenzierung beider Komponenten um 3 cm, ein Wert, der auch für präparativ-dünnschichtchromatographische Untersuchungen ausreichend erscheint. Untersuchungen zum Einfluss der stationären Phase (PG 15-30%ig in Aceton bei einminütiger Imprägnierungsdauer) auf die Digitoxin-Dihydrodigitoxin-Trennung zeigen, dass bei gleichgutem Trenneffekt ( $\Delta hR_F = 20 \rightarrow 22$ ) die  $R_F$ -Werte

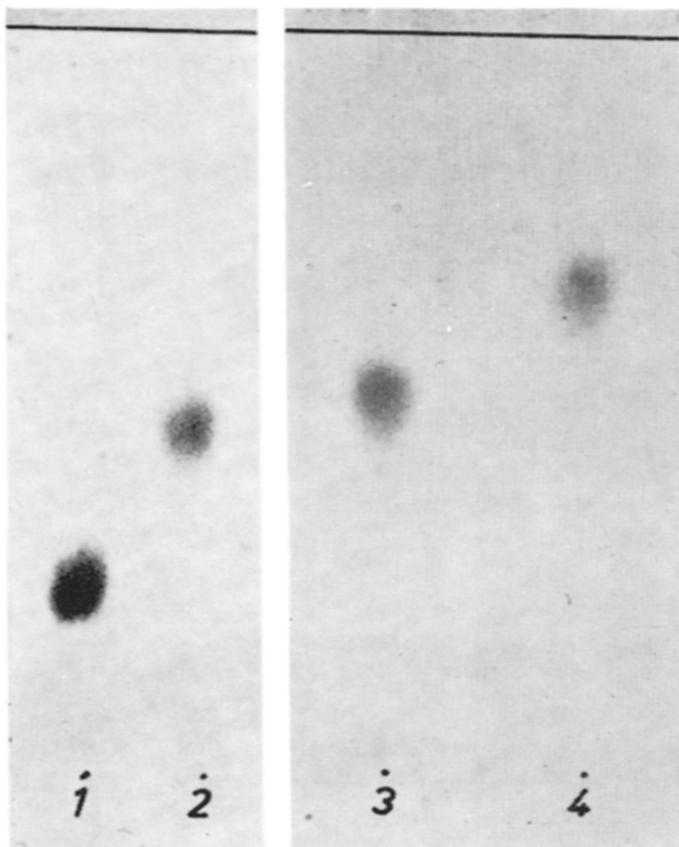


Fig. 1. Dünnschichtchromatographische Trennung der Paare Digitoxin (1)-Dihydrodigitoxin (2) und Digoxin (3)-Dihydrodigoxin (4) durch MDC ( $n = 3$ ) auf Cellulose-Schichten.

beider Glykoside bei Bedarf durch Imprägnierung mit 15%iger PG-Lösung um den Faktor 1.5 angehoben werden können. Andererseits erfordert die Reproduzierbarkeit der  $R_F$ -Werte infolge der starken Verschiebung derselben im Bereich zwischen 15 und 25% PG eine stets konstante PG-Konzentration der Imprägnierungslösung. Bei der Digoxin-Dihydrodigoxin-Trennung wirkt sich eine Veränderung des Chloroform-Gehaltes der mobilen Phase im Bereich zwischen 85 und 100% nur auf die Höhe der  $R_F$ -Werte, jedoch kaum auf die  $\Delta R_F$ -Werte aus. Der Einfluss der MDC bei  $n = 1-5$

#### TABELLE I

EINFLUSS DER MEHRFACH-DÜNN SCHICHTCHROMATOGRAPHIE (MDC;  $n = 1-5$ ) AUF DEN DIFFERENZIERUNGSGRAD DER TRENNUNG DIGITOXIN-DIHYDRODIGITOXIN

Stat. Phase: PG-Aceton, 1:4; mob. Phase: Benzol-Essigsäureäthylester, 90:10, PG-gesättigt.

MDC ( $n$ )	$hR_F$ ( $n = 1-5$ )		$\Delta hR_F$
	Digitoxin	Dihydro- digitoxin	
1	9	18	9
2	16	32	16
3	25	45	20
4	33	56	23
5	41	66	25

auf die  $\Delta R_F$ -Werte des oben genannten Digitoxin–Dihydrodigitoxin-Systems resultiert in einer Spreizung derselben von 9 ( $n = 1$ ) auf 25 ( $n = 5$ ) (Tab. I). Die Entwicklung der  $R_F$ -Werte ( $n = 1-5$ ) beider Komponenten entspricht der Beziehung  $nR_F = 1 - (1 - R_F)^n$  (vergl. Lit. 10).

Die Verwendung der beschriebenen Methode für präparativ-dünnschichtchromatographische Zwecke ist ohne Abänderung möglich. Chromatographien auf 1 und 2 mm dicken Schichten (15 × 20 cm) zeigten bei unverändertem Differenzierungsgrad ( $\Delta R_F$ ) lediglich eine leichte Erniedrigung der  $R_F$ -Werte, wahrscheinlich hervorgerufen durch eine nicht vollständige Abdunstung der mobilen Phase zwischen den einzelnen Entwicklungsstufen. Der Versuch einer Übertragung des Standardsystems für Digitoxin–Dihydrodigitoxin auf die Papierchromatographie ergab bei einer Laufstrecke von 28 cm (aufsteigend; 3 Std.) zwar eine Trennung beider Komponenten, zeigte jedoch im Gegensatz zu den Dünnschichtchromatogrammen eine sehr gestreckte Abscheidung;  $hR_F$ : Digitoxin 13 (8–18), Dihydrodigitoxin 25 (20–30).

Als Nachweisreagenzien fanden Antimontrichlorid<sup>11</sup> und zur Differenzierung zwischen Cardanolid- und Cardenolidstruktur *m*-Dinitrobenzol<sup>12</sup> Verwendung.

### Experimentelles

Die Cellulose-Schichten wurden mit gesiebter Cellulose einer Teilchengröße von 0.04 mm (Zellulosepulver Nr. 123 für die Säulenchromatographie, Carl Schleicher & Schüll, Dassel) nach Homogenisieren mit der 4–5-fachen Menge Wasser in üblicher Weise hergestellt. Verwendung fand ein Streichgerät\*, das durch Luftschlauchdruck an der Unterseite der Platten eine sehr gute Nivellierung der Plattenoberflächen für den Streichvorgang ermöglicht. Die Größe der Glasplatten (vorherige Reinigung mit Chromschwefelsäure erforderlich) betrug 10 × 20 cm. Die Dünnschichtplatten wurden nach 30-min. Lufttrocknung 1 Std. bei 110° getrocknet. Die Schichtdicke lag zwischen 250 und 300  $\mu\text{m}$ . Die Imprägnierung der Schichten mit der stationären Phase erfolgte durch einminütiges Eintauchen der Platten in 15 oder 20%ige PG–Aceton-Lösung bzw. 20%ige Fmd–Aceton-Lösung und anschließende 30-min. Lufttrocknung. Zur Auftragung gelangten jeweils 3  $\mu\text{l}$  (30 nM) der 10<sup>-2</sup>-molaren äthanolischen Lösungen der Cardanolid- bzw. Cardenolidglykoside. Die danach sofort durchgeführte 3-fache Chromatographie (Kammersättigung; Temp. 20° ± 2°) benötigte pro Entwicklung 20–30 Min. Zwischen den einzelnen Entwicklungen wurde die mobile Phase durch 10-min. Lufttrocknung entfernt. Bei präparativen Dünnschichtchromatogrammen mit Schichtdicken über 1 mm ist hierfür eine wesentlich längere Entlüftungsdauer (mindestens 30 Min.) erforderlich. Die Laufstrecke der Chromatogramme betrug 15 cm, der Start lag 1.5 cm über dem Lösungsmittelniveau.

Die Anfärbung der getrockneten Chromatogramme erfolgte entweder durch Spray mit 20%iger Antimontrichlorid-Lösung in Chloroform und Farbentwicklung bei 120° (Cardenolide und Cardanolide) oder durch Besprühen mit 10%iger *m*-Dinitrobenzol-Lösung in Benzol, kurzzeitiger Trocknung und Farbentwicklung mit NaOH (NaOH 6 g, Wasser 25 ml, Methanol 45 ml) bei Zimmertemperatur (Cardenolide).

Fräulein S. JÜNGLING gebührt Dank für die sorgfältige Durchführung der Untersuchungen.

\* Wir danken dem VEB Berlin-Chemie bestens für die Überlassung der Konstruktionsunterlagen.

Institut für Kreislaufforschung der Deutschen Akademie  
der Wissenschaften zu Berlin, Lindenberger Weg 70,  
1115 Berlin-Buch (D.D.R.)

G. RABITZSCH

- 1 G. RABITZSCH, *Arch. Pharm.*, 300 (1967) Mitt. 159; ausführliche Mitteilung in Vorbereitung.
- 2 K. REPKE, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 241 (1961) 165.
- 3 E. STAHL UND U. KALTENBACH, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 458.
- 4 G. RABITZSCH, *Naturwiss.*, 50 (1963) 225.
- 5 G. RABITZSCH UND H. HERZMANN, *Ann.*, 685 (1965) 261.
- 6 F. KAISER, *Chem. Ber.*, 88 (1955) 556.
- 7 K. B. JENSEN, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 9 (1953) 99.
- 8 L. F. GONZALES UND E. C. LAYNE, *J. Clin. Invest.*, 39 (1960) 1578.
- 9 J. E. DOHERTY UND W. H. PERKINS, *Am. Heart J.*, 63 (1962) 528.
- 10 K. RANDEARTH, *Dünnschicht-Chromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, S. 44.
- 11 D. LAWDAY, *Nature*, 170 (1952) 415.
- 12 W. D. RAYMOND, *Analyst*, 64 (1939) 113.

Eingegangen den 5. Dezember 1967

Modifiziert den 1. März 1968

*J. Chromatog.*, 35 (1968) 122-125