

CHROM. 3994

## BUTENOLIDRINGSPEZIFISCHE, QUANTITATIVE PAPIER- UND DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON CARDENOLIDGLYKOSIDEN (DIGITOXIN) MIT 2,4,2',4'-TETRANITRODIPHENYL

GEORG RABITZSCH UND SABINE JÜNGLING

*Institut für Kreislaufforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch (D.D.R.)*

(Eingegangen am 5. Februar 1969)

---

### SUMMARY

*Quantitative paper and thin-layer chromatography of cardenolide glycosides (digitoxin) with use of 2,4,2',4'-tetranitrodiphenyl.*

A butenolide ring specific method of quantitative paper and thin-layer chromatographic analysis of cardenolides and cardenolide glycosides using 2,4,2',4'-tetranitrodiphenyl is described. According to their molar extinction coefficients,  $\epsilon_{\max}$  22600 (PC/digitoxin) and 21500 (TLC/digitoxin) resp., they show high detection sensibility.

---

### EINLEITUNG

Butenolidringspezifische Nachweisreaktionen der Cardenolide und ihrer Glykoside bieten gegenüber Verfahren, die direkt oder indirekt am Steroidskelett angreifen sowie solchen, die sich auf den Nachweis glykosideigner Zuckerkomponenten stützen, den Vorteil einer gezielten quantitativen Erfassung des in seiner biologischen Wertigkeit besonders exponierten  $\alpha,\beta$ -ungesättigten  $\gamma$ -Laktonringes. In Übereinstimmung mit JORK<sup>1</sup> muss aber bei indirekten quantitativ-chromatographischen Verfahren im nmol-Bereich für die herangezogenen Farbreaktionen eine hohe Ausgangsempfindlichkeit ( $\epsilon_{\max}$ ) gefordert werden, da methodisch bedingte Effektivitätsminderungen nur selten ausgeschlossen werden können.

Kombinationen chromatographischer und butenolidringspezifischer Methoden liegen für papierchromatographische Untersuchungen mit 3,5-Dinitrobenzoesäure<sup>2,3</sup>, Pikrinsäure<sup>4-6</sup> und *m*-Dinitrobenzol<sup>7</sup> sowie für dünnschichtchromatographische Zwecke mit Pikrinsäure<sup>8,9</sup> und 3,5-Dinitrobenzoesäure<sup>10</sup> vor. Die molaren Extinktionskoeffizienten der reinen Cardenolidreaktionen (ohne PC oder DC) betragen jedoch für 3,5-Dinitrobenzoesäure maximal nur 10 000, für Pikrinsäure 18 000, für *m*-Dinitrobenzol (in Äthanol) 14 000 (Übersicht bei Lit. 11) und erfahren nach ihrer Kombination mit chromatographischen Methoden bei der Mehrzahl der zitierten Verfahren eine weitere Minderung um 5-20%. Die sich durch eine hohe Cardenolidempfindlichkeit aus-

zeichnende Reaktion mit *m*-Dinitrobenzol in Pyridin<sup>12</sup> erweist sich gegenüber chromatographischen Bedingungen als sehr störanfällig und damit als ungeeignet<sup>13</sup>.

Kürzlich haben wir über eine butenolidringspezifische Cardenolidbestimmung unter Verwendung von 2,4,2',4'-Tetranitrodiphenyl (TNDP) berichtet<sup>11,14</sup>. Die TNDP-Cardenolidreaktion besitzt mit molaren Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{\max}$  26 000–28 000 für Cardenolide und Cardenolidglykoside der Digitoxigenin-, Digoxigenin-, *k*- und *g*-Strophanthidin-Reihe eine hohe Nachweisempfindlichkeit (Genine: 0.2 – 0.3  $\mu\text{g}$ ; Glykoside: 0.3–0.5  $\mu\text{g}$ ) und bietet damit günstigere Voraussetzungen für eine quantitativ-chromatographische Erfassung dieser Verbindungen. Die im folgenden am Beispiel des Digitoxins dargestellten Untersuchungen zur butenolidringspezifischen, quantitativ-papier- und dünnschichtchromatographischen Analyse der Cardenolide und ihrer Glykoside beweisen die Möglichkeit einer Kombination der TNDP-Reaktion mit chromatographischen Arbeitsverfahren und zeigen trotz der noch verbesserungsfähigen chromatographischen Voraussetzungen eine wesentliche Empfindlichkeitssteigerung gegenüber bisherigen Methoden<sup>15</sup>.

#### MATERIAL UND METHODEN

Digitoxin (VEB Ysat, Werningerode) wurde säulenchromatographisch nach LUKESCH<sup>16</sup> gereinigt; F 263–67°. Die Synthese von 2,4,2',4'-Tetranitrodiphenyl (TNDP) erfolgte nach Lit. 11; F 165–67° aus Äthanol; berechnet: C = 43.14, H = 1.8, N = 16.76; gefunden: C = 43.28, H = 1.92, N = 16.81. Eine 0.15 %ige äthanolische TNDP-Lösung ist bei Aufbewahrung unter Lichtschutz (0–30°) 3 Tage zur Verwendung geeignet.

Die Messungen wurden in dem für die TNDP-Reaktion aller geprüften Cardenolide und Cardenolidglykoside<sup>11</sup> gültigen Absorptionsmaximum von  $\lambda_{\max}$  630 nm am Spektromom 201 (MOM, Budapest) vorgenommen. Die Aufnahme der Bezugseichkurven zur vergleichenden Entwicklung der molaren Extinktionskoeffizienten erfolgte unter den für die Standardmethode (in Lösung; Digitoxin  $\epsilon_{\max}$  26 800) beschriebenen Bedingungen<sup>11</sup>.

#### *Quantitative Papierchromatographie mit TNDP*

Zur Chromatographie dienen Systeme nach KAISER<sup>17</sup> mit Formamid(Fmd) als stationäre Phase. Auf 15 cm breite Chromatogramstreifen (Schleicher & Schüll 2043b) werden nach 5-minütiger Fmd-imprägnierung (Fmd–Aceton, 1:4), Abpressen zwischen Filterpapier und 5-minütiger Lufttrocknung strichförmig jeweils 10  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden äthanolischen Digitoxinlösungen im Wechsel mit Testauftragungen (Leitchromatogramm) aufgebracht. Die Entwicklung erfolgt unter Kammersättigung aufsteigend mit Xylol – Methyläthylketon (1:1) Fmd-gesättigt. Die Laufstrecken betragen 20 cm, der Abstand Startlinie/Lösungsmittelniveau 2.5 cm.

Die Chromatogramme werden 15 min bei 60° und 30 min bei 110° getrocknet (Luftumwälzung) und nach Anfärbung der abgetrennten Leitchromatogramme mit  $\text{SbCl}_3$  (15 %ig in Chloroform) die korrespondierenden substratführenden Abschnitte isoliert. Zur Elution und gleichzeitigen Farbsalzbildung werden die ausgeschnittenen Streifen mit dem kompletten Reaktionsgemisch, bestehend aus 2 ml Äthanol, 2.5 ml 0.15 %iger äthanolischer TNDP-Lösung und 0.5 ml wässriger 0.15 N NaOH bei  $20 \pm 1^\circ$  unter absolutem Lichtschutz (Inaktivierungswasserbad) inkubiert. 25 min nach

NaOH-Zugabe erfolgt die Messung der vorsichtig von den Chromatogrammstreifen abgegossenen Farblösung bei  $\lambda$  630 nm und einer Schichtdicke von  $d = 1$  cm gegen einen entsprechend behandelten Papierleerwert. Der zur Verfügung stehende Messbereich beträgt für Digitoxin 2.5–75 nmol (Auftragungslösungen:  $0.25\text{--}7.5 \times 10^{-3} M$ ).

#### *Quantitative Dünnschichtchromatographie mit TNDP*

Auf  $10 \times 20$  cm grossen Kieselgelschichten (Kieselgel HR Merck) mit einer Schichtdicke von  $200 \mu\text{m}^{18}$  werden auf den mittleren Bahnen je  $10 \mu\text{l}$  der äthanolischen Untersuchungslösungen (Digitoxin  $0.25\text{--}5$  nmol/ $\mu\text{l}$ ) strichförmig mit einer Kapillarpipette aufgetragen und die beiden äusseren Bahnen als Leitchromatogramme verwendet. Die Entwicklung der Chromatogramme (Kammersättigung) erfolgt aufsteigend mit Äthylacetat–Methanol (9:1) oder ähnlichen Systemen<sup>19</sup>.

Die nach Trocknung der Chromatogramme mit Hilfe der Leitbahnen ( $\text{SbCl}_3$ -Spray der zuvor aufgeheizten Platten nach Abdeckung der mittleren Bahnen) isolierten, durchschnittlich  $6 \text{ cm}^2$  grossen Substratflächen werden in Säulen mit jeweils  $6 \times 1$  ml Chloroform – Äthanol (8:2) gewaschen und die vereinigten Eluate im Vakuum zur Trockne eingengt. Nach Lösung des Rückstandes in 2 ml Äthanol und Zusatz von 2.5 ml 0.15 %iger TNDP-Lösung und 0.5 ml 0.15 N NaOH wird in der beschriebenen Weise gegen einen Kieselgelleerwert kolorimetriert.

#### ERGEBNISSE

Über Untersuchungen zur Reaktionskinetik der TNDP-Cardenolid-Reaktion<sup>14</sup>, zum qualitativen und quantitativen Charakter des Alkalisierungsprozesses, zum Temperatur-, Wasser- und Lichteinfluss sowie über Korrelationen zwischen Cardenolidstruktur und Grad des molaren Extinktionskoeffizienten wurde bereits berichtet<sup>11</sup>. Die folgenden Untersuchungen zur chromatographischen Analyse des Digitoxins gehen von diesen Befunden aus.

#### *Quantitative Papierchromatographie*

Im Vordergrund standen Fragen der Substratelution, des Einflusses der stationären Phase und diverser Lösungsmittelkomponenten auf die Intensität der Farbreaktion sowie eine differenzierte Verlust- und Fehlereinschätzung. Da Versuche einer gekoppelten Detektion und Elution, d.h. einer direkten Verwendung der zuvor mit Antimontrichlorid schwach angefärbten Chromatogrammflecken zur Elution und TNDP-Bestimmung, infolge der quantitativ nicht eindeutig reproduzierbaren Antimontrichlorid-Behandlung relativ hohe Standardabweichungen aufwiesen, wurde die Bestimmung auf indirektem Wege unter Verwendung von Leitchromatogrammen vorgenommen. Durch Zusammenfassung von Elution und Farbsalzbildung zu einem Arbeitsgang, ohne vorherige separate Isolierung und Abtrennung der gewonnenen Eluate von den extrahierten Chromatogrammstreifen, konnten arbeitstechnisch bedingte Effektivitätsverluste der Methode ausgeschaltet werden.

In Modifizierung der Standardmethode<sup>11</sup> musste die zur Farbreaktion verwendete NaOH -Konzentration infolge einer papierbedingten graduellen Abpufferung von 0.1 N auf 0.15 N NaOH erhöht werden. Wie Tabelle I zeigt, vermindert sich dadurch der Effektivitätsverlust (Elution nicht Fmd-imprägnierter Papierauftragungen) von 7–9 % auf 3 %. Eine Erhöhung über 0.15 N oder eine Vergrösserung der ver-

TABELLE I

EINFLUSS DER NaOH-NORMALITÄT AUF DIE DIGITOXIN-EXTINKTION ( $E_{1\text{ cm}}$ ) NACH ELUTION NICHT FMD-IMPRÄGNIERTER PAPIERAUFTRAGUNGEN

Bezug: Digitoxin-Standard in Lösung nach Lit. 11.

Digitoxin (nmol Auftrag/5 ml)	Standard (Lösung)	Nach Elution		
		0.1 N NaOH	0.125 N NaOH	0.15 N NaOH
25	0.134	0.123	0.130	0.131
50	0.268	0.248	0.259	0.260

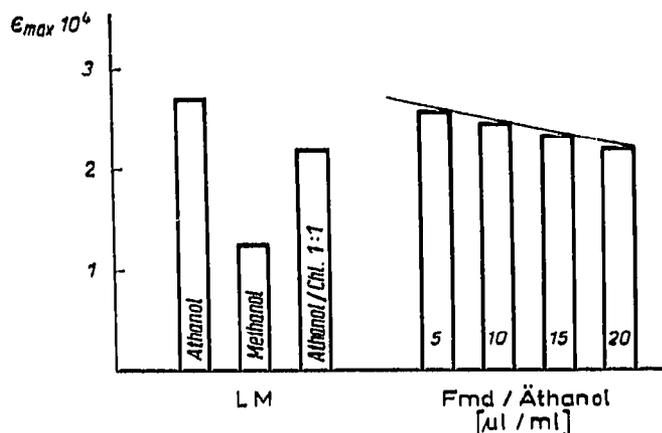


Fig. 1. Einfluss von Formamid (Fmd) und verschiedener zur Substrat-elution qualifizierter Lösungsmittelkomponenten (LM) auf den molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{\text{max}}$ ) der TNBP-Digitoxin-Reaktion. LM-Versuche, 2.0 ml. LM, 2.5 ml Äthanol. TNBP-Lösung, 0.5 ml 0.15 N NaOH; Fmd-Versuche:  $\mu\text{l}$  Fmd/ml Äthanol. Messlösung.

wendeten TNBP-Konzentration bewirkt keinen weiteren Extinktionsanstieg. Auf der Grundlage der mit 0,15 N NaOH aufgenommenen Zeitkurve wurde der Messzeitpunkt mit 25 min nach erfolgter Alkalisierung festgelegt.

Mit dem Ziel einer weiteren Verbesserung der Elution chromatographierter Substrate prüften wir zunächst verschiedene, hierfür qualifizierte Lösungsmittelkomponenten hinsichtlich ihres Einflusses auf die TNBP-Reaktion. Fig. 1 zeigt, dass sowohl der Ersatz von Äthanol durch eine Äthanol-Chloroform-Mischung (1:1) als auch die Verwendung von Methanol eine erhebliche Extinktionserniedrigung bewirkt. Der Abfall beträgt, bezogen auf Äthanol, bei Methanol 53.5 % und bei Äthanol-Chloroform (1:1) 17.8 %. Ähnliche Befunde liegen auch für Cardenolid-Reaktionen anderer butenolidringspezifischer Reagenzien vor. Während TATTJE<sup>20,21</sup> sowie HARKIS UND RIGBY<sup>2</sup> den negativen Einfluss des Methanols im Vergleich zu Äthanol an 3,5-Dinitrobenzoesäure untersuchen, letztere auch den des Äthylenglykols (als stationäre Phase) und Glycerins, weist REPKE<sup>12</sup> für die *m*-Dinitrobenzol-Reaktion (in Pyridin) auf die farbsalzersetzende Wirkung geringster Spuren von Chloroform hin. Für eine gekoppelte Elution und Farbsalzbildung kann damit nur Äthanol herangezogen werden. Der Elutionsverlust beträgt 3 %.

Zur papierchromatographischen Herzglykosidanalyse bieten sich infolge ihres

guten Trenneffektes bevorzugt Systeme mit Fmd als stationäre Phase an<sup>17</sup>. Da die Angaben zum Einfluss von Fmd auf den hier verwendeten Reaktionstyp sowie auf die Verlustquoten der bisher beschriebenen chromatographischen Verfahren sehr differieren, wurde zunächst die Fmd-Wirkung auf die TNDP-Cardenolid-Reaktion untersucht (Fig. 1). Fmd zeigt einen ausgeprägt inhibitorischen Effekt, der sich bei einer Presens von 20  $\mu\text{l/ml}$  in einem Abfall des molaren Extinktionskoeffizienten der Digitoxin-Reaktion von 26 800 auf 22 000 äussert und in dem untersuchten Bereich von 20–100  $\mu\text{l}$  Fmd/5 ml Messlösung in linearer Abhängigkeit von der vorgegebenen Fmd-Konzentration steht. Hieraus resultiert die Forderung nach einer möglichst quantitativen Eliminierung des Formamids vor Eluierung der Substanzflecke.

Tabelle II demonstriert den Wirkungsgrad verschiedener Trocknungsverfahren (Luftumwälzung) an Fmd-imprägnierten, nicht chromatographierten Chromatogrammstreifen (50 nmol Digitoxin; Fmd-Imprägnierung: siehe methodischer Teil). Danach lässt sich der durch eine vorhergehende Fmd-Imprägnierung hervorgerufene Extinktionsabfall von 27 % auch durch intensive Umlufttrocknung der Chromatogramme nur auf eine Verlustquote von 9 % senken, die in dieser Grössenordnung in das Bestimmungsverfahren eingeht.

TABELLE II

EXTINKTIONSVERLUSTE NACH VERSCHIEDENARTIGER TROCKNUNG FMD-IMPRÄGNierter CHROMATOGRAMMSTREIFEN

Bezug: Elutionswert ohne Fmd-Imprägnierung; Digitoxin 50 nmol.

Trocknung	$E_{1\text{ cm}}$ (50 nmol Auftrag/5ml)	Verlustquote (%)
Ohne Trocknung	0.190	26.9
15 min/60°	0.210	19.2
15 min/60° + 15 min/110°	0.235	9.6
15 min/60° + 30 min/110°	0.236	9.2
60 min/120°	0.230	11.5
Kontrolle ohne Fmd 15 min/60° + 30 min/110°	0.260	—

Zur Frage der Elutionsbedingungen untersuchten wir neben der von FUCHS *et al.*<sup>4</sup> vorgeschlagenen 2-stündigen alkoholischen Elution der Chromatogrammstreifen mit nachfolgendem Start der Farbreaktion (+ alkalische Pikrinsäure-Lösung) die Möglichkeit einer gleichzeitigen Elution und Farbsalzbildung. Tabelle III zeigt die Messwerte einer separaten 2-stündigen Elution mit einem Gemisch von 2 ml Äthanol + 2.5 ml äthanolischer TNDP-Lösung vor Einleitung der Farbsalzbildung im Vergleich mit einer nur 25-minütigen Behandlung der Chromatogrammstreifen mit dem kompletten Reaktionsgemisch, d.h. unter sofortigem Zusatz von 0.5 ml 0.15 N NaOH. Signifikante Unterschiede sind in keinem der untersuchten Konzentrationsbereiche nachzuweisen. Die zweite Modifikation, die sich durch eine wesentlich höhere Elutionsgeschwindigkeit auszeichnet, ist infolge der direkten Kopplung von Elution und Farbsalzbildung und der damit verbundenen zeitlichen und arbeitstechnischen Vereinfachung des Verfahrens als methodisch vorteilhafter anzusehen.

Die Eichkurve der papierchromatographischen Digitoxin-Bestimmung ist in

TABELLE III

VERGLEICHENDE ELUTION FMD-IMPRÄGNIERTER PAPIERCHROMATOGRAMME OHNE (2 STUNDEN) UND MIT NaOH (25 MINUTEN)

Bezug: Digitoxin-Standard in Lösung nach Lit. 11 ( $\bar{x}$ ;  $n=5$ ).

Digitoxin (nmol Auftrag/5 ml Messlösung)	$10^3 \cdot E_{1\text{cm}}$		
	Standard (in Lösung)	PC Elution 2 h ohne NaOH	PC Elution 25 min mit NaOH
5	28	26	25
10	55	50	51
25	134	113	113
50	268	225	226
75	398	329	326

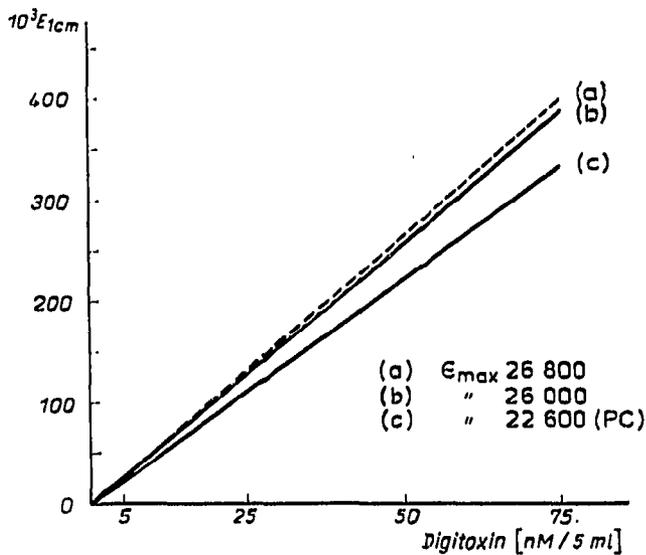


Fig. 2. Eichkurve zur papierchromatographischen Digitoxin-Bestimmung mit TNDP. Erklärungen und Standardabweichungen siehe Text.

Fig. 2 wiedergegeben (c). Vergleichsweise sind für den gleichen Konzentrationsbereich (2.5–75 nmol) die aus Papierauftragungen (Schleicher & Schüll 2043b: ohne FMD-Imprägnierung) gewonnenen reinen Elutionswerte (b) sowie die der Standardausführung (in Lösung; (a)) Lit. 11 entsprechenden Messwerte dargestellt. Das papierchromatographische Verfahren zeigt in den einzelnen Konzentrationsniveaus folgende Entwicklung der relativen Standardabweichungen der Einzelwerte ( $n=4$ )\*: 10 nmol  $\pm 7.4\%$ , 25 nmol  $\pm 4.1\%$ , 50 nmol  $\pm 2.5\%$ , 75 nmol  $\pm 2.2\%$ .

Eine zusammenfassende Darstellung der unter den verschiedenen Versuchsbedingungen erreichbaren molaren Extinktionskoeffizienten sowie eine differenzierte Einschätzung der durch Papierelution, Fmd-Imprägnierung und Papierchromatogra-

$$* s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

TABELLE IV

$\epsilon_{\max}$  - WERTE, WIEDERGEGWINNUNGSQUOTEN UND STANDARDABWEICHUNGEN ((c)  $5 \times 10^{-6}$  M) DER TNDP — DIGITOXINBESTIMMUNG NACH PAPIERAUFTRAGUNG UND PAPIERCHROMATOGRAPHIE SOWIE UNTERSCHIEDLICHEN ELUTIONSVERFAHREN

Bezug: Standard-Digitoxinbestimmung in Lösung<sup>11</sup>.

Methodik	Elution $\epsilon_{\max}^a$		Wiedergewinnungsquote (%)	$s_{rel}^b$
	ohne NaOH (2 h)	mit NaOH (25 min)		
Lösung (Standard)	—	26 800	(100)	$\pm 2.5\%$
Papierauftragung ohne Fmd-Imprägnier.	26 000	26 000	97.1	$\pm 2.4\%$
Papierauftragung mit Fmd-Imprägnier. <sup>c</sup>	—	23 600	88.0	—
Papierchromatogramm <sup>c</sup>	22 500	22 600	84.3	$\pm 4.1\%$

<sup>a</sup>  $\lambda_{\max}$  630 nm (Spektromom 201).

$$^b s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

<sup>c</sup> Trocknung: 15 min/60° + 30 min/110°.

phie hervorgerufenen Verlustquoten gibt Tabelle IV. Sie zeigt, dass im Vergleich zur Standardausführung der TNDP-Reaktion (in Lösung) die reine Substratelution und der chromatographische Verteilungsprozess nur mit einer Effektivitätsminderung von 3 bzw. 4 %, die Fmd-Imprägnierung dagegen mit 9 % die Wiedergewinnungsquote des Verfahrens belasten. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt  $\epsilon_{\max}$  22 600 (Digitoxin-Standard: 26 800 (Lit. 11)). Die Fehlerbreite der Bestimmung wird durch die einfache Papierelution der Substrate nicht beeinflusst, erhöht sich jedoch nach ihrer Chromatographie um den Faktor 2.

#### Quantitative Dünnschichtchromatographie

Die Bedeutung der Dünnschichtchromatographie der Herzglykoside liegt im Vergleich zu ihrer papierchromatographischen Analyse in der wesentlich einfacheren Technik, in einer guten Differenzierung und konzentrierten Lokalisation der Komponenten begründet<sup>10</sup>. Die Isolierung der substratführenden Kieselgelabschnitte erfolgte im indirekten Verfahren mit Hilfe der auf den Aussenbahnen der Chromatogramme platzierten und mit Antimontrichlorid angefärbten Leitchromatogramme.

Eine in Analogie zum beschriebenen papierchromatographischen Verfahren angestrebte gleichzeitige Elution und Farbsalzbildung durch Suspendierung der isolierten Kieselgelschichten in dem kompletten Reaktionsgemisch (incl. NaOH) erwies sich infolge des neutralisierenden Effektes des Kieselgels als nicht durchführbar. Durch Zugabe von Kieselgel HR zum Reaktionsgemisch (NaOH-Endkonzentration: 0.015 N) wird die alkalische Reaktion aufgehoben (pH 9.5  $\rightarrow$  6.5) und damit die nur im alkalischen Milieu ablaufende Farbsalzbildung unterbunden<sup>11</sup>. Untersuchungen mit einer stufenweise erhöhten NaOH-Konzentration des Reaktionsgemisches (0.5 ml 0.15–0.6 N NaOH/5 ml) zeigten, dass auch nach 4-facher Erhöhung der Normalität bei Suspendierung einer 6 cm<sup>2</sup> grossen Kieselgelschicht (50 nmol Digitoxin) nur 94 % der Effektivität der DC-Standardmethode (siehe MATERIAL UND METHODEN) erreicht werden können. Die für einen optimalen Ablauf der Farbreaktion erforderliche

NaOH-Konzentration steht zudem, wie weitere Untersuchungen ergaben, in direkter Abhängigkeit von der vorgelegten Kieselgelmenge.

Die Bestimmung sieht daher zunächst eine separate Elution der cardenolid-führenden Kieselgelschicht mit einer Äthanol-Chloroform-Mischung und nach Entfernung des Elutionsmittels die Lösung des Rückstandes zur Farbreaktion vor. Schwierigkeiten ergaben sich in der quantitativen Elution des Digitoxins. Variationen mit verschiedenen Äthanol-Chloroform-Mischungen sowie auch die Verwendung von Methanol pur. erbrachten nur eine maximale Elutionsquote von 82 %. Um die Möglichkeit einer Hemmung der Farbreaktion durch im Eluat gelöste kieselgeleignete Verunreinigungen mit Sicherheit ausschliessen zu können, wurden Kontrollen durch nachträgliche Digitoxin-Zugaben (verschiedene Konzentrationsbereiche) zu Rückständen digitoxinfreier Kieselgelelate vorgenommen. Der erhaltene molare Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{\max}$  26 800 (entspricht dem  $\epsilon_{\max}$  der Standardmethode) belegt, dass die Effektivitätsminderung nur durch eine ungenügende Digitoxinelution hervorgerufen wird.

Die für den Bereich von 2.5–50 nmol Auftragung/5 ml Messvolumen aufgestellte Eichkurve zur dünn-schichtchromatographischen Digitoxinbestimmung (b) ist in Gegenüberstellung zum Standard (a) in Fig. 3 wiedergegeben. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt  $\epsilon_{\max}$  21 500.

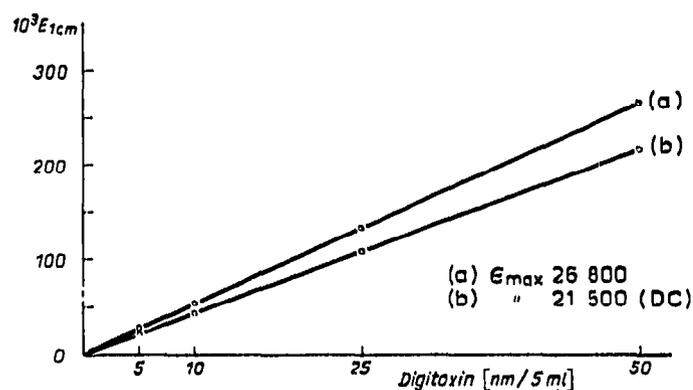


Fig. 3. Eichkurve zur dünn-schichtchromatographischen Digitoxin-Bestimmung mit TNDP. Erklärungen im Text.

## DISKUSSION

Wie die Untersuchungen zeigen, erweist sich die TNDP-Cardenolid-Reaktion auch in quantitativer Sicht für eine Kombination mit chromatographisch-analytischen Methoden als gut geeignet. Auf der Grundlage der kürzlich von uns mitgeteilten Ergebnisse zur TNDP-Bestimmung von 11 Geninen und Glykosiden der Digitoxigenin-, Digoxigenin-, Gitoxigenin-, *g*- und *h*-Strophanthidin-Reihe<sup>11</sup> können in Verbindung mit den vorliegenden chromatographisch-analytischen Erfahrungen (u.a. Lit. 17 und 19) die hier am Digitoxin gewonnenen Resultate als allgemein gültig für die quantitativ-papier- und dünn-schichtchromatographische Erfassung der oben genannten Cardenolide und Cardenolidglykoside angesehen werden.

Die molaren Extinktionskoeffizienten und damit die Nachweisempfindlichkeit ( $d = 1$  cm) beider Methoden liegen mit ihren Digitoxin-Werten von  $\epsilon_{\max}$  22 600 (PC)

bzw. 21 500 (DC) 25–60 % über den einleitend genannten Ausgangsempfindlichkeiten (ohne Chromatographie) bisheriger butenolidringspezifischer chromatographischer Verfahren<sup>2–10</sup>. Da die bei der papierchromatographischen Bestimmung auftretende Effektivitätsminderung von ca. 15 % überwiegend als Folge der Fmd-Imprägnierung (9 %) anzusehen ist, kann bei Verwendung formamidfreier PC-Systeme oder einer effektiveren Eliminierung des Formamids ein weiterer Empfindlichkeitsanstieg erwartet werden. Ebenso ist der dünn-schichtchromatographisch bedingte Abfall des Ausgangswertes (Digitoxin  $\epsilon_{\max}$  26 800) nicht auf eine Hemmung der TNDP-Cardenolid-Reaktion, sondern auf eine unter den gewählten Elutionsbedingungen vorliegende Restbindung des Digitoxins am Adsorbens zurückzuführen. Trotzdem die in der Literatur genannten Wiedergewinnungsquoten dünn-schicht-chromatographischer Verfahren<sup>8,9,22</sup> sehr schwanken (60–95 %), darf für das beschriebene Verfahren infolge der noch nicht voll ausgeschöpften Kapazität der TNDP-Reaktion ein weiterer Empfindlichkeitsanstieg durch effektivere Bedingungen der Substratelution angenommen werden.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Am Beispiel des Digitoxins werden Verfahren zur butenolidringspezifischen, quantitativ-papier- und dünn-schichtchromatographischen Analyse von Cardenoliden und Cardenolidglykosiden mit 2,4,2',4'-Tetranitrodiphenyl beschrieben. Sie weisen auf Grund ihrer molaren Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{\max}$  22 600 (PC/Digitoxin) bzw. 21 500 (DC/Digitoxin) im Vergleich mit bisherigen butenolidringspezifischen Methoden eine hohe Nachweisempfindlichkeit auf.

#### LITERATUR

- 1 H. JORK, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 297.
- 2 K. J. HARKISS UND G. J. RIGBY, *J. Pharm. Pharmacol.*, 10 (1958) 228.
- 3 G. BROCKELT, *Pharmazie*, 18 (1963) 673.
- 4 L. FUCHS, M. WICHTL UND H. JACHS, *Arch. Pharmazie*, 291, 63 (1958) 193.
- 5 K. REPKE, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 237 (1959) 34.
- 6 K. REPKE, U. KUBASCH UND M. ČARMAN-KRŽAN, *Arzneimittel-Forsch.*, 16 (1966) 1469.
- 7 E. COX UND S. E. WRIGHT, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, 126 (1959) 117.
- 8 G. L. CORONA UND M. RAITERI, *J. Chromatog.*, 19 (1965) 435.
- 9 G. L. CORONA UND M. RAITERI, *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 168 (1967) 141.
- 10 B. GÖRLICH, *Arzneimittel-Forsch.*, 15 (1965) 493.
- 11 G. RABITZSCH UND U. TAMBOR, *Pharmazie*, 24 (1969) 266.
- 12 K. REPKE, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 234 (1958) 147.
- 13 K. REPKE, persönliche Mitteilung.
- 14 G. RABITZSCH UND U. TAMBOR, *Pharmazie*, 22 (1967) 668.
- 15 G. RABITZSCH, U. TAMBOR UND S. JÜNGLING, *I. Gemeinschaftstag. Dtsch. Ges. Exp. Med., Leipzig, 30.9.–5.10.68*; Mber. dtsch. Akad. Wiss. Berlin, 11 (1969) 116.
- 16 H. LUKESCH, *Pharmazie*, 13 (1958) 344.
- 17 F. KAISER, *Chem. Ber.*, 88 (1955) 556.
- 18 G. RABITZSCH, *J. Chromatog.*, 37 (1968) 350.
- 19 G. RABITZSCH UND S. JÜNGLING, *J. Chromatog.*, im Druck.
- 20 D. H. E. TATTJE, *J. Pharm. Pharmacol.*, 9 (1957) 29.
- 21 D. H. E. TATTJE, *Pharm. Weekblad.* 93 (1958) 245.
- 22 W. STEIDLE, *Planta Med.* 9 (1961) 435.