

CHROM. 4926

ZUR IDENTIFIZIERUNG UND QUANTITATIVEN ANALYSE
VON STROPHANTHUSGLYKOSIDEN

TH. KARTNIG UND R. DANHOFER

Institut für Pharmakognosie der Universität Graz (Österreich)

(Eingegangen am 16. Juni 1970)

SUMMARY

A method for the identification and quantitative analysis of Strophanthus glycosides

A method for the separation and quantitative analysis of glycosides of *Strophanthus* seeds is described using MgO as adsorbent for thin-layer chromatography of alcoholic extracts of the seeds. In addition to the colorimetric evaluation of the Baljet reaction, a spectrophotometric measurement of the glycosides in concentrated sulphuric acid is suggested, which shows a higher sensitivity. The advantage of the latter method is that the adsorbent is dissolved directly in the measuring liquid, allowing quantitative measurement of the adsorbed glycosides without losses. Application of the method is demonstrated on the seeds of *Strophanthus kombé*, *gratus*, *hispidus* and *sarmentosus*. In addition, the distribution of glycosides in the seeds of *Strophanthus kombé* was investigated by means of this method.

EINLEITUNG

Über die Trennung von Strophanthusglykosiden mittels Dünnschicht-Chromatographie (DC) berichteten in jüngerer Zeit u.a. LUKAS¹, CORONA UND RAITERI², sowie HÖRHAMMER *et al.*³. Die beiden erstgenannten Autoren legen ihr Augenmerk vor allem auf den Nachweis des Hauptglykosides Strophanthosid und seiner Hydrolyseprodukte K-Strophanthin- β , Cymaridin und Strophanthidin, deren Auftrennung aus K-Strophanthin-Handelspräparaten mit den angegebenen Methoden auch gelingt. HÖRHAMMER *et al.* berücksichtigen darüber hinaus auch Glykoside des Periplogenin- und Strophanthidol-Typ und berichten weiters über die Unterscheidung von alkoholischen Extrakten aus Samen verschiedener Strophanthus-Arten.

Die quantitative Bestimmung der Hauptglykoside aus alkoholischen Extrakten von Strophanthussamen wird, insbesondere bei *Strophanthus kombé*, durch die Anwesenheit einer grossen Zahl glykosidischer Inhaltsstoffe erschwert. Bei unseren Untersuchungen über die Brauchbarkeit von MgO für die DC von Pflanzeninhaltsstoffen⁴⁻⁶ schien auch die Auftrennung von Strophanthusglykosiden auf MgO-Schichten möglich. Über unsere diesbezüglichen Untersuchungen sowie über eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung der Strophanthusglykoside in der Droge sei im folgenden berichtet.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Extraktion der Glykoside

Üblicherweise werden die Strophanthussamen vor der Extraktion der Glykoside entfettet. Wie unsere Untersuchungen ergaben, werden durch die Behandlung mit Petroläther geringe Glykosidmengen, vor allem Cymar, mit extrahiert. Da bei der Verwendung von MgO als Sorptionsmittel eine Vorentfettung nicht nötig ist, kann diese daher unterbleiben. Die Extraktion der feingemahlten (Sieb V, ÖAB 9) und mit Seesand verriebenen Samen erfolgt mit 70 %igem Äthanol in einer kontinuierlich arbeitenden Apparatur durch 1 Std. Nach dieser Zeit sind keine messbaren Mengen von Glykosiden im Untersuchungsmaterial mehr nachweisbar.

Auftrennung des Glykosidgemisches mittels DC

Sorptionsmittel. Als Sorptionsmittel verwenden wir wegen des guten Trenneffektes und der Löslichkeit des Sorptionsmittels in Säure zwecks quantitativer Bestimmung Magnesiumoxid⁴⁻⁶. Die Beschichtung der Platten erfolgt wie üblich (Mengenangaben siehe EXPERIMENTELLER TEIL). Die Platten werden in 1,5-cm-breite Streifen eingeteilt, die Laufstrecke beträgt 15 oder 25 cm (Platten 20 × 30 cm), die

Substanz	hR_F	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Cymar Strophanthidin Helveticosid	98	○	○	○	○	○	○		○	○
K-Strophanthin-β	45	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Erysimosid	28	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G-Strophanthin	19	○	○	○	○	○	○	○	○	○
K-Strophanthosid	5	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		•	•	•	•	•	•	•	•	•

Fig. 1. Trennung von Strophanthusglykosiden mittels Dünnschicht-Chromatographie. Fließmittelgemisch: Aceton-Wasser-Äthylacetat (4:0.6:5.4); Sorptionsmittel: MgO; Laufstrecke: 25 cm. A = Reinglykosidgemisch; B = K-Strophanthin (Handelspräparat); C = *Strophanthus kombé* I; D = *Strophanthus kombé* II; E = *Strophanthus kombé* III; F = *Strophanthus hispidus*; G = *Strophanthus gratus*; H = *Strophanthus sarmentosus*, var. *major*; I = *Strophanthus sarmentosus*, var. *senegambiae*.

Substanz	R_F	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Cymar	82	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Strophanthidin	68	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Helveticosid	28	○	○	○	○	○	○	○	○	○
K-Strophanthin- β Erysimosid G-Strophanthin K-Strophanthosid		○○○	○○○	○○○○○	○○○	○○○○○	○○○	○○○○○	○○○	○○○○○

Fig. 2. Trennung von Strophanthusglykosiden mittels Dünnschicht-Chromatographie. Fließmittelgemisch: Aceton-Wasser-Äthylacetat (4:0.2:5.8); Sorptionsmittel: MgO; Laufstrecke: 25 cm. A-I, s. Fig. 1.

Laufzeit 25 bzw. 90 min. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgt bei Zimmer-temperatur und normaler Kammersättigung.

Fließmittelgemische. Der beste Trenneffekt wurde mit dem Fließmittelgemisch Aceton-Wasser-Äthylacetat erreicht. Der Anteil des Wassers ist dafür ausschlaggebend, ob die zuckerreicheren Komponenten oder die zuckerarmen bzw. zuckerfreien Komponenten besser aufgetrennt werden. Wie erwartet, lässt sich der alkoholische Gesamtextrakt aus Strophanthussamen auf einer Laufstrecke von 10 cm unter Verwendung nur eines Fließmittelgemisches nicht befriedigend auftrennen. Wohl gelingt damit die Abtrennung der Hauptglykoside, doch zeigten weitere Untersuchungen, dass sich oftmals an einem Fleck (identischer R_F -Wert) bis zu drei Glykoside befinden. Wir verlängerten daher die Laufstrecke auf 15 bzw. 25 cm und benutzten mehrere Fließmittelgemische, die sich nur in der Menge des Wassers unterscheiden. Die optimale Auftrennung erfolgt bei einer Laufstrecke von 25 cm. Bei der Verwendung des Fließmittelgemisches "c" (s. Tabelle I) werden die zuckerreicheren Komponenten (unterer Teil des Chromatogrammes), bei Verwendung des Fließmittelgemisches "d" die zuckerarmen bzw. zuckerfreien Komponenten (oberer Teil des Chromatogrammes) gut aufgetrennt (s. Fig. 1 und 2). Will man sowohl die zuckerreichen Glykoside wie auch die Aglykone gleichermassen befriedigend auftrennen, so entwickelt man eine Platte mit dem Fließmittelgemisch "c" und eine andere mit dem Fließmittelgemisch "d".

TABELLE I

ZUSAMMENSETZUNG DER FLIESSMITTELGEMISCHE ACETON-WASSER-ÄTHYLACETAT

Fliessmittel- gemisch	Aceton-Wasser- Äthylacetat	Plattengröße (cm × cm)	Laufstrecke (cm)	Trenneffekt
a	4:0.7:5.3	20 × 20	15	Zuckerreiche Glykoside gut
b	4:0.4:5.6	20 × 20	15	Zuckerarme Glykoside gut
c	4:0.6:5.4	30 × 20	25	Zuckerreiche Glykoside gut
d	4:0.2:5.8	30 × 20	25	Zuckerarme Glykoside gut

Da je nach verwendeter Plattengröße auch die Zusammensetzung des Fliessmittelgemisches geringfügig geändert werden muss (verschiedene Sättigung bei normaler und grösserer Küvette), zeigt Tabelle I die günstigsten Zusammenhänge zwischen Plattengröße, Trenneffekt und Zusammensetzung des Fliessmittelgemisches.

Detektionsmittel. Die folgende Detektionsmittel wurden verwendet: (a) Kedde's-Reagens: Violette Flecke auf weissem Grund. Nachweisgrenze *ca.* 0.5 µg. (b) Jodlösung (1 %ig in Chloroform): Helle Flecken auf braunem Grund. Nachweisgrenze *ca.* 10 µg. Für die nachfolgende quantitative Bestimmung wird das Jod, das lediglich der Kennzeichnung dient, durch Erhitzen auf 120° über 10 min vertrieben. Eventuelle zurückbleibende Jodreste stören die spektroskopische Messung in konz. Schwefelsäure (s.u.) nicht.

Quantitative Analyse der Strophanthusglykoside

Die quantitative Analyse der Strophanthusglykoside erfolgt üblicherweise durch die colorimetrische Auswertung der Baljet-Reaktion. Durch eigene Untersuchungen (KARTNIG UND MIKULA⁷) konnte gezeigt werden, dass Glykoside des Sterol- und Triterpentypes in konzentrierter Schwefelsäure eine spezifische Absorptionsbande aufweisen, die zur quantitativen Bestimmung benützt werden kann. Selbst bei Glykosiden mit vier Zuckern tritt bei einer Menge bis zu 600 mg in 10 ml konz. Schwefelsäure keine Störung der Messung durch Verkohlungserscheinungen ein. Die Empfindlichkeit der spektralphotometrischen Messung in konz. Schwefelsäure ist grösser als die kolorimetrische Auswertung der Baljet-Reaktion. Voraussetzung ist verständlicherweise die Abwesenheit anderer organischer Verbindungen bei der Umsetzung mit Schwefelsäure, was jedoch durch die oben beschriebene Abtrennung mittels DC unschwer zu erreichen ist. Die quantitative Messung wird so durchgeführt, dass man den

TABELLE II

EXTINKTIONEN FÜR DIE EICHKURVEN DER WICHTIGSTEN STROPHANTHUSGLYKOSIDE

Substanz	Baljet-Reaktion (495 nm)			Spektralphotometrische Messung in H ₂ SO ₄			
	25 µg	50 µg	100 µg	nm	25 µg	50 µg	100 µg
Strophanthosid	0.061	0.120	0.245	407	0.154	0.311	0.620
K-Strophanthin-β	0.085	0.174	0.352	407	0.255	0.508	1.010
Cymarın	0.120	0.245	0.490	415	0.265	0.540	1.080
Erysimosid	0.097	0.193	0.385	407	0.250	0.502	1.000
Strophanthidin	0.152	0.317	0.638	420	0.286	0.580	1.150

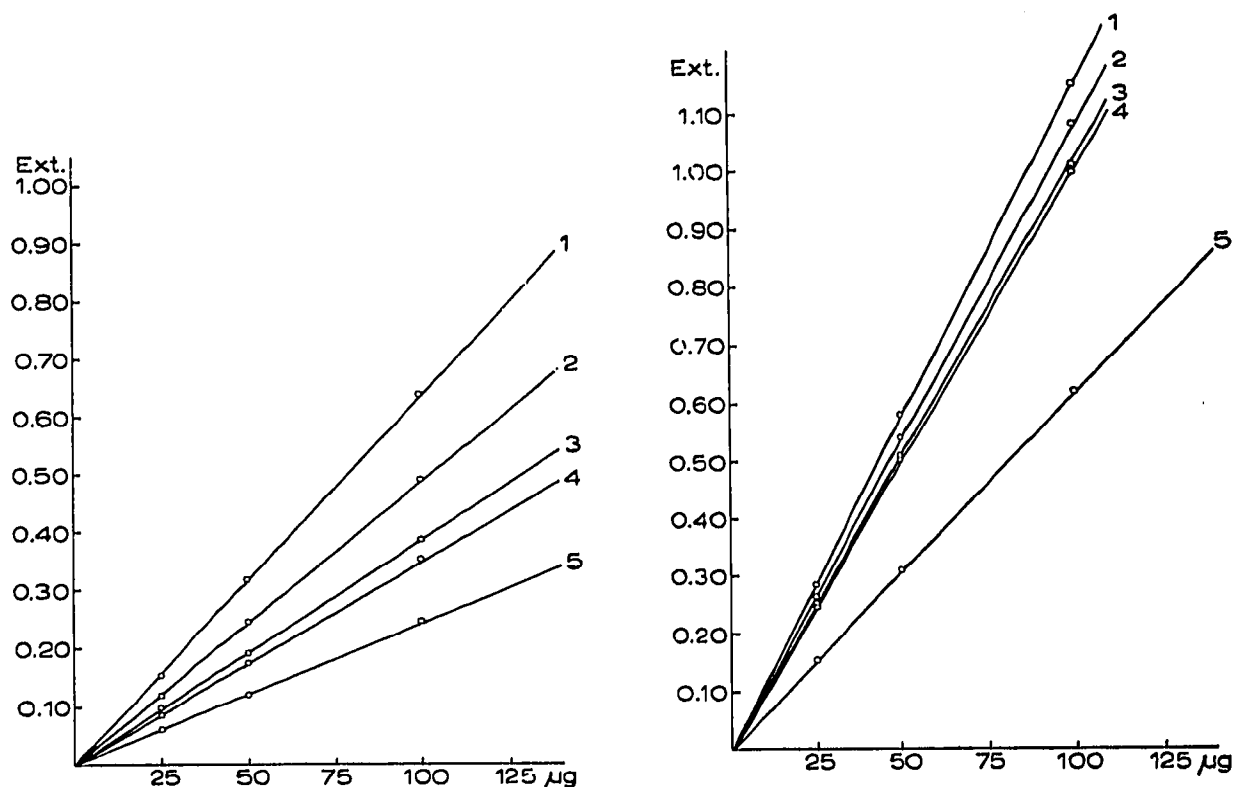


Fig. 3. Eichkurven von Strophanthusglykosiden erhalten durch Auswertung der Baljet-Reaktion. Messung bei 495 nm. 1 = Strophanthidin; 2 = Cymarín; 3 = Erysimosid; 4 = K-Strophanthin- β ; 5 = K-Strophanthosid.

Fig. 4. Eichkurven von Strophanthusglykosiden. Spektroskopische Messung in konzentrierter Schwefelsäure. 1 = Strophanthidin (420 nm); 2 = Cymarín (415 nm); 3 = K-Strophanthin- β (407 nm); 4 = Erysimosid (407 nm); 5 = K-Strophanthosid (407 nm).

aus dem Chromatogramm abgeschabten Fleck in einem Reagensglas in 0.2 ml HCl konz. und 3 ml H₂SO₄ konz. löst und durch 15 min auf 60° erwärmt oder 2 h 30 min bei Zimmertemperatur stehen lässt. Sodann kühlt man ab und misst die klare Flüssigkeit bei der entsprechenden Wellenlänge gegen 0.2 ml konz. HCl + 3 ml konz. H₂SO₄, in der man eine der abgeschabten Zone entsprechende Menge MgO gelöst und ebenfalls 15 min auf 60° erwärmt hat.

Die Erfassungsgrenze der Messmethode liegt für Glykoside mit drei Zuckern bei 5 µg. Die Standardabweichung beträgt für Gesamtglykoside $\pm 1.4\%$.

Der Vorteil dieses Messverfahrens liegt bei der Trennung auf MgO gegenüber der colorimetrischen Auswertung der Baljet-Reaktion darin, dass sich das MgO in 0.2 ml HCl + 3 ml H₂SO₄ völlig löst und somit das gesamte adsorbierte Glykosid zur Umsetzung und Messung gelangt. Die Eichkurven für freie und adsorbierte Glykoside decken sich. Sollte durch Auflösen einer zu grossen Menge MgO im Säuregemisch während der Umsetzungszeit MgSO₄ ausfallen, so kann dieses unschwer abzentrifugiert werden. Eine Beeinträchtigung der Messung tritt hierdurch nicht ein.

Untersuchung verschiedener Strophanthussamen sowie der Glykosidverteilung innerhalb des Samens

Die beschriebene chromatographische Auftrennung und quantitative Bestim-

mung der *Strophanthus*glykoside wurde an verschiedenen Mustern von *Strophanthus kombé* Samen sowie an Samen von *Strophanthus gratus*, *hispidus* und *sarmentosus* angewendet. Die Untersuchungen ergaben, dass *Strophanthus kombé* Samen verschiedener Herkunft Glykosidgemische unterschiedlicher Zusammensetzungen enthalten. So konnte z.B. in einer als "Mozambiquedroge" deklarierten Probe neunzehn glykosidische, Kedde-positive, Flecke nachgewiesen werden, während in einer als "Kilimandscharodroge" deklarierten Probe nur deren zwölf nachgewiesen werden konnten, wobei jedoch die Strophanthidinderivate in beiden Sorten vorhanden waren. Auch die Relationen der Glykosidmengen zueinander waren verschieden.

Die Auftrennung des alkoholischen Extraktes aus *Strophanthus gratus* Samen erbrachte das Vorliegen von vier weiteren, Kedde-positiven Flecken neben G-Strophanthin.

Aus *Strophanthus hispidus* konnten neun glykosidische Inhaltsstoffe nachgewiesen werden, wobei im Gegensatz zum Chromatogramm von *Strophanthus kombé* Cymaridin und Strophanthidin nicht nachweisbar waren.

Von *Strophanthus sarmentosus* standen die Samen zweier Varietäten (*major* und *senegambia*) zur Verfügung*. Die Extrakte beider Varietäten zeichneten sich durch das Fehlen von Erysimosid und K-Strophanthin- β aus, unterschieden sich jedoch auch von einander. Im Extrakt von Samen von *Strophanthus sarmentosus*, var. *major*, konnten nur sechs Kedde-positive Flecke gefunden werden, während aus der Varietät *senegambia* zwölf Flecke erhalten wurden.

An zwei Mustern von *Strophanthus kombé* Samen haben wir erstmalig die Verteilung der wichtigsten Glykoside innerhalb des Samens untersucht, wobei einerseits der Glykosidgehalt der Samenschale und andererseits der des Keimlings und Endosperms bestimmt wurde. Die Prozentzahlen in Tabelle III beziehen sich auf wasserfreie Probensubstanz.

TABELLE III

VERTEILUNG DER WICHTIGSTEN GLYKOSIDE IN *Strophanthus kombé* SAMEN

Samen <i>Strophanthus kombé</i> ^a		% Gesamt Glykoside	Strophanthosid	Erysimosid	K-Strophanthin- β	Cymaridin
Muster I	Samenschale	8.00	6.70	0.60	0.50	0.20
	Endosperm + Keimling	4.16	3.35	0.50	0.31	n.m. ^b
Muster II	Samenschale	7.25	5.65	0.80	0.60	0.20
	Endosperm + Keimling	3.85	3.05	0.47	0.33	n.m. ^b

^a Der Fa. Dr. Siegfried, Zofingen, sei für die freundliche Überlassung von *Strophanthus kombé* Samen bestens gedankt.

^b n.m. = nicht messbar; zu geringe Mengen.

Bei beiden untersuchten Mustern zeigte es sich, dass der %-Gehalt der Samenschale an Glykosiden annähernd doppelt so gross ist, wie der des Endosperm und Keimling. Die Verhältnisse der Glykosidmengen sind etwa gleich.

* Herrn Prof. Dr. T. REICHSTEIN sei für die grosszügige Überlassung der Samen von zwei *Strophanthus sarmentosus* Varietäten an dieser Stelle unser ergebener Dank ausgesprochen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Extraktion

1 g Samen (pulv. Sieb V, ÖAB 9) wird mit 2 g Seesand verrieben und mit 50 ml Äthanol (70 %) in einer kontinuierlich arbeitenden Extraktionsapparatur durch 1 Std. extrahiert. Filtration durch ein kleines Faltenfilter in einem 50 ml Messkolben; Auffüllen mit Äthanol (70 %).

Dünnschichtchromatographie

Beschichten der Platten. 15 g MgO (Merck Nr. 5864) werden mit 65 ml Wasser angerührt und ausgestrichen. Schichtdicke, 0,25 mm. Trocknung bei 130° durch 30 min. Einteilung der Schicht in 1,5 cm-breite Bahnen. Laufstrecke, 15 oder 25 cm.

Auftragen des Extraktes. Vom 2 %igen, äthanolischen Extrakt werden zur quantitativen Bestimmung des Strophanthosides 50 µl, für die Bestimmung der übrigen Verbindungen 300 µl punktförmig aufgetragen.

Fliessmittelgemische. Für Fliessmittelgemische siehe Tabelle I.

Detektion. Die Detektion wurde durchgeführt mittels Kedde-Reagens (Stahl-Reagens Nr. 73)⁸ oder Jod-Lösung (1 % in Chloroform).

Quantitative Auswertung

Colorimetrische Auswertung der Reaktion nach Baljet. Die abgeschabte Zone des Chromatogrammes in einem Zentrifugierglas mit 3 ml Methanol versetzen und 30 min stehen lassen; Zugabe von 3 ml Baljet-Reagens (5 ml 10 %ige wässrige NaOH-Lösung + 95 ml 1 %ige wässrige Pikrinsäurelösung); 30 min bei 20° stehen lassen, anschliessend zentrifugieren, dekantieren und bei 495 nm gegen Baljet-Reagens messen.

Spektroskopische Messung in konzentrierter Schwefelsäure. Die abgeschabte Zone des Chromatogrammes wird in einem Reagensglas mit 0,2 ml konz. HCl und darnach mit 3 ml konz. H₂SO₄ versetzt. Das Reaktionsgemisch wird gut durchgeschüttelt und 15 min bei 60° oder 2 Std. 30 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur misst man bei der dem Glykosid entsprechenden Wellenlänge (s. Tabelle II) gegen 0,2 ml HCl + 3 ml konz. H₂SO₄, denen man so viel MgO zusetzte, wie der abgeschabten Zone entsprach, und die man ebenfalls 15 min auf 60° erwärmt hatte.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse der Glykoside aus Strophanthussamen beschrieben, bei der der alkoholische Extrakt aus den Samen auf MgO-Schichten getrennt wird. Zur quantitativen Analyse wird neben der colorimetrischen Auswertung der Baljet-Reaktion die spektroskopische Messung der Glykoside in konz. Schwefelsäure vorgeschlagen, die sich durch grosse Empfindlichkeit auszeichnet. Der besondere Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sich das MgO in der Messflüssigkeit löst und somit das gesamte adsorbierte Glykosid zur Messung gelangt. Als Anwendungsbeispiele wurden die Samen von *Strophanthus kombé*, *gratus*, *hispidus* und *sarmentosus* untersucht sowie die Verteilung der Glykoside in den Samen von *Strophanthus kombé* bestimmt.

LITERATUR

- 1 G. LUKAS, *Sci. Pharm.*, 30 (1962) 47.
- 2 G. L. CORONA UND M. RAITERI, *J. Chromatog.*, 19 (1965) 435.
- 3 L. HÖRHAMMER, H. WAGNER UND H. KÖNIG, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 103 (1963) 502.
- 4 TH. KARTNIG, A. HIERMANN UND G. MIKULA, *Pharm. Zentralhalle*, 108 (1969) 177.
- 5 TH. KARTNIG UND G. MIKULA, *Pharm. Zentralhalle*, 108 (1969) 457.
- 6 TH. KARTNIG UND G. MIKULA, *Pharm. Zentralhalle*, 109 (1970) 251.
- 7 TH. KARTNIG UND G. MIKULA, *Arch. Pharm.*, im Druck.
- 8 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1967.

J. Chromatog., 52 (1970) 313-320