

CHROM. 5757

QUANTITATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE
VON MUTTERKORNALKALOIDEN

S. KEIPERT UND R. VOIGT

Sektion Chemie, Bereich Pharmazie, Humboldt-Universität, Berlin (D.D.R.)

(Eingegangen am 16. April, 1970; geänderte Fassung am 18. August 1971)

SUMMARY

Quantitative thin-layer chromatography of ergot alkaloids

A description is given of thin-layer chromatography for the quantitative determination of ergot alkaloids of the peptides, alkanolamide and clavine type alkaloids (ergotamine, ergometrine, chanoclavine-(I) and their mixtures). Photometric determination was carried out after extraction of the alkaloids from the adsorbents (silica gel and aluminium oxide). Three of the five elution solvents tested proved to be useful. The results have been statistically recorded. Quantitative recovery proved to be dependent on various criteria, e.g. relative mobilities and R_F values of the individual alkaloids; length and width of the alkaloid bands on the chromatogram; concentration of the solution of alkaloids applied; manner of application; partly the adsorbent and numerous other factors that generally affect thin-layer chromatography. The recovery did not seem to be influenced by the type of alkaloids used, but the individual working conditions proved to be of significance.

EINLEITUNG

In den vergangenen Jahren erschien eine stattliche Anzahl von Arbeiten zur Anwendung der quantitativen Dünnschichtchromatographie (DC). In einer Übersicht von KINZE¹ sind die wesentlichsten Möglichkeiten der quantitativen Auswertung von entwickelten DC-Platten wiedergegeben, worin grobschematisch zwischen Auswertungen direkt auf der Platte oder nach Extraktion der Substanzen aus dem Adsorbens und anschließender spektrophotometrischer Bestimmung unterschieden wird.

Zur Erfassung von Mutterkornalkaloiden werden überwiegend Verfahren der zweiten Kategorie beschrieben, wobei Unterschiede weniger in der zur Elution der Alkaloide angewandten Methodik, sondern vielmehr im Elutionsmittel selbst zu finden sind. Lösungsmittelmischungen von Methanol-Eisessig-Wasser (2:1:2 bzw. 4.5:1:4.5) wurden von SEYFRIED², KLAVEHN und Mitarb.³, McLAUGHLIN und Mitarb.⁴ sowie von TYLER und Mitarb.⁵ erprobt bzw. für bestimmte analytische Aufgaben angewendet. Mit weinsauren Methanol-Elutionslösungen arbeiteten ZINSER und BAUMGÄRTEL⁶, SAHLI UND OESCH⁷, WICHLIŃSKI UND SKIBIŃSKI⁸ sowie RÖDER und

Mitarb.⁹. TABER und Mitarb.¹⁰ wendeten 0.1 N Schwefelsäure zur Elution von Mutterkornalkaloiden aus dem Sorptionsmittel an. Bessere Erfolge erzielten offenbar LI UND FANG¹¹ mit einer äthanolischen Schwefelsäure (0.5 ml Äthanol und 1.5 ml 0.2 N Schwefelsäure). PROCHÁZKA und Mitarb.¹² berichten über den Einsatz von ammoniakalischer Wasser-Aceton-Mischung. Unter den rein organischen Eluentien seien Methylenchlorid-Methanol (9:1) (Lit. 2) Aceton-Chloroform (2:1) (Lit. 12), Benzol-Chloroform (1:2) (Lit. 20) sowie Chloroform-Methanol (1:1)-bzw. Chloroform-Butanol (5:1)-Gemische¹³ erwähnt.

Die zitierten Autoren wendeten die einzelnen Elutionsverfahren mit unterschiedlicher Problemstellung und teilweise recht grosszügig im Hinblick auf die Anforderungen an Exaktheit und Reproduzierbarkeit der Methodik an. Es erwies sich somit als erforderlich, die bekannten Verfahren einer kritischen Überprüfung zu unterziehen und sie anhand von Serienbestimmungen unter Berücksichtigung zahlreicher beeinflussender Faktoren auf Richtigkeit, Reproduzierbarkeit und allgemeine Einsetzbarkeit zu testen. Von Interesse waren diese Untersuchungen vor allem unter dem Gesichtspunkt späterer Anwendung zur Analyse von Mutterkornkultur-extrakten mit breitem Alkaloidspektrum¹⁴.

VERSUCHSANORDNUNG

Vorversuche

Am Beispiel des Ergotamintartrats wurde die Abhängigkeit der quantitativen Rückgewinnung der chromatographierten Mutterkornalkaloide von der Plattengrösse (kP—kleine Platte: Abmessung 7.5 × 17 cm, Adsorbensmenge 1.5 g; gP—grosse Platte: Abmessung 17 × 24.5 cm, Adsorbensmenge 5 g), der Laufstrecke (0, 9, 13 und 20 cm) und dem Adsorbens (Kieselgel G "Merck", Kieselgel H "Merck", Aluminiumoxid G "Merck" oder Aluminiumoxid D, VEB Chemiewerk Greiz-Dörlau) überprüft. Die Alkaloidlösungen wurden in Form von relativ grossen Flecken (Durchmesser 3–6 mm) auf die frisch aktivierten Platten appliziert, im Fließmittelsystem I (vgl. S. 330) entwickelt und anschliessend mit Eluens I (Methanol-Eisessig-Wasser, 2:1:2) die Alkaloide aus dem Adsorbens extrahiert.

Serienanalysen

Die Serienanalysen (zu einer Serie zählen zehn Platten) erfolgten in Anlehnung an die Literatur mit grossen Platten und einer Laufstrecke von 13 cm (Fließmittelsystem I und II, vgl. S. 330). Es fanden folgende Kriterien Berücksichtigung:

(1) Überprüfung von fünf Elutionsverfahren bzw. Eluentien: I = Methanol-Eisessig-Wasser (2:1:2); II = Methanol-Wasser-Weinsäure (40:60:1); III = 0.1 N Schwefelsäure; IV = äthanolische Schwefelsäure (0.5 ml Äthanol, 1.5 ml 0.2 N Schwefelsäure); V = Chloroform-Methanol (1:1).

(2) Testung von Alkaloiden des Peptid-, Alkanolamid- und Clavintyps (Ergotamin, Ergometrin, Chanoclavin-(I), Agroclavin). Zunächst wurden die Einzelalkaloide chromatographiert, später Alkaloidmischungen.

(3) Applikation steigender Alkaloidkonzentrationen.

Wie aus Vorversuchen hervorging, beeinflusste die Art und Weise des Auftragens die quantitative Rückgewinnung der Alkaloide aus dem Sorptionsmittel. Ein Vergleich zweier Auftragemethoden erfolgte nach den Arbeitsweisen A und B am Beispiel des Ergotamins (Elutionsmittel I, vgl. Tabelle IV).

Arbeitsweise A. Beim Applizieren der Alkaloidlösung wurden sehr kleine Punkte auf der Startlinie aneinandergereiht, wobei zur Verteilung des Lösungsmittelvolumens entweder mehrmals über die gleiche Strecke aufgetragen werden musste bzw. eine grössere Bandlänge (7–10 cm; Bandbreite max. 4 mm) resultierte.

Arbeitsweise B. Hier erfolgte das Auftragen sehr schnell. Auf die vom Aktivieren noch etwas warmen Platten wurden je Punkt relativ grosse Volumina der Alkaloidlösung gebracht, so dass zwar einerseits ein mehrfaches Auftragen zu vermeiden, andererseits aber eine grössere Bandbreite (3–7 mm; Bandlänge 2–6 cm) die Folge war.

Beide Verfahren wurden bewusst von zwei verschiedenen Personen nach genauer Anweisung durchgeführt, um auch dem individuellen Faktor Rechnung zu tragen. Da Arbeitsweise A besser den Realitäten und vor allem den praktischen Anforderungen auf qualitative Trennung eines Substanzgemisches und gleichzeitige quantitative Erfassung der Einzelkomponenten, wozu geringe Fleckengrösse bzw. Bandbreite Voraussetzung sind, entspricht, wurden die Elutionsverfahren II–V lediglich auf diese Weise überprüft.

EXPERIMENTELLER TEIL

Bereitung der Dünnschichtplatten

Die Beschichtung der DC-Platten erfolgte mit wässrigen Suspensionen der Sorptionsmittel (5 g für gP, 1.5 g für kP), die aufgegossen wurden. Die Platten trockneten über Nacht an der Luft, wurden anschliessend 35 min bei 110° aktiviert und frisch verwendet.

TABELLE I

INGESETZTE ALKALOIDE UND ALKALOIDLÖSUNGSMITTEL

<i>Alkaloid</i>	<i>Lösungsmittel</i>
Ergotamintartrat "Merk"	Methanol
Ergotaminbase "Merck"	Methanol
Ergometrinmaleat "Merck"	Methanol
Agroclavin (Handelsprodukt, Carl Roth, Karlsruhe)	Chloroform-Methanol (9:1)
Chanoclavin-(I) (im Arbeitskreis isoliert ¹⁴)	Chloroform-Methanol (4:1)

Testalkaloide

Die Testalkaloide gelangten als ca. 0.1% Lösungen (bezogen auf Alkaloidbase) zum Einsatz (s. Tabelle I).

Mit den angegebenen Reinalkaloiden wurden in den entsprechenden Lösungsmitteln täglich frische Lösungen bereitet und davon 0.01–0.12 ml, entsprechend der jeweiligen Konzentration, mit Hilfe der "Agla-Mikrometer-Spritze" durch Aneinanderreihung von Punkten bandförmig auf die Platten aufgetragen. Zur Chromatographie von Alkaloidmischungen—Ergotamin/Ergometrin/Chanoclavin-(I)—trugen wir die Alkaloidlösungen nacheinander (jeweils 0.04 ml) über die gleiche Front auf (Versuch 1) oder applizierten eine Mischung der drei Testlösungen (gleiche Volumenteile bekannten Gehalts, insgesamt 0.12 ml = Versuch 2) auf die Platte.

¹⁴ Fa. Burroughs Wellcome & Co., London.

TABELLE II

 R_F -WERTE

Alkaloid	System I	System II
Ergotamin	0.64	0.75
Agroclavin	0.45	0.52
Ergometrin	0.30	0.41
Chanoclavin-(I)	0.04	0.07

Chromatographie

Zur Chromatographie wurden die DC-Kammern (Schalen der Abmessung $4.5 \times 10 \times 20$ cm bzw. $6 \times 20 \times 30$ cm) mit 60 bzw. 200 ml des Laufmittelgemisches beschickt, das nicht mehr als dreimal und nur an einem Tag verwendet wurde. Die Laufstrecke betrug bei Durchführung der Messreihen und zur Testung der Adsorbentien 13 cm, für die Ermittlung der Plattengröße 10 cm. Die Chromatographie erfolgte bei Kammersättigung und Zimmertemperatur ($22^\circ \pm 5^\circ$).

Die folgenden DC-Systeme wurden verwendet: (I) Chloroform-Methanol (17:3) (Lit. 10) und (II) Chloroform-Methanol (4:1) (Lit. 15).

Die R_F -Werte auf Kieselgel G (Laufstrecke 13 cm) werden in Tabelle II zusammengefasst.

Markierung der Alkaloidzonen

Ergotamin und Ergometrin konnten auf den lufttrockenen Platten durch ihre Fluoreszenz im UV-Licht markiert werden. Die Lokalisierung der Agroclavin- und Chanoclavinzonen erfolgte mittels Leitchromatogramm (Randfleck), das durch Besprühen mit Dragendorff- oder Perchlorsäure-Reagens unter gleichzeitigem Schutz der Alkaloidzonen vor der Einwirkung des Sprühreagens (Abdecken mit einer Glasplatte) nachgewiesen wurde. Bei den Clavinalkaloiden schabten wir besonders breite Bänder ab, um auch bei möglicher R_F -Verschiebung gegenüber der Randzone das Alkaloid quantitativ zu erfassen. Nachfolgendes Besprühen der ganzen Platte diente als Kontrolle.

*Sprühreagens nach Dragendorff*¹⁶. Die folgenden Lösungen wurden verwendet: Lösung A—4 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, gelöst in 96 g 10% wässriger Sorbitlösung; Lösung B—40% NaJ-Lösung; Lösung C—20% Weinsäurelösung. Die Lösungen A, B und C werden getrennt und vor Licht geschützt aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wird zu 2 ml Lösung B 1 ml Lösung A gegeben und mit Lösung C auf 50 ml verdünnt.

*Perchlorsäure-Reagens*¹⁷. Die Zusammensetzung des Reagens war wie folgt: 5 ml Perchlorsäure, 2 ml 0.05 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und Dest. Wasser ad 100 ml.

Elution der Alkaloidzonen

Die im UV-Licht oder durch Leitchromatogramm lokalisierten Alkaloidzonen wurden mittels Spatel und Rasierklinge von der DC-Platte abgeschabt, auf Pergamentpapier gesammelt und quantitativ zur Elution in 10 ml-Schliffreagensgläser überführt. Mit 2 ml des jeweiligen Elutionsmittels (vgl. S. 329)—ausgenommen Eluens V—wurde während 10 min häufig geschüttelt. Anschliessend erfolgte die Zugabe von 4 ml *p*-Dimethylaminobenzaldehyd-Reagens* (Lit. 18) und nach wei-

* Zusammensetzung: 0.2 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd, 65 ml conc. H_2SO_4 , dest. Wasser ad 100 ml und 0.15 ml 10% $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung.

teren 10 min die Zentrifugation (7 min bei 4000 U/min). Bei Verwendung von 0.1 N H₂SO₄(III) als Eluens wurde die Trennung vom Adsorbens durch Filtration mittels Glasfildertiegel G₄ (Allihn'sches-Rohr) vorgenommen.

Bei Verfahren V eluierten wir die Alkaloide aus dem Sorbens durch 15-min Schütteln mit 10 ml des organischen Lösungsmittelgemisches, filtrierten danach unter Eiskühlung über einen G₄-Fildertiegel und engten 7 ml des Filtrats vorsichtig im Vakuum zur Trockne ein. Mit diesem Rückstand erfolgte die Gehaltsbestimmung, indem mit 2 ml 1% Weinsäurelösung und 4 ml Farbreagens aufgenommen wurde.

Photometrische Bestimmung

Zur Ermittlung der Extinktionen bedienten wir uns des Spezialkolorimeters "Spekol", VEB Carl Zeiss, Jena (Wellenlänge: 615 nm für Ergotamin und Ergometrin; 585 nm für Agroclavin und Chanocclavin). Zur Herstellung der Blindlösungen für die photometrische Bestimmung wurden etwa gleich grosse alkaloidfreie Zonen des Adsorptionsmittels analog behandelt.

Berechnung der Alkaloidwerte

Der Berechnung der Alkaloidwerte wurden Eichkurven der einzelnen Alkaloide zugrunde gelegt, aus denen die Faktoren (*f*), entsprechend µg/ml bei Extinktion = 1.0, entnommen werden konnten: Ergotamin, 106.5; Ergometrin, 59.5; Agroclavin, 37.9; Chanocclavin, 40.8.

Somit ergab sich für die Berechnung des µg-Gehalts der Alkaloide (*G*) in den Testlösungen und Alkaloidbändern folgende Formel:

$$G = E \cdot d \cdot V \cdot f$$

wobei

E = gemessene Extinktion;

d = Schichtdicke;

V = Verdünnung;

f = Berechnungsfaktoren (s.o.).

Zur Ermittlung der Vergleichswerte für die Berechnung dosierten wir zu jeder Messreihe drei Proben gleicher Konzentration mit der "Agla-Mikrometer-Spritze" in Reagensgläser, gaben nach Abdunsten des Lösungsmittels 2 ml des betreffenden Elutionsmittels und 4 ml des van Urk-Reagens¹⁸ hinzu und bestimmten die Extinktion. Das arithmetische Mittel der erhaltenen Werte wurde als aufgetragene Konzentration ("wahrer Wert") angenommen und der Berechnung als 100% zugrunde gelegt.

Die Ermittlung des Vergleichswertes für Elutionsverfahren V erfolgte nach dem Aufnehmen der Probe mit 2 ml 1% Weinsäurelösung und 4 ml Farbreagens.

Berechnung der Streuungsmasse

Die Standardabweichungen wurden nach den üblichen Grundlagen errechnet¹⁹. Als Standardabweichung des Mittelwertes zu aufgetragener Konzentration (%) wurde folgende Berechnung durchgeführt:

$$\frac{s \cdot 100}{\sqrt{(n) \cdot x}}$$

wobei

- s = Standardabweichung;
 n = Zahl der Messungen;
 x = aufgetragene Konzentration.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auswertung der Vorversuche

Einfluss der Plattengrösse. Zur Festlegung der günstigsten Arbeitsbedingungen für die Serienanalysen war es erforderlich, den Einfluss des Formats der DC-Platte auf die quantitative Rückgewinnung zu überprüfen. Hierzu trugen wir eine methanolische Ergotamintartratlösung im Konzentrationsbereich von 35–80 μg Alkaloid auf kleine (kP) bzw. grosse (gP) Kieselgel G-Platten über nahezu die ganze Plattenbreite auf und entwickelten im Fließmittelsystem I. Zur Elution diente das Gemisch Methanol–Eisessig–Wasser (2:1:2).

TABELLE III

EINFLUSS DER LAUFSTRECKE AUF DIE PROZ. RÜCKGEWINNUNG DES ERGOTAMINS AUS DEM ADSORBENS NACH CHROMATOGRAPHIE AUF gP

Die Tabelle wurde nach Arbeitsweise B (vgl. S. 329) erstellt. Da die mit kP erhaltenen Ergebnisse die gleichen Tendenzen aufweisen, wurde hier auf ihre Wiedergabe verzichtet.

Laufstrecke (cm)		Aufgetragene Alkaloid-Konz. (μg)	Gefundene Alkaloid-Konz.	
			(μg)	(%)
0	a	49.62	49.42	99.6
	b	95.85	95.42	99.5
9	a	49.62	48.67	98.1
	b	95.85	94.57	98.4
13	a	49.62	46.30	93.1
	b	95.85	92.88	96.9
20	a	49.62	45.48	91.7
	b	106.50	100.86	94.7

Wie angenommen, lagen die mittleren gemessenen Konzentrationen auf gP niedriger als auf kP. Bei der Chromatographie auf ersteren war eine breitere Front zu durchlaufen und somit musste das Alkaloid auch aus einer grösseren Adsorbensmenge zurückgewonnen werden. Demnach erklären sich die Diskrepanzen offensichtlich aus einer, wenn auch geringen, irreversiblen Adsorption des Alkaloids am Kieselgel. Bei den weiteren Versuchen arbeiteten wir zwar auf grossen Platten, versuchten jedoch, der in diesem Vorversuch gewonnenen Erkenntnis durch Konzentrierung der aufgetragenen Testlösung auf möglichst geringe Bandlänge Rechnung zu tragen.

Einfluss der Laufstrecke. Die Überprüfung, inwieweit die Laufstrecke auf die wiedergefundene Alkaloidkonzentration von Einfluss ist, schien auf Grund der diesbezüglich unterschiedlichen Angaben in der Literatur und der oben getroffenen Aussagen erforderlich. Ausserdem war zu bedenken, dass bei Chromatographie eines Alkaloidgemisches die Einzelalkaloide entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit unterschiedliche Strecken durchlaufen.

Auf gP wurden verschiedene Volumina der Ergotaminlösung dosiert und die

TABELLE IV

QUANTITATIVE DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE VON ERGOTAMIN

Eluens I: Methanol-Eisessig-Wasser (2:1:2). Adsorbens: Kieselgel G.

	Arbeitsweise A			Arbeitsweise B			
	a	b	c	a	b	c	d
Aufgetragene Konzentration (μg)	44.73	80.94	106.50	55.15	75.61	87.33	127.16
Gemessene Konzentration ^a (μg)	32.71	59.96	82.22	42.49	69.42	84.63	118.43
Gemessene Konzentration ^a (%)	73.1	74.1	77.2	94.1	91.8	96.9	93.1
Standardabweichung (μg)	1.90	2.41	1.68	1.42	3.63	1.76	5.01
Standardabweichung des Mittelwertes (μg)	0.60	0.76	0.53	0.44	1.15	0.56	1.59
Relative Standardabweichung des Mittelwertes (%)	1.83	1.26	0.64	1.03	1.65	0.66	1.34
Standardabweichung des Mittelwertes zu aufgetragener Konzentration (%)	1.34	0.93	0.49	0.97	1.52	0.64	1.25
Durchschnittlich gemessene Konzentration (%)		74.8				94.4	

^a Mittelwert aus zehn Bestimmungen.

Laufstrecken 0 cm (also ohne Chromatographie), 9 cm, 13 cm und 20 cm getestet (Kieselgel G, Fließmittel I, Bandlänge 2–6 cm).

Tabelle III zeigt eine Tendenz zu verminderten Werten proportional zu einer längeren Laufstrecke. Ebenfalls ohne chromatographische Entwicklung wurden mittlere Ergotamin- und Ergometrinkonzentrationen ($78.8 \mu\text{g}$ bzw. $67.8 \mu\text{g}$) mit Eluens IV aus Kieselgel G eluiert und ergaben mit 87.8% bzw. 83.8% vergleichsweise höhere Werte als nach Chromatographie (Tabelle VII). Für unsere weiteren Versuche chromatographierten wir einheitlich über eine Laufstrecke von 13 cm.

Einfluss der Adsorbentien. Des weiteren sollte geklärt werden, in welcher Weise die einzelnen Adsorbentien—es wurden Kieselgel G und H, Aluminiumoxid D und G getestet—die Elution des Alkaloids beeinflussen (methanolische Ergotamintartratlösung, Bandlänge 2–6 cm, Laufstrecke 13 cm, Fließmittelsystem I). Die Überprü-

TABELLE V

QUANTITATIVE DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE VON ERGOMETRIN

Eluens I: Methanol-Eisessig-Wasser (2:1:2). Adsorbens: Kieselgel G.

	a	b	c
Aufgetragene Konzentration (μg)	30.94	55.00	73.78
Gemessene Konzentration ^a (μg)	24.51	46.00	63.43
Gemessene Konzentration ^a (%)	79.3	83.6	86.0
Standardabweichung (μg)	2.66	2.30	3.57
Standardabweichung des Mittelwertes (μg)	0.84	0.72	1.12
Relative Standardabweichung des Mittelwertes (%)	3.42	1.56	1.76
Standardabweichung des Mittelwertes zu aufgetragener Konzentration (%)	2.71	1.30	1.51
Durchschnittlich gemessene Konzentration (%)		83.0	

^a Mittelwert aus zehn Bestimmungen.

TABELLE VI

QUANTITATIVE DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE VON ERGOTAMIN, ERGOMETRIN UND CHANOCLAVIN
Eluens II: Methanol-Wasser-Weinsäure (40:60:1). Adsorbens: Kieselgel G.

	Ergotamin		Ergometrin			Chanoclovin		
	a	b	a	b	c	a	b	c
Aufgetragene Konzentration (μg)	70.29	110.76	26.18	70.70	97.58	14.11	42.43	59.56
Gemessene Konzentration ^a (μg)	56.93	89.94	21.96	59.02	81.23	11.51	35.00	52.46
Gemessene Konzentration ^a (%)	81.0	81.2	83.9	83.5	83.2	81.6	82.5	88.1
Standardabweichung (μg)	6.82	8.79	1.12	1.95	1.24	0.73	2.59	1.00
Standardabweichung des Mittelwertes (μg)	2.15	2.78	0.36	0.62	0.39	0.23	0.81	0.32
Relative Standardabweichung des Mittelwertes (%)	3.77	3.09	1.63	1.05	0.48	1.99	2.31	0.60
Standardabweichung des Mittelwertes zu aufgetragener Konzentration (%)	3.05	2.50	1.37	0.87	0.40	1.63	1.90	0.53
Durchschnittlich gemessene Konzentration (%)	81.1		83.5			84.1		

^a Mittelwert aus zehn Bestimmungen.

fungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den eingesetzten Sorptionsmitteln, so dass hier auf eine tabellarische Wiedergabe der in den Vorversuchen ermittelten Werte verzichtet werden kann. Gute Vergleiche zwischen Kieselgel G und Aluminiumoxid G in den Serienanalysen mit Eluens IV gestatten die Tabellen VII und VIII. Deutliche Unterschiede bei Verwendung von Aluminiumoxid G gegenüber

TABELLE VII

QUANTITATIVE DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE VON ERGOTAMIN, ERGOMETRIN UND CHANOCLAVIN
Eluens IV: äthanolische Schwefelsäure. Adsorbens: Kieselgel G.

	Ergotamin		Ergometrin			Chanoclovin	
	a	b	a	b	c	a	b
Aufgetragene Konzentration (μg)	62.62	117.15	27.30	79.73	103.5	28.50	53.85
Gemessene Konzentration ^a (μg)	43.69	90.09	20.35	62.74	90.08	24.00	48.06
Gemessene Konzentration ^a (%)	69.8	76.9	74.7	78.7	87.3	84.1	89.2
Standardabweichung (μg)	3.40	6.04	1.42	1.82	4.15	1.66	3.89
Standardabweichung des Mittelwertes (μg)	1.07	1.91	0.44	0.57	1.31	0.52	1.23
Relative Standardabweichung des Mittelwertes (%)	2.44	2.12	2.16	1.13	1.45	2.16	2.55
Standardabweichung des Mittelwertes zu aufgetragener Konzentration (%)	1.70	1.62	1.61	0.71	1.26	1.82	2.28
Durchschnittlich gemessene Konzentration (%)	73.4		80.2			86.7	

^a Mittelwert aus zehn Bestimmungen.

TABELLE VIII

QUANTITATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON ERGOTAMIN UND ERGOMETRIN
 Eluens IV: äthanolische Schwefelsäure. Adsorbens: Aluminiumoxid G.

	<i>Ergotamin</i>		<i>Ergometrin</i>		
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
Aufgetragene Konzentration (μg)	74.97	94.99	23.80	58.31	93.77
Gemessene Konzentration ^a (μg)	48.94	77.98	18.70	48.91	83.77
Gemessene Konzentration ^a (%)	65.3	82.1	79.0	83.9	89.3
Standardabweichung (μg)	4.97	4.03	1.96	5.26	3.05
Standardabweichung des Mittelwertes (μg)	1.57	1.29	0.62	1.66	0.96
Relative Standardabweichung des Mittelwertes (%)	3.20	1.65	3.31	3.39	1.14
Standardabweichung des Mittelwertes zu aufgetragener Konzentration (%)	2.09	1.35	2.60	2.84	1.02
Durchschnittlich gemessene Konzentration (%)		73.7		84.0	

^a Mittelwert aus zehn Bestimmungen.

Kieselgel G traten jedoch z.T. in den Messreihen der Elutionsverfahren II (hier konnten aus Aluminiumoxid nur 63.1% bei einer aufgetragenen Ergotaminkonzentration von 77.9 μg wiedergewonnen werden, vgl. demgegenüber Tabelle VI) und Eluens III (unten) zutage.

Auswertung der Serienanalysen

Bei der zusammenfassenden Beurteilung der fünf überprüften Elutionsverfahren zur quantitativen Erfassung von Mutterkornalkaloiden mittels DC sind die Eluentien III und IV (auf eine tabellarische Wiedergabe wurde hier verzichtet) als nicht geeignet für exakte Bestimmungen zu bewerten, während die Eluentien I, II und IV (Tabellen IV–VIII) als durchaus einsetzbar zu kennzeichnen sind.

Eluens III. Obwohl bei Elutionsverfahren III (0.1 N Schwefelsäure) von vornherein keine befriedigenden Ergebnisse zu erwarten waren, bezogen wir es in unsere Überprüfungen ein, um den wesentlichsten Literaturangaben gerecht zu werden.

Die Elution von Ergotamin, Ergometrin und Chanoclovin ergab trotz aufgetragener Alkaloidkonzentrationen im günstigsten Konzentrationsbereich nur sehr niedrige Werte (26.1%, 32.5%, 64.6%). Da Chanoclovin zu einem wesentlich höheren Anteil als die beiden anderen Alkaloide eluiert wurde, ist als Ursache der geringen quantitativen Erfassung an die unterschiedliche Löslichkeit der Alkaloide verschiedenen Typs im Eluens zu denken. Ausserdem erwies sich hierbei die Rückgewinnungsquote als im besonderen Masse vom Adsorbens abhängig. So ermittelten wir bei Chromatographie des Ergotamins auf Aluminiumoxid G nahezu die doppelte mittlere Konzentration gegenüber Kieselgel G (52.1% gegenüber 26.1%). Die Streuungsmasse der Aluminiumoxidserie liegen allerdings ausserordentlich hoch. Somit ist die Elution mit 0.1 N Schwefelsäure insgesamt als ungeeignet zu beurteilen. Neben der ausgeprägten Alkaloidspezifität hinsichtlich der Löslichkeit erbringt dieses Verfahren weder Werte in akzeptablen Grössenordnungen noch gut reproduzierbare Ergebnisse.

TABELLE IX
 QUANTITATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON ALKALOIDGEMISCHEN (ERGOTAMIN/ERGOMETRIN/CHANOCLAVIN)
 Eluentien: I, II, IV, V. Adsorbens: Kieselgel G.

Elu- tionen	Appli- kationen ^a	Aufgetragene Konzentration (µg)				Gemessene Konzentration				Standardabweichung (µg)			
		Ergotamin		Chano- clavin		Ergometrin		Chanocla- vin		Σ	Ergota- min	Ergo- metrin	Chano- clavin
		µg	%	µg	%	µg	%	µg	%				
I	Versuch 2 68.16	42.24	45.70	57.51	84.4	29.75	70.4	34.27	76.0	76.9	2.20	0.27	0.01
	Versuch 1 68.16	42.24	41.07	56.77	83.3	29.55	70.0	36.13	88.0	80.4			
II	Versuch 2 61.77	74.97	37.54	57.51	93.1	52.36	69.8	37.54	93.0	85.3	0.10	1.20	0.23
	Versuch 1 61.77	74.97	37.54	57.15	92.5	51.99	69.4	36.94	98.6	86.8			
IV	Versuch 2 68.16	64.26	35.09	53.25	78.1	46.41	72.2	20.40	58.1	63.5	3.44	1.46	1.74
	Versuch 1 68.16	64.26	35.04	53.26	78.1	46.80	72.8	29.33	83.7	78.2			
V	Versuch 2 66.03	39.27	37.53	60.86	92.2	30.80	77.9	27.97	74.5	81.5	0.10	0.23	1.55
	Versuch 1 66.03	39.27	37.53	58.83	89.1	31.16	79.4	25.93	69.1	79.2			

^a Im Versuch 1 wurden die Einzelalkaloide nacheinander aufgetragen, im Versuch 2 wurde eine Alkaloidmischung appliziert.

Im Hinblick auf die unbefriedigenden Resultate war auf Versuche mit Alkaloidgemischen zu verzichten.

Eluens V. Am Beispiel des Ergotamins (75 μg) wurden zunächst die Lösungsmittelgemische Methylenchlorid-Methanol (9:1) (Lit. 2), Aceton-Chloroform (2:1) (Lit. 12) und Chloroform-Methanol (1:1) (Lit. 13) auf ihre Fähigkeit zur Elution des Alkaloids aus dem Sorptionsmittel untersucht. Das letztgenannte Eluens erwies sich als den anderen überlegen.

Die mit Eluens V (Chloroform-Methanol (1:1)) erhaltenen Ergebnisse (durchschnittlich gemessene Konzentration: Ergotamin = 62.6%; Ergometrin = 76.9%; Chanoclavin = 59.3%) sind nur bedingt mit den Ergebnissen der folgenden als günstig beurteilten Verfahren vergleichbar. Besonders auffällig ist eine Verminderung der Rückgewinnungsquote im Konzentrationsbereich von etwa 100 μg , während bei den Verfahren I, II und IV ein linearer Anstieg entsprechend der aufgetragenen Konzentration konstatiert werden kann (s. unten). Bei den Versuchen mit den Alkaloidgemischen (Tabelle IX) zeigen sich jedoch vergleichbare Beziehungen der drei Alkaloidzonen untereinander.

Bei Elutionsverfahren V ist ein verfahrenbedingter Alkaloidverlust von annähernd 20% einzukalkulieren, wie Vergleichsanalysen belegen. Wird eine Probe der Alkaloidlösung in einem Reagensglas mit 10 ml Eluens V versetzt, die Lösung durch eine G4-Glasfritte gezogen und mit 7 ml des Filtrats in Analogie zu den Angaben im EXPERIMENTELLEN TEIL die Gehaltsbestimmung durchgeführt, so ergeben sich 92.6% der vorgelegten Alkaloidkonzentration (Verluste also durch die Filtration und das Abpipettieren eines bestimmten Lösungsmittelvolumens). Bringt man die Vergleichsprobe darüber hinaus bereits auf eine entsprechende Kieselgelmenge auf, eluiert mit 10 ml Extraktionsmischung V und verfährt weiter wie unter *Elution der Alkaloidzonen* für die Serienanalysen angegeben, so resultieren nur 81.4% der zu erwartenden Konzentration. Der Exaktheit und Einheitlichkeit wegen sind für die Berechnung jedoch die auf 100% aufgetragenes Alkaloid bezogenen Werte angegeben.

Zusammenfassend muss die gewählte Methodik der Elution mit dem organischen Extraktionsmittel als unbefriedigend beurteilt werden, da sie keine Reproduzierbarkeit garantiert und zu viele methodisch bedingte Fehler einschliesst. Als besonders erschwerender Faktor kommt hier die leichte Flüchtigkeit der rein organischen Lösungsmittelmischung hinzu.

Eluentien I, II und IV. Tabelle X zeigt eine Gegenüberstellung der drei geeigneten Verfahren: Eluens I (Methanol-Eisessig-Wasser, (2:1:2), II (40% Methanol mit 1% Weinsäure) und IV (äthanolische Schwefelsäure).

TABELLE X

GEGENÜBERSTELLUNG DER ELUENTIEN I, II UND IV (KIESELGEL G)

Eluentien	Durchschnittlich gemessene Alkaloidkonz. (%)		
	Ergotamin	Ergometrin	Chanoclavin-(I)
I Methanol-Eisessig-Wasser (2:1:2)	74.8	83.0	— ^a
II 40% Methanol mit 1% Weinsäure	81.1	83.5	84.1
IV Äthanolische Schwefelsäure	73.4	80.2	86.7

^a Für Chanoclavin und auch Agroclavin liegen nur Ergebnisse mit Arbeitsweise B vor (92.8% bzw. 89.4%).

Diese Eluentien besitzen ausreichende Anwendungsbreite innerhalb der einzelnen Alkaloidtypen und bei Alkaloidmischungen und liefern unter konstanten Arbeitsbedingungen reproduzierbare Ergebnisse (Tabellen IV–VIII). Beim Vergleich der in den Messreihen für ein Alkaloid nach dem jeweiligen Verfahren erstellten Mittelwerte (*t*-Test) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Streuung der verglichenen Serien, als Mass für die Genauigkeit (*F*-Test = Vergleich der Standardabweichungen), erweist sich als abhängig von der aufgetragenen Konzentration. Im höheren Konzentrationsbereich werden genauere Werte erzielt.

Für diese drei Verfahren besteht im gut messbaren Extinktionsbereich Linearität zwischen der aufgetragenen und wiedergefundenen Alkaloidkonzentration. Die proz. Rückgewinnung steigt im allgemeinen proportional zur applizierten Alkaloidkonzentration an. Beim Vergleich der durchschnittlich gemessenen Konzentrationen (%) der drei Alkaloide wird ein Anstieg der Werte vom Ergotamin über Ergometrin zum Chanoclovin deutlich, also ein Zusammenhang zwischen R_F -Wert bzw. Laufstrecke und der proz. Rückgewinnung. Bei der Auswertung der Alkaloidmischungen ergibt sich, dass die mittleren gemessenen Konzentrationen recht gut mit den Ergebnissen der Einzelalkaloidserien im Einklang stehen (insbesondere bei Versuch 1). Die proz. Aufschlüsselung in die Einzelalkaloide ergibt hier jedoch nicht die vorher beschriebenen Proportionen, sondern generell verhältnismässig niedrige Ergometrinwerte. Somit ist es also nicht gleichbedeutend, ob Einzelalkaloide oder Alkaloidgemische zur quantitativen DC vorliegen.

Schlussfolgerungen

Sehr viele Faktoren vermögen die DC Ergebnisse zu beeinflussen, von denen einige in den Vorversuchen überprüft wurden (Laufstrecke, Plattengrösse, Adsorbentien). Hierzu kommen die Dosiergenauigkeit der jeweils verwendeten Auftragegeräte sowie die Auftragevorrichtung überhaupt, die zur Herstellung der Testlösung eingesetzten Lösungsmittel und das Chromatographiersystem. Weiterhin sind Kriterien, die die Chromatographie allgemein beeinträchtigen, wie Beschichtung der Platten, das Aktivieren, Licht-, Luft- und Temperatureinwirkung (auch in Anbetracht evtl. Isomerisierungen) zu bedenken. Mithin ist es auch nicht angängig, die Platten mit den Alkaloiden vor oder nach der Chromatographie längere Zeit im Licht und in der Laborluft aufzubewahren. Schliesslich muss die Messgenauigkeit des Gerätes für die photometrische Bestimmung in Betracht gezogen werden. Eigene Versuche ergaben bei Konzentrationen, die zu Extinktionen < 0.15 führten, keine auswertbaren Ergebnisse.

Im Zusammenhang mit der aufgetragenen Alkaloidkonzentration stehen die Länge und Breite des Alkaloidbandes auf der Platte und die zur Messung vorliegende Verdünnung der Alkaloidlösung. Von RÖDER und Mitarb.⁹ wurde die Menge des Elutionsmittels entsprechend der jeweils zu extrahierenden Alkaloidmenge gevariiert, um Extinktionswerte im günstigen Messbereich zu erhalten und ein Verdünnen der blauen Farblösung zu umgehen. Unserer Meinung nach ist jedoch das zur Elution eingesetzte Lösungsmittelvolumen ebenfalls von Einfluss auf die Ergebnisse. Wir eluierten daher grundsätzlich mit 2 ml Eluens und arbeiteten in einem gut messbaren Konzentrationsbereich. Bei der Chromatographie von Alkaloidmischungen dürften sehr hohe Einzelalkaloidkonzentrationen ohnehin die einwandfreie Trennung und exakte Erfassung durch Bildung grosser Flecke bzw. breiter Zonen erschweren. Die

Tatsache, dass wir mit Lösungen konstanter Konzentrationen arbeiteten und somit das aufzutragende Lösungsmittelvolumen mit der aufzutragenden Alkaloidkonzentration steigern mussten, führte zwangsläufig zu langen Bändern. So verwendeten wir zehn Platten für eine Serie, die jeweils nur mit einer Probe belastet waren, was sich nicht nur auf die wiedergefundene Alkaloidmenge, sondern vor allem auch auf die Streuungsmasse auswirken musste. Hier liegen Ursachen für die in vorliegender Arbeit vergleichbar niedrigen Werte* in Gegenüberstellung zu den Ergebnissen von RÖDER und Mitarb.⁹ Diese Aussagen unterstreichen den Einfluss der individuellen Arbeitsbedingungen auf die Ergebnisse der quantitativen DC. Es kann daraus geschlossen werden, dass eine Bestimmungsmethode mittels DC wohl kaum als Absolutmethode auszuweisen und ein direkter Vergleich eines von zwei verschiedenen Autoren durchgeführten Verfahrens nur schwer möglich ist. In jedem Fall empfiehlt es sich, die eigene Arbeitsmethodik durch entsprechende Eichkurven festzulegen.

Unsere breit angelegten Überprüfungen bestätigen, dass einzelne Verfahren der quantitativen DC von Mutterkornalkaloiden bei Beachtung aller vorher erwähnten Kriterien durchaus verlässliche Ergebnisse erwarten lassen. Hierfür scheinen sich besonders wässrig-alkoholische (Methanol oder Äthanol) Extraktionsmittel zu eignen, denen organische oder anorganische Säuren, wie Weinsäure, Essigsäure und Schwefelsäure, zugefügt sein müssen. Unabhängig von den in der Literatur beschriebenen Verfahren führten wir darüber hinaus orientierende Versuche durch, wobei sich eine Mischung, die 1.8% Salzsäure (Methanol-Wasser, 1:1, und 1.8% Salzsäure, 37%) enthielt, besonders bewährte. Mit diesem Eluens erzielten wir auf kleinen DC-Platten bei Laufstrecken zwischen 8–15 cm Ergotaminkonzentrationen von 86.9% (Kieselgel G), 83.4% (Kieselgel H) und 87.4% (Aluminiumoxid D).

DANK

Für die gewissenhafte Mitarbeit bei der Durchführung der Analysen danken wir Frau W. HAASLER und Frau cand. pharm. H. SCHRÖDER.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden Verfahren zur quantitativen Erfassung von Mutterkornalkaloiden vom Peptid-, Alkanolamid- und Clavintyp (Ergotamin, Ergometrin, Chanoclavin-(I) sowie entsprechende Alkaloidmischungen) mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Nach Extraktion der Alkaloide aus den Trägeradsorbentien (Kieselgel und Aluminiumoxid) erfolgte die photometrische Bestimmung. Von fünf in Serienanalysen erprobten Elutionsmitteln erwiesen sich drei als geeignet. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet. Die quantitative Rückgewinnung erwies sich als abhängig von verschiedenen Kriterien, so von der Laufstrecke und dem R_F -Wert des Einzelalkaloids, von der Länge und Breite des chromatographierten Alkaloidbandes, von der Konzentration der applizierten Alkaloidlösung, von der Art und Weise des Auftragens, teilweise vom Adsorbens sowie von zahlreichen die Dünnschichtchromatographie allgemein beeinträchtigenden Faktoren. Eine Abhängigkeit vom Typ des Alkaloids ist weitgehend auszuschliessen, nicht jedoch der Einfluss der individuellen Arbeitsbedingungen.

* Die Verwendung der Salze des Ergotamins und Ergometrins wirkte sich nicht nachteilig auf die Genauigkeit der Bestimmungen aus, wie Vergleichsanalysen bewiesen.

LITERATUR

- 1 W. KINZE, *Pharm. Zentralhalle*, 104 (1965) 705.
 - 2 J. SEYFRIED, *Dissertation*, Mainz, 1960.
 - 3 M. KLAVEHN, H. ROCHELMMEYER UND J. SEYFRIED, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 101 (1961) 75.
 - 4 J. L. McLAUGHLIN, J. E. GOYAN UND A. G. PAUL, *J. Pharm. Sci.*, 53 (1964) 306.
 - 5 V. E. TYLER, JR., D. ERGE UND D. GRÖGER, *Planta Med.*, 13 (1965) 315.
 - 6 M. ZINSELER UND CH. BAUMGÄRTEL, *Arch. Pharm.*, 297 (1964) 158.
 - 7 M. SAHLI UND M. OESCH, *Pharm. Acta Helv.*, 40 (1965) 25.
 - 8 L. WICHLIŃSKI UND Z. SKIBIŃSKI, *Farm. Pol.*, 22 (1966) 194.
 - 9 K. RÖDER, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMMEYER, *Pharm. Acta Helv.*, 42 (1967) 407.
 - 10 W. A. TABER, L. C. VINING UND R. A. HEACOCK, *Phytochemistry*, 2 (1963) 65.
 - 11 LIAN-NIANG LI, UND QI-CHENG FANG, *Acta Pharm. Sin.*, 11 (1964) 189.
 - 12 V. PROCHÁZKA, F. KAVKA, M. PRŮCHA UND J. PITRA, *Česk. Farm.*, 13 (1964) 493.
 - 13 E. M. KARÁCSONYI UND B. SZARVADY, *Planta Med.*, 11 (1963) 169.
 - 14 S. KEIPERT, *Dissertation*, Berlin, 1969.
 - 15 S. AGURELL, *Acta Pharm. Suec.*, 2 (1965) 357.
 - 16 J. ZARNACK UND S. PFEIFER, *Pharmazie*, 19 (1964) 216.
 - 17 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch*, 2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
 - 18 R. VOIGT, *Mikrochim. Acta*, 1959, 619.
 - 19 K. DOERFFEL, *Statistik in der analytischen Chemie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1966.
 - 20 V. PROCHÁZKA, F. KAVKA, M. PRŮCHA UND J. PITRA, *Česk. Farm.*, 15 (1966) 363.
- J. Chromatogr.*, 64 (1972) 327-340