

Note

Zur Trennung der Digitalis-Cardenolide mit Hilfe der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie

TH. KARTNIG und P. KOBOSIL

Institut für Pharmakognosie der Universität Graz, 8010 Graz (Österreich)

(Eingegangen am 15. Februar 1977)

Die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) wird im zunehmenden Masse in der Analytik von Pflanzenstoffen verwendet. Bei unseren Untersuchungen über das Vorkommen von Cardenoliden in Gewebekulturen von *Digitalis purpurea* und *lanata*^{1,2} benützten wir das kombinierte säulenchromatographisch (SC)–papierchromatographische (PC) Verfahren nach Kaiser³ sowie die Systeme nach Kartnig und Nöhammer⁴, Khafagy und Girgis⁵ und Sjöholm⁶. Die relativ geringe Konzentration an Cardenoliden in den gezüchteten Geweben (ca. 10⁻⁵–10⁻⁴%) machten es nötig, für eine Gesamtanalyse von 200 bis 250 g Gewebe auszugehen. Um mit möglichst wenig Gewebe für eine chemische Untersuchung auszukommen (und damit auch die Zeit für die Züchtung des Gewebes zu senken), haben wir —unter Wahrung des Verhältnisses von Extrakt zu Silicagel— die SC Vortrennung nach Kaiser³ in kleineren Dimensionen durchgeführt und die Papierchromatographie (PC) durch die HPTLC ersetzt.

EXPERIMENTELLES

Als Sorptionsschicht benützen wir HPTLC-Kieselgel-Schichten 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, B.R.D.), imprägniert mit Formamid (die Imprägnierung erfolgt durch Entwickeln mit Formamid in Aceton ohne Sättigung der Entwicklungskammer. Das Aceton wird durch kurzes Abblasen mit Kaltluft vertrieben und die Platte anschliessend im Exsiccator über 30 min getrocknet). Die Cardenolide werden aus Chloroform–Methanol (1:1) für die qualitative Analyse mit einem Auftragegerät für die Dünnschichtchromatographie (DC) von Merck (Mikrokapillare 0.75 µl; Inhalt in 5–7 Portionen aufbringen) und für die quantitative Analyse mit einer Platin–Iridium-Festvolumen-Auftragekapillare für die HPTLC (0.1 µl) der Fa. Antech (Bad Durkheim, B.R.D.) aufgetragen. Als Fliessmittelgemische benützen wir die Systeme Xylol–Methyläthylketon und Chloroform–Tetrahydrofuran–Formamid, wobei jedoch die mengenmässigen Zusammensetzungen gegenüber der PC (siehe Kaiser³) geändert werden mussten.

Die Detektion erfolgt durch Besprühen mit Trichloressigsäure und Betrachten im UV-Licht; die Farbe der Flecken verblasst relativ rasch (3–5 Min).

Qualitative Analyse

Die im Vakuum eingedampften SC Fraktionen werden in Chloroform–

Methanol (1:1) aufgenommen und entsprechend eingengt, so dass $0.75 \mu\text{l}$ ca. 50 ng des jeweiligen Cardenolides enthalten. Scrtptionsschicht: HPTLC-Kieselgel-Schichten 60 F₂₅₄ (Merck). Plattengröße: 5×10 oder 10×10 cm. Plattenimprägnierung: 2 ml Formamid in 10 ml Aceton. Die Platte wird sofort nach Bereitung des Imprägnierungsmittels, ohne Sättigung der Kammer, durch Entwickeln imprägniert (für jede Imprägnierung Imprägnierungsgemisch frisch bereiten); Laufzeit ca. 30 min (die Acetonfront ist am Plattenende, die Formamidfront liegt 1–2 cm darunter). Danach kühl abblasen und 30 min im Exsiccator trocknen. Auftragegerät für die DC (Fa. Merck); Mikrokapillare $0.75 \mu\text{l}$. Abstand der Startlinie vom unteren Plattenrand ca. 7 mm, Abstand der Startpunkte voneinander ca. 5 mm (für quantitative Auswertung 8–10 mm). Durchmesser der Startpunkte ca. 1 mm. Fliessmittel 1 (für SC-Fractionen 1–10 nach Kaiser³): Xylol–Methyläthylketon (7:10.5); Fliessmittel 2: (für SC-Fractionen 11–23 nach Kaiser³): Chloroform–Tetrahydrofuran–Formamid (5:11:0.5). Laufstrecke ca. 7 cm, Laufzeit für FG₁ ca. 10 min, für FG₂ 15–20 min; Schwankungen je nach Plattencharge und -größe möglich. Entwicklungskammer: Glasbehälter mit kompaktem Schraubverschluss, Höhe 11–12 cm, Durchmesser 6–7 cm; Boden leicht pombiert, so dass in der Mitte die Lösungsmittelhöhe etwa 4–5 mm. Zimmertemperatur; Kammersättigung 1 h. Nach dem Entwickeln wird 30 min bei 120° getrocknet; Detektion mit Trichloressigsäure-Reagens nach Aldrich und Mitarbeitern⁷. Nach dem Besprühen wird 5 min auf 120° erhitzt. Nachweisgrenze für Aglykone ca. 3 ng bzw. 30 ng (ohne bzw. mit Erkennung der typischen Fluoreszenzfarbe); Nachweisgrenze für Tetraoside: ca. 5 ng bzw. ca. 50 ng (ohne bzw. mit Erkennung der typischen Fluoreszenzfarbe).

Quantitative Analyse

Auftragen der Cardenolidlösungen mittels Platin–Iridium-Festvolumen-Auftragekapillare für die HPTLC ($0.1 \mu\text{l}$) der Fa. Antech. Nach Entwickeln der Platten Entfernen des FG durch kurzes Abblasen; Vertreiben des Formamid durch Erhitzen auf 120° über 30 min. Spektralphotometer PMQ II (Fa. Zeiss) mit Zusatz zur Direktauswertung, jedoch ohne Spezialzusatz für die HPTLC. Schreiber: Servogor S, 5 mV; Messung bei 225 nm⁸; untere Messgrenze für Aglykone ca. 30 ng; untere Messgrenze für Tetraoside ca. 50 ng. Relative Standardabweichung für Auftragen, Entwickeln und Messen für je 150 ng bei Digitoxigenin $\pm 2.37\%$, für Purpureaglykosis A $\pm 4.29\%$.

ERGEBNISSE

Mit dem vorgeschlagenen HPTLC-System gelingt nach vorangegangener SC Fraktionierung eine scharfe Trennung der in *D. purpurea* und *lanata* vorkommenden Cardenolide. Die R_F -Werte der uns zur Verfügung stehenden Cardenolide sind in Tabelle I zusammengefasst.

Bei der Analyse der Cardenolide aus den Gewebekulturen von *D. purpurea* und *lanata* sowie aus Frischpflanzen und Drogen konnten aus einigen SC Fractionen mittels der HPTLC mehr Cardenolide nachgewiesen werden als mit der PC, da die Flecken schärfer getrennt sind.

Die quantitative Bestimmung der Cardenolide durch Messung der UV-Absorption in Remission auf HPTLC-Schichten scheint nach unseren orientierenden

TABELLE I

R_F-WERTE EINIGER CARDENOLIDE

<i>Cardenolid</i>	<i>R_F</i>	<i>Fließmittel</i>
Digitoxigenin	0.71	1
Evatromonosid	0.64	1
Odorosid H	0.25	1
Digitoxin	0.57	1
Lanatosid A	0.70	2
Purpureaglykosid A	0.52	2
Gitoxigenin	0.44	1
Gitorosid	0.36	1
Strosposid	0.10	1
Digitalinum verum	0.07	2
Gitoxin	0.30	1
Lanatosid B	0.53	2
Purpureaglykosid B	0.28	2
Digoxigenin	0.31	1
Digoxin	0.18	1
Lanatosid C	0.42	2
Gitaloxigenin	0.61	1
Lanadoxin	0.54	1
Verodoxin	0.20	1
Glucoverodoxin	0.15	2
Gitaloxin	0.47	1

Versuchen möglich (siehe Fig. 1). Allerdings stand uns der Zusatz für die Direktauswertung der HPTLC zum Spektralphotometer PMQ II (Fa. Zeiss) noch nicht zur Verfügung. Die Messungen mit Reinsubstanzen zeigten folgendes: Das Formamid wird durch Erhitzen auf 120° über 30 min entfernt. Verbleibende geringe Reste stören

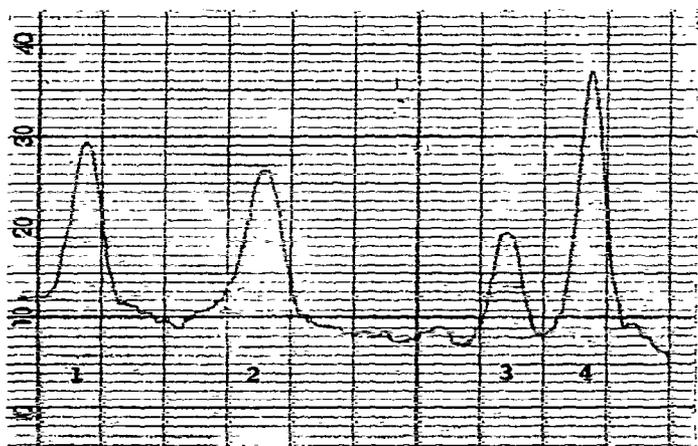


Fig. 1. Messkurven von vier chromatographisch getrennten Cardenolid-Aglykonen (je 50 ng). Messparameter (Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss): Monochromatorspalt, 1 mm; Spaltblende, 6 mm; Dämpfung, I; Verstärkung, 4/1/III/F; Signal mit Simultanzusatz gespreizt (Stufe 2); $v_T = 20$ mm; $v_F = 30$ mm. 1 = Digoxigenin; 2 = Gitoxigenin; 3 = Gitaloxigenin; 4 = Digitoxigenin.

nicht, da sie durch die Ermittlung des Blindwertes (Nullpunktautomatik) kompensiert werden. Die Messung bei 225 nm erfordert eine präzise Einstellung der Messparameter. Aglykone können bis zu einer Menge von 30 bis 25 ng (10^{-9} g) quantitativ erfasst werden. Mit zunehmender Zahl der glykosidisch gebundenen Zucker nimmt die Nachweisgrenze ab und beträgt etwa bei Purpureaglykosid A 60–50 ng. Die relative Standardabweichung beträgt für das Digitoxigenin $\pm 2.37\%$, für Purpureaglykosid A $\pm 4.29\%$ bei jeweils 150 ng Substanz. Nach unseren Beobachtungen ist vor allem die Genauigkeit beim Auftragen entscheidend für die Genauigkeit der quantitativen Aussage. Für die Genauigkeit der ganzen Bestimmung sind noch die Abweichungen bei der Extraktion, beim Einengen und Aufnahmen mit Chloroform-Methanol (1:1) und der SC Vortrennung einzubeziehen.

In Fig. 2 sind die Eichkurven von 4 Cardenolidaglykonen zusammengefasst. Die Eichkurven der Mono-, Bis- und Tridigitoxoside des Digitoxigenin sowie des Purpureaglykosid A wurden als Modelle für entsprechende Glykosidtypen erstellt. Es erwies sich als günstig, die Parameter für jede Verbindung gesondert zu wählen. Prinzipiell sind jedoch die Messungen sämtlicher Aglykone und Glykoside bis zu den Tetraosiden möglich, wenn auch für letztere die Erfassungsgrenze und Genauigkeit weniger befriedigend sind. Wie Messungen von uns entwickelter Chromatogramme bei der Fa. Zeiss ergaben, kann durch die Verwendung eines Spezialzusatzes für die HPTLC die Erfassungsgrenze gesenkt werden. Die Grenzen für die quantitative Bestimmung werden entsprechend verbessert.

Die Bestimmung der Cardenolide aus Drogenextrakten wurde bisher nur orientierend durchgeführt. Abzuklären ist noch die Auswirkung verschiedener Ver-

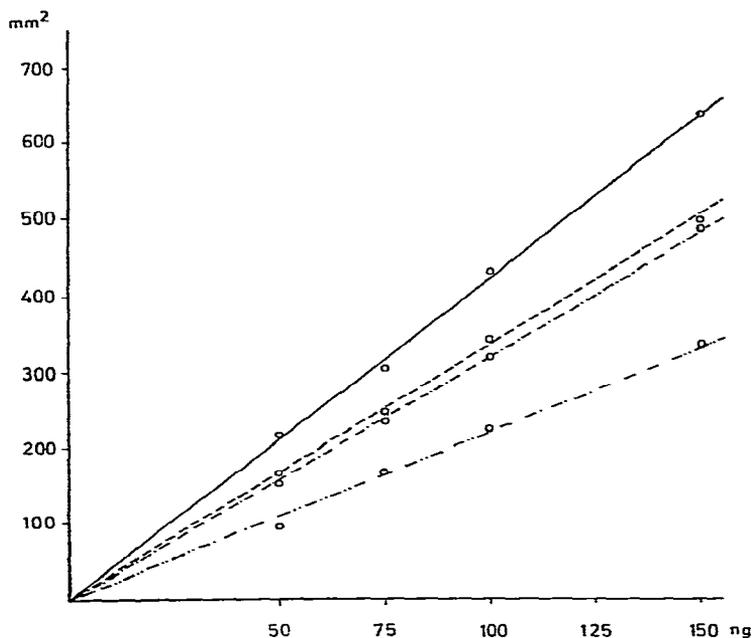


Fig. 2. Eichkurven von vier Cardenolid-Aglykonen. —, Digitoxigenin; ---, Gitoxigenin; - · - ·, Digoxigenin; · · · ·, Gitaloxigenin.

unreinigungen auf die Lage der Grundlinie, da die Verunreinigungen in den einzelnen Fraktionen der SC Vortrennung verschieden sind und auch vom Untersuchungsmaterial (Frischpflanze, Droge, Gewebe aus Oberflächen- oder Submerskulturen) abhängen (Gegenstand einer weiteren Mitteilung).

DANK

Herrn Dr. F. Kaiser (Fa. Böhringer, Mannheim) und der Fa. Sandoz danken wir ergebenst für die freundliche Überlassung von Cardenolid-Reinsubstanzen.

Wir danken der Fa. Zeiss für die Durchführung der Spektralmessungen.

LITERATUR

- 1 Th. Kartnig, U. Russheim und B. Maunz, *Planta Med.*, 29 (1976) 275.
- 2 Th. Kartnig und P. Kobosil, *Planta Med.*, 31 (1977) 214.
- 3 F. Kaiser, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 299 (1966) 263.
- 4 Th. Kartnig und R. Nöhammer, *Sci. Pharm.*, 40 (1972) 110.
- 5 S. M. Khafagy und A. N. Girgis, *Planta Med.*, 25 (1974) 350.
- 6 I. Sjöholm, *Sv. Farm. Tidskr.*, 66 (1962) 321.
- 7 B. J. Aldrich, M. L. Frith und S. E. Wright, *J. Pharm. Pharmacol.*, 8 (1956) 1042.
- 8 E. Fancher, Th. Prey und F. Wurst, *Planta Med.*, 29 (1976) 393.