

CHROM. 11,923

Note

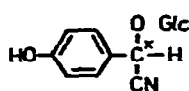
Qualitative und quantitative Bestimmung der Cyanglucoside Triglochinin, Taxiphyllin und Dhurrin mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie

ADOLF NAHRSTEDT

Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität, D-3300 Braunschweig (B.R.D.)

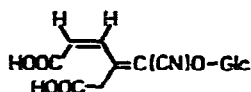
(Eingegangen am 22. März 1979; geänderte Fassung eingegangen am 12. April 1979)

Triglochinin und die epimeren *p*-Hydroxymandelsäurenitrilglucoside Dhurrin bzw. Taxiphyllin (Fig. 1) sind in verschiedenen Pflanzen vergesellschaftet aufgefunden worden¹.

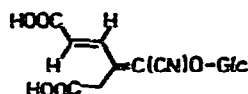


* (R): Taxiphyllin

* (S): Dhurrin



Triglochinin



Isotriglochinin

Fig. 1. Strukturen von Taxiphyllin, Dhurrin, Triglochinin und Isotriglochinin.

Zwischen den Cyanglycosiden mit intaktem Aromaten und Triglochinin scheinen metabolische Beziehungen zu bestehen¹. Es sollte deshalb eine einfache und schnelle Methode entwickelt werden, die es gestattet, derartige cyanogene Glycoside qualitativ und quantitativ zu bestimmen und sie gleichzeitig für weitere Untersuchungen zu isolieren. Versuche mit gaschromatographischen Systemen, die zur Trennung von Cyanglycosiden eingesetzt werden^{2,3}, sowie der *in situ* Bestimmung auf dünnschichtchromatographische Platten mittels Remissionsspektroskopie scheiterten einerseits an der notwendigen Derivatisierung sowie der Temperaturlabilität von Triglochinin, andererseits an der zu geringen Reinheit einfach herstellbarer Extrakte. Kürzlich wurde ein Hochdruckflüssigkeitschromatographie(HPLC)-System zur Trennung epimerer Benzaldehydcyanhydringlycoside mit Erfolg eingesetzt⁴. Im folgenden wird über eine HPLC-Methode berichtet, mit der Triglochinin und Taxiphyllin bzw. Dhurrin an Lichrosorb RP-18 qualitativ und quantitativ bestimmbar sind.

EXPERIMENTELLES

Triglochinin wurde aus verschiedenen *Araceen* gewonnen⁵, Dhurrin wurde aus Keimlingen von *Sorghum bicolor*, Taxiphyllin aus den Blättern von *Taxus baccata* nach Methanol-Extraktion, Reinigung an Polyvinylpyrrolidon und präparativer

HPLC rein dargestellt. 3-Hydroxybenzoesäure (EGA, Steinheim, B.R.D.) und Tyrosin (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) entstammen dem Chemikalienhandel. Extrakte von *Triglochis maritima*-Keimlingen (ca. 200 mg) wurden wie folgt hergestellt: 2–8 Tage alte Keimlinge wurden gefriergetrocknet, kalt am Ultra-Turrax (Jahnke und Kunkel, Staufen, B.R.D.) mit Methanol extrahiert, der Methanol am Rotationsverdampfer entfernt, der feuchte Rückstand mit 1.00 ml einer 1.0 mM wässrigen 3-Hydroxy-benzoesäurelösung aufgenommen, durch ein Membranfilter (0.6 μm) filtriert und das Filtrat direkt zur Chromatographie eingesetzt.

Das HPLC-System bestand aus Systemkomponenten der Firma Knauer (Berlin, B.R.D.) mit einer Pumpe (Modell FR-30), einem Gradientenformer, einem Spektrophotometer, einem Rheodyne-Injektionssystem sowie einem 2-Kanalschreiber. Chromatographiert wurde an LiChrosorb RP-18 Fertigsäulen (analytische Säule 25×0.46 cm, 10 μm ; halbpräparative Säule 25×0.8 cm, 7 μm) der Firma Knauer.

ERGEBNISSE

Vorversuche mit verschiedenen Eluentien (Mischungen aus Methanol, Acetonitril jeweils mit Wasser und Essigsäure) ergaben, dass als mobile Phase Wasser–Acetonitril–Essigsäure (95:4.5:0.5) (pH 2.8) gute Resultate liefert. Bei isobarem Betrieb an der analytischen Säule mit 1.2 ml/min wird Triglochinin ($t_R = 11.7$ min) von seinen (artifizialen?) Isomeren (Isotriglochinin (Fig. 1): 8.8 min; ein weiteres Triglochinin-Isomeres: 6.9 min) getrennt sowie die epimeren Glucoside Taxiphyllin ($t_R = 17.8$ min) und Dhurrin ($t_R = 20.7$ min) ausreichend separiert. An der RP-Phase verhält sich das Epimerenpaar erwartungsgemäss umgekehrt wie an SiO_2 -Phasen, bei denen die (S)-Form (Dhurrin) vor der (R)-Form (Taxiphyllin) eluiert wird⁴. Die Suche nach einer Standardsubstanz, die sowohl in ihren spektralen als auch in ihren Elutionseigenschaften den zu bestimmenden Substanzen ähnlich ist, führte zum Einsatz der relativ selten natürlich vorkommenden 3-Hydroxybenzoesäure. Andere getestete Verbindungen entsprachen entweder nicht den spektralen Anforderungen (Arbutin, Salicin) oder wiesen wesentlich zu grosse (Benzoesäure, Methylhydrochinon, 2-Hydroxybenzoesäure) oder zu kleine Retentionszeiten (4-Hydroxybenzoesäure) auf. Auch 3-Hydroxybenzoesäure wurde bei isobarem Betrieb spät eluiert. Zur Verkürzung der Analysendauer unter Erhaltung der Trennleistung wurde deshalb ein Strömungsprogramm von 1–2.5 ml/min gewählt, das zudem den Vorzug hat, mit nur einer Pumpe zu arbeiten: die Gesamtanalysenzeit beträgt 32 min, die von dem verwendeten Gradientenformer in acht Zeitabschnitt eingeteilt werden. Zunächst wird isobar 4 min mit 1 ml/min (40% von 2.5 ml) eluiert, dann innerhalb von drei Zeitabschnitten (12 min) die Strömungsgeschwindigkeit auf 1.25 ml/min (= 50%), 1.875 ml/min (= 75%) und schliesslich 2.5 ml/min (= 100%) erhöht und weitere 12 min isobar mit 2.5 ml/min chromatographiert. Im letzten Zeitabschnitt von 4 min wird das System auf die Anfangsgeschwindigkeit von 1 ml/min zurückgeführt. Retentionsdaten und Kapazitätsfaktoren der Reinsubstanzen in diesem System sind in Tabelle I angegeben; Fig. 2 zeigt ein Chromatogramm der Reinsubstanzen sowie das eines Extraktes aus *Triglochis maritima*. Wird ein solcher Extrakt mit Triglochinin- bzw. Taxiphyllin-spezifischer β -Glucosidase¹ behandelt, verschwinden die Signale 3 und 4 vollständig. Tabelle I belegt, dass auch Tyrosin als eventuelle

TABELLE I

GESAMT- (t_R) UND NETTORETENTIONSZEITEN (t'_R) UND KAPAZITÄTSFAKTOREN (k')

System: LiChrosorb RP-18, 25×0.46 cm; Wasser-Acetonitril-Essigsäure (95:4.5:0.5); Strömungsprogramm 1–2.5 ml/min (s. Text). t_0 = Totzeit. Für die zur quantitativen Bestimmung eingesetzten Substanzen ist der molare Extinktionskoeffizient (ϵ) bei der Detektionswellenlänge 232 nm angegeben.

Substanz	t_R (min)	t'_R (min)	k'	ϵ (232 nm) (Wasser)
Wasser	3.75 (= t_0)	—	—	—
Triglochinin-Isomeres	6.4	2.65	0.71	
Isotriglochinin	7.7	3.95	1.05	
Tyrosin	7.8	4.05	1.08	
Triglochinin	10.35	6.6	1.76	$5.75 \cdot 10^3$
Taxiphyllin	15.3	11.55	3.08	$9.74 \cdot 10^3$
Dhurrin	16.35	12.6	3.36	$1.05 \cdot 10^4$
3-Hydroxybenzoesäure	26.4	22.65	6.04	$6.29 \cdot 10^3$

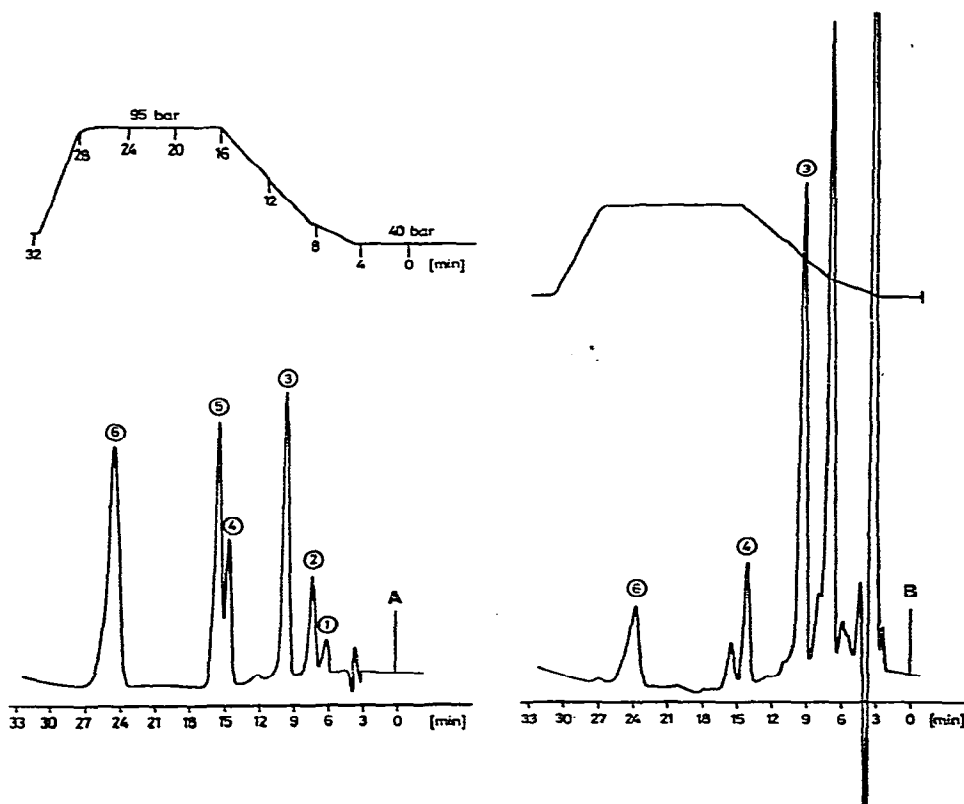


Fig. 2. Chromatogramm der Reinsubstanzen (A) mit Triglochinin-Isomeres (1), Isotriglochinin (2), Triglochinin (3), Taxiphyllin (4), Dhurrin (5) und 3-Hydroxybenzoesäure (6) sowie eines Extraktes von *Triglochin maritima* (B). Bedingungen wie in Tabelle I; Detektion bei 232 nm; Vollausschlag $E = 0.06$. Obere Linie: Darstellung des Strömungsprogrammes durch Aufzeichnung der Druckänderung im System.

biogenetische Vorstufe dieser Cyanglycoside von Triglochinin ausreichend, von Isotriglochinin jedoch nicht separiert wird. Die Detektion erfolgt bei 232 nm. In diesem Bereich befinden sich die Maxima von Taxiphyllin und Dhurrin; Triglochinin besitzt hier ein Minimum mit ausreichender Absorption und 3-Hydroxybenzoesäure eine Schulter vor der Endabsorption. In diesem Bereich liegt danach eine für quantitative Messungen ausreichende Konstanz von ϵ vor. (s. Fig. 3 und Tabelle I).

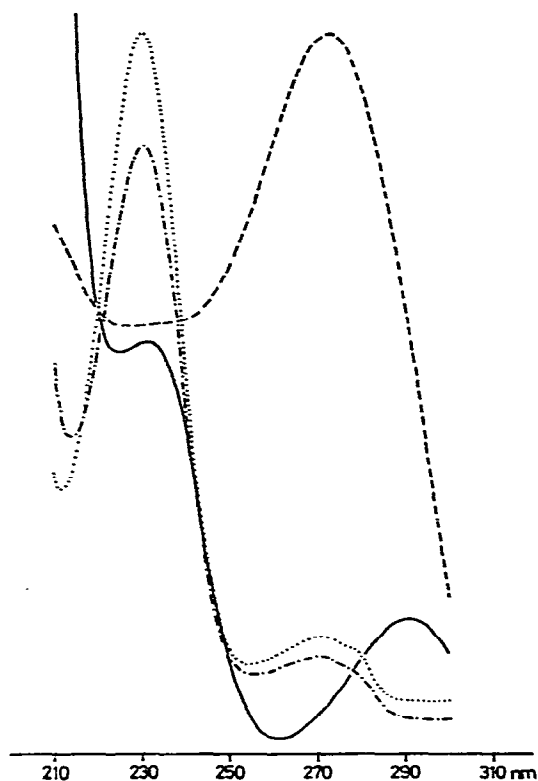


Fig. 3. Absorptionsspektren von Triglochinin (---), Dhurrin (...), Taxiphyllin (-.-.-) und 3-Hydroxybenzoesäure (—) zwischen 210 und 300 nm (O-Punkt versetzt).

Mit insgesamt 14 Testmischungen mit Konzentrationen zwischen 0.1 und 1.2 $\mu\text{mol/ml}$ (Dosierung *ca.* 10 μl bei $E = 0.06$ Vollausschlag) wurde der molare Standardkorrekturfaktor gegen 3-Hydroxybenzoesäure ermittelt. Er betrug im vorliegenden System für Triglochinin $0.75 \pm 3\%$, für Taxiphyllin $0.76 \pm 4\%$ und für Dhurrin $0.74 \pm 2.5\%$. Die Auswertung der Signale erfolgte durch Höhe \times Breite in halber Höhe.

Mit dieser Methode wurden Triglochinin und Taxiphyllin aus Extrakten von *Triglochin-maritima*-Keimlingen bestimmt. Triglochinin-Isomere wurden in einige Tage alten Keimpflanzen zu höchstens 4% der Gesamt-Triglochinin-Menge gefunden. Die Probelaufe zeigten, dass die quantitativen Ergebnisse gut mit denjenigen übereinstimmen, die mit der wesentlich aufwendigeren Methode¹ (dünnschichtchromatographische Isolierung der Einzelsubstanzen und Bestimmung der enzymatisch abspaltbaren Blausäure) erhalten wurden. Für die Isolierung der Glycoside wurde eine

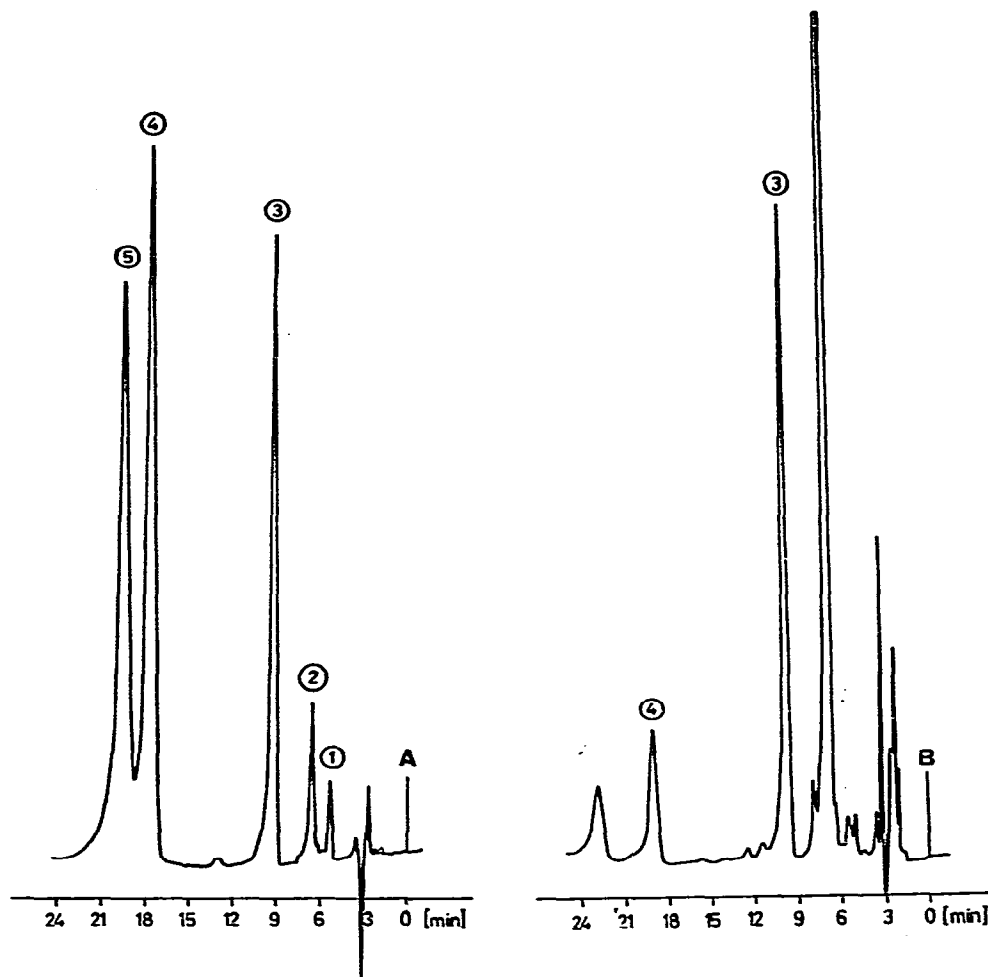


Fig. 4. Chromatogramm der Reinsubstanzen (A) und eines Extraktes aus *Triglochin maritima* (B) an Lichrosorb RP-18 (25×0.8 cm, $7 \mu\text{m}$); isobar, 3.5 ml/min, 232 nm, Vollausschlag $E = 0.5$. 1 = Triglochinin-Isomeres; 2 = Isotriglochinin; 3 = Triglochinin; 4 = Taxiphyllin; 5 = Dhurrin.

halbpräparative (25×0.8 cm, $7 \mu\text{m}$) RP-18-Säule mit dem o.a. Eluent bei isobarer Arbeitsweise mit 3.5 ml/min verwendet und jeweils Aliquots des unter Experimentelles beschriebenen Extraktes ohne Zusatz von 3-Hydroxybenzoesäure eingesetzt. Fig. 4 zeigt ein entsprechendes Chromatogramm der Reinsubstanzen sowie eines Extraktes aus *T. maritima*.

DANK

Fräulein Ch. Forth danke ich für wertvolle technische Mitarbeit.

LITERATUR

- 1 A. Nahrstedt, W. Hösel, A. Walther, *Phytochemistry*, 18 (1979) 1137.
- 2 A. Nahrstedt, *J. Chromatogr.*, 50 (1970) 518.
- 3 A. Nahrstedt, *Planta Med.*, 24 (1973) 83.
- 4 A. Nahrstedt, *J. Chromatogr.*, 152 (1978) 265.
- 5 R. Eyjolfsson, *Phytochemistry*, 9 (1970) 854.