

CHROM. 12,412

## Note

### Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung von Galanthamin in Drogenextrakten von *Leucojum aestivum*

FRIEDRICH WURST, THEODOR PREY, LEOPOLD PUCHINGER und ENGELBERT BANCHER

Institut für Botanik, Technische Mikroskopie und Organische Rohstofflehre, Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9, A-1060 Wien (Österreich)

(Eingegangen am 14. August 1979; geänderte Fassung eingegangen am 4. Oktober 1979)

Die quantitative Bestimmung von Galanthamin und verwandten Alkaloiden in Drogenextrakten erfolgt neben der Ionenaustauschchromatographie<sup>1</sup>, Säulenchromatographie<sup>2</sup>, Elektrophorese<sup>3</sup> und Kolorimetrie<sup>4</sup> auch mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC)<sup>5-8</sup>. Sandberg und Michel<sup>7</sup> benutzen die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie zu phytochemischen Studien der Alkaloidzusammensetzung in den einzelnen Organen von *Pancreaticum maritimum* L. Die quantitative Auswertung erfolgt nach Sprühen mit Dragendorff-Reagens, bei Sandberg und Michel<sup>7</sup> mit Platin(IV)chlorwasserstoffsäure. Bei Verwendung von Dragendorff-Reagens konnte durch zusätzliche Behandlung mit verdünnter Schwefelsäurelösung die Empfindlichkeit des Reagens im hohen Mass gesteigert werden. Mit Hilfe der Fleckengröße ist eine annähernd quantitative Schätzung möglich. In letzter Zeit werden für die Bestimmung der Amaryllidaceenalkaloide gaschromatographische Methoden benutzt<sup>9</sup>.

Im folgenden soll ein Verfahren beschrieben werden, das eine rasche und genaue quantitative Bestimmung von Galanthamin in Drogenextrakten ermöglicht. Durch die Messung der Remissionsminderung bei 288 nm auf der DC-Platte entfällt das Sprühen des Chromatogramms und damit auch die sich daran anschliessenden Schwierigkeiten bei der quantitativen Auswertung.

#### MATERIAL UND METHODIK

Drogenextraktion: 3 g getrocknete und in einem Mixer mit 100 ml Äthanol zerkleinerte Blätter von *Leucojum aestivum* werden mit zusätzlichen 70 ml Äthanol versetzt und bei 40° unter Vakuum mit einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit 250 ml 1%iger Salzsäure in einen mit Rührer und Kühler ausgestatteten Kolben gebracht und mit 100 ml Petroläther (120°) 30 min bei 40° gerührt. Danach wird filtriert, die Petroleumbenzinphase abgetrennt, die wässrige Phase mit 25%iger Ammoniaklösung auf pH 11 eingestellt und mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt oder perforiert. Die Chloroformphase wird zur Trockene eingengt und der Rückstand in 25 ml Chloroform aufgenommen; diese Lösung wird zur DC verwendet.

Die DC erfolgt auf Kieselgel G 60 Fertigplatten (Merck, Darmstadt, B.R.D.) im Laufmittelsystem Diäthyläther-Methanol-Diäthylamin (80:15:5) bei Kammer-sättigung. Pro Platte werden mit einer Hamilton-Spritze vier Punkte zu je 10  $\mu$ l einer Standardreihe, ebenso vier Punkte zu je 10  $\mu$ l einer Verdünnungsreihe des Drogen-extraktes aufgetragen. Die Platte wird im Laufmittelsystem einmal entwickelt.

Die getrockneten DC-Platten werden auf dem Chromatogrammspektralphoto-meter der Fa. Zeiss in der Messanordnung Lichtquelle-Monochromator-Probe-Emp-fänger vermessen und die Remissionsortskurven mit Hilfe eines angeschlossenen Potentiometerschreibers (Servogor RE 511) aufgezeichnet. Folgende Einstellgrößen am Gerät haben sich als günstig erwiesen: Wellenlänge: 288 nm; Spalthöhe: 6 mm; Spaltbreite: ca. 0.5 mm; Vorschubgeschwindigkeit des Kreuztisches und des Schreiber-papiers: 120 mm/min.

Die Messung erfolgt in Laufrichtung des Chromatogramms; dies bringt den Vorteil, dass Untergrundstörungen bei Drogen- und Frischpflanzenextrakten besser beurteilt werden können und dass eine "durchhängende" Laufmittelfront nicht stört. Ebenso kann man die Abtrennung der entsprechenden Substanz von Verunreinigungen genau verfolgen und danach am Papierstreifen die entsprechende Auswertung vor-nehmen; diese erfolgt durch Ausmessen und Berechnen der Peakflächen unter Ver-wendung einer unter gleichen Bedingungen erstellten Eichkurve.

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Fig. 1 und 2 zeigen die Chromatogramm-Messkurven für die Reinsub-stanz Galanthamin und einen Drogenextrakt, die eine für die quantitative Auswertung befriedigende Trennung erkennen lassen. Der der Reinsubstanz benachbarte niedrige Peak mit kleinerem  $R_F$ -Wert resultiert aus einer Verunreinigung der käuflichen Rein-

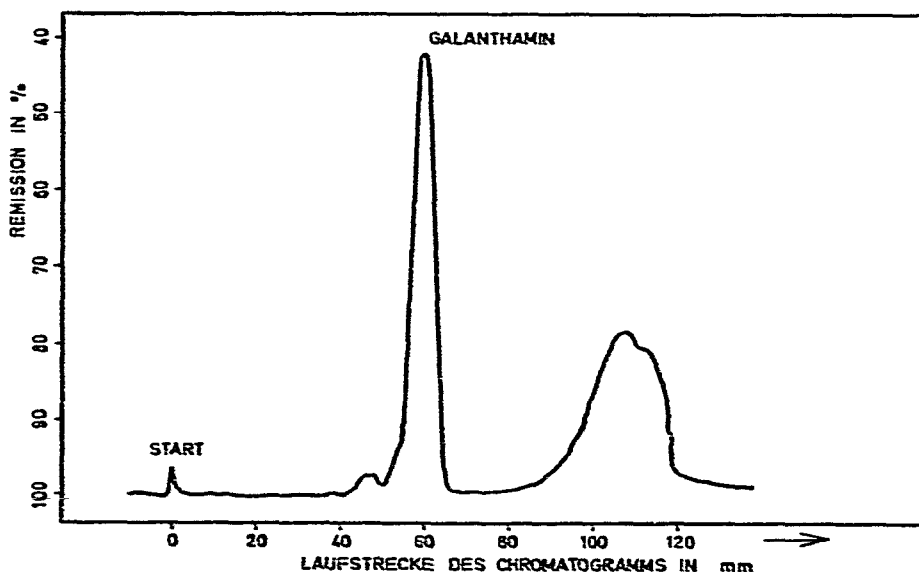


Fig. 1. Ortsremissionskurve der Reinsubstanz Galanthamin auf der DC-Platte.

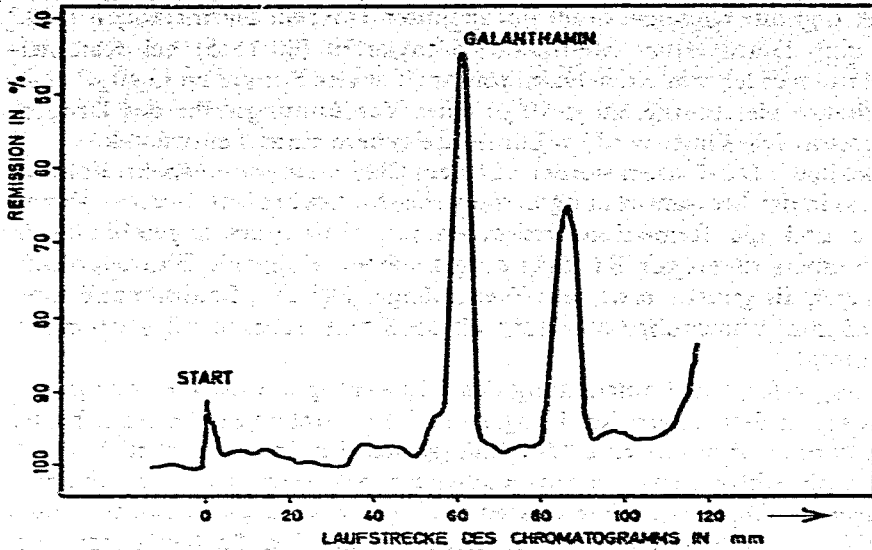


Fig. 2. Ortsremissionskurve eines chromatographierten Drogenextraktes.

substanz. Der breite Peak unterhalb der Laufmittelfront wird durch die Bindezusätze des Schichtmaterials verursacht, ist jedoch der Auswertung des Chromatogramms nicht weiter hinderlich. Der  $R_f$ -Wert der Reinsubstanz beträgt 0.50, die Laufzeit des Chromatogramms 45 min. Zur Auffindung der günstigsten Messwellenlänge wurde die Remissionsortskurve von  $20 \mu\text{g}$  Galanthamin im Wellenlängenbereich von 210 bis 305 nm aufgezeichnet und deren jeweilige Fläche berechnet (Fig. 3). Aus

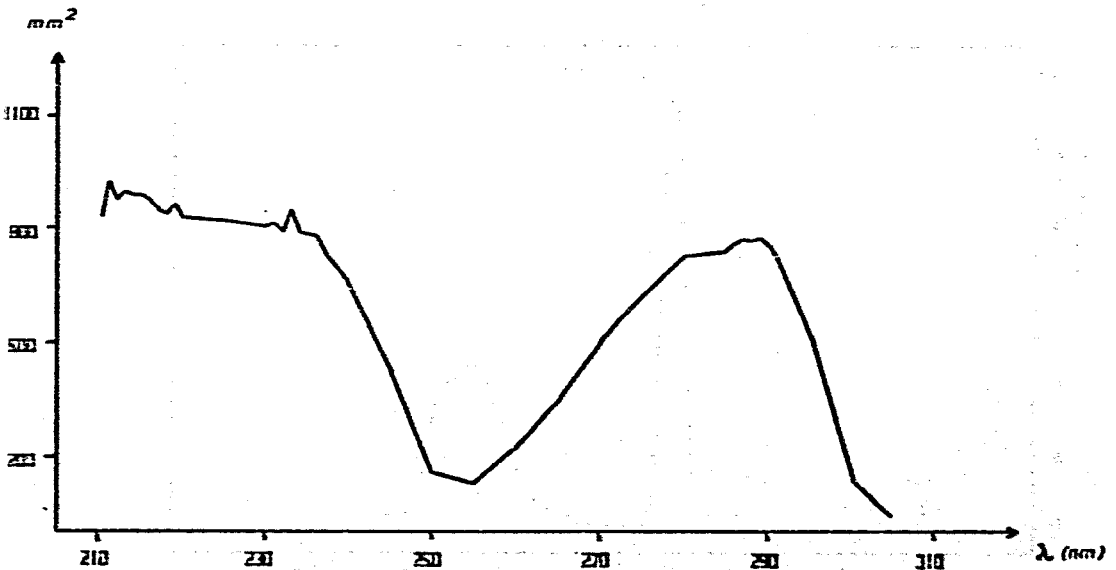


Fig. 3. Fläche der Ortsremissionskurve von Galanthamin auf der DC-Platte in Abhängigkeit von der Wellenlänge, punktförmig vermessen.

dem Ergebnis ist ersichtlich, dass die geeignete Messwellenlänge bei 288 nm liegt, da hier einerseits die Substanz ein Absorptionsmaximum aufweist, andererseits auch genügend Energie durch die Lampe abgestrahlt wird, die keine allzugrosse Verstärkung des Messsignals bzw. Öffnung der Spaltbreite bedingt.

Das Auswerten der Remissionskurven der Galanthamin-Standardlösungen führt zu einer gut reproduzierbaren Eichkurve, Tabelle I (Fig. 4), wobei die untere Grenze der sicher auswertbaren Flächen bei 20 mm<sup>2</sup> liegt. Das entspricht in der obigen Messanordnung einer Substanzmenge von etwa 0.2 µg. Diese Methode wurde zur Untersuchung mehrerer Drogenextrakte angewandt, wobei einzelne Extrakte wiederholt an getrennten Platten chromatographiert wurden. Die Auswertung (eine Auswahl ist in Tabelle II zusammengestellt) zeigt eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

TABELLE I

AUFTRAGMENGE UND PEAKFLÄCHE FÜR GALANTHAMIN BEI GLEICHBLEIBENDEM AUFTRAGVOLUMEN VON 5 µl

Verdünnung der Standardlösung	Galanthamin (µg)	Peakfläche (mm <sup>2</sup> )
1:1	5	320.3
1:1.2	4.17	288.1
1:1.3	3.85	265.5
1:1.5	3.33	237.7
1:1.8	2.78	191.7
1:2.5	2.0	145.0
1:4	1.25	94.4

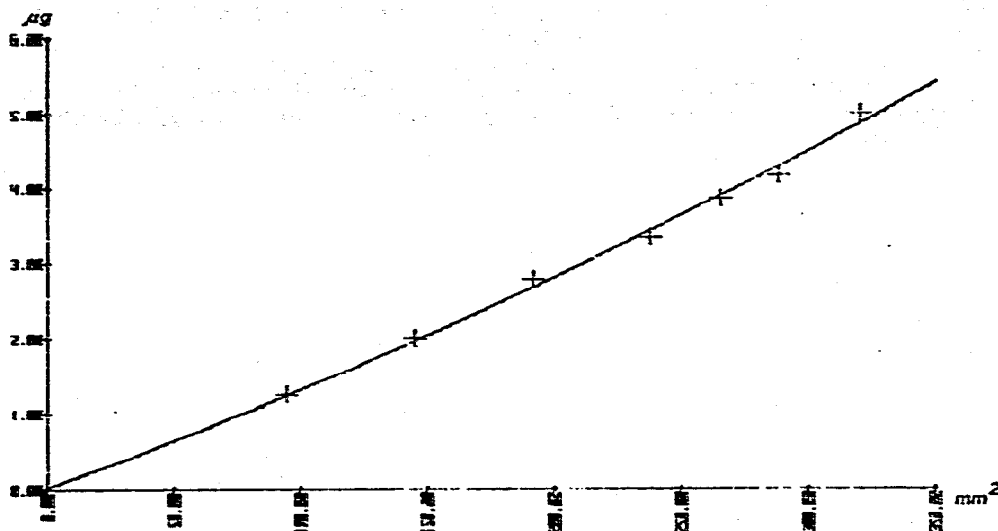


Fig. 4. Eichkurve für Galanthamin nach DC-Trennung, wobei das Auftragsvolumen mit 5 µl konstant gehalten wurde.

Damit bietet sich die Möglichkeit, dieses Bestimmungsverfahren für umfangreicher angelegte Studien zum Vorkommen und zur Produktion von Galanthamin in Pflanzen einzusetzen. Inwieweit auch andere wichtige Amaryllidaceen-Alkaloide in

## TABELLE II

## ANALYSENERGEBNISSE VERSCHIEDENER DROGENEXTRAKTE IN EINER WIEDERHOLUNG

Angabe in % Galanthamin bezogen auf die Trockendroge.

Drogenprobe	Galanthamin (%)
Probe 1 - 26B	1.112 1.087
Probe 2 - 26B	1.000 1.007
Probe 3 - 26B	0.508 0.527

Drogenextrakten mit Hilfe der direkten Auswertung auf der DC-Platte bestimmbar sind, ist Gegenstand einer noch laufenden Untersuchung. Über Ergebnisse dieser Versuche wird demnächst berichtet.

## LITERATUR

- 1 T. Yoshino und M. Sugihara, *Kagaku To Kogyo (Osaka)*, 31 (1957) 96; *C.A.*, 51 (1957) 11659f.
- 2 S. Kori, K. Shibata und I. Nishimura, *Yakugaku Zasshi*, 81 (1961) 1042; *C.A.*, 55 (1961) 26368b.
- 3 A. Gheorghiu, A. Constantinescu und E. Ionescu-Matiu, *Rev. Med. (Tirgu-Mures)*, 8 (1962) 54; *C.A.*, 57 (1962) 12903h.
- 4 V. I. Kuznetsov, N. S. Volkova und V. A. Morozova, *Farmatsiya (Moscow)*, 18 (1969) 39; *C.A.*, 71 (1969) 33488j.
- 5 S. Laiho und M. Fales, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86 (1964) 4434.
- 6 E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer, Berlin, 2. Aufl., 1967, s. 427.
- 7 F. Sandberg und K.-H. Michel, *Lloydia*, 26 (1963) 78.
- 8 I. D. Kalashnikov, *Issled. Obl. Lek. Sredstv.*, (1968) 228; *C.A.*, 74 (1969) 136420x.
- 9 D. S. Millington, D. E. Games und A. H. Jackson, in A. Frigerio (Herausgeber), *Proceedings of the International Symposium on Gas Chromatography Mass Spectrometry, Isle of Elba, Italy, 1971*, s. 276-288.