

CHROM. 13,698

GASCHROMATOGRAPHISCHE ERFASSUNG VON 6-DESOXYHEXOSEN, PENTOSEN UND HEXOSEN AUS HERZWIRKSAMEN GLYKOSIDEN

I. GAS-FLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHIE AN GEPACKTEN SÄULEN

BRIGITTE KOPP*, J. JURENITSCH und W. KUBELKA

Institut für Pharmakognosie der Universität Wien, Währingerstrasse 25, A-1090 Wien (Österreich)

(Eingegangen am 8. Januar 1981)

SUMMARY

Gas chromatographic determination of 6-deoxyhexoses, pentoses and hexoses of cardiac glycosides. I. Gas-liquid chromatography on packed columns

A new, relatively simple and accurate method allows the identification and quantification of the monosaccharide components of cardiac glycosides.

After hydrolysis under standard conditions the trimethylsilyl ethers of digitoxose, cymarose, fucose, rhamnose, 6-deoxyallose, 6-deoxygulose, 6-deoxyglucose, 6-deoxyidose, 6-deoxytalose, 3-O-methylglucose, allose, altrose, gulose, idose, glucose, mannose, galactose, talose, arabinose, lyxose, ribose and xylose can be identified by gas chromatography on OV-101 or OV-17 as stationary phases. The retention times of the main peaks of each of the analysed monosaccharides, and the ratios of the peak areas of the different anomers were found to be characteristic and of good reproducibility.

With phenyl- β -D-glucopyranoside as internal standard the quantification of the absolute amount of sugar present in cardiac glycosides of known constitution is possible, the recovery after hydrolysis being 71–92%. The method allows determination of the composition of the sugar chain in new cardiac glycosides and gives better information in a shorter time of analysis than other methods.

EINLEITUNG

Die meisten Herzglykoside enthalten ungewöhnliche, sonst in der Natur nur selten vorkommende Zucker, die hinsichtlich ihrer Struktur¹, Biogenese^{2–4} sowie ihres Einflusses auf die Löslichkeit bzw. pharmakodynamischen Eigenschaften einzelner Substanzen^{5,6} besonderes Interesse beanspruchen. Da diese Naturstoffe oft nur in geringen Mengen isoliert werden können, ist man für die Identifizierung der Zuckerkomponente(n) vorwiegend auf chromatographische Vergleiche angewiesen. Dafür hatte man früher die Papierchromatographie herangezogen, wobei Verwendung vier verschiedener Fließmittelsysteme eine eindeutige Sicherung der nach Säurehydrolyse des Herzglykosides erhaltenen Monosaccharid-Bausteine ermöglichte⁷.

Eine Verbesserung der Trennung konnte durch Komplexbildung erzielt werden, indem das Papier mit Boratpuffer⁷ oder Natriummolybdat⁸ imprägniert wurde; auch diese Methode war jedoch mit grossem Zeitaufwand verbunden.

Als bisher einfachstes Verfahren zur eindeutigen Unterscheidung der Zuckerkomponenten erwies sich eine Kombination von Dünnschichtchromatographie, Papierchromatographie und Hochspannungselektrophorese⁹.

Da unserer Arbeitsgruppe in den letzten Jahren die Isolierung einer grossen Anzahl neuer Herzglykoside aus *Convallaria majalis*^{10,11}, *Erysimum cheiri*¹² und *Urginea maritima*¹³ gelang und die Auffindung weiterer herzaktiver Verbindungen zu erwarten ist, schien es angebracht, eine zeitsparende und weniger umständliche Methode auszuarbeiten. Wegen des geringen Substanzbedarfes bot sich für diesen Zweck im besonderen die Gaschromatographie an¹⁴.

Zur Vervollständigung der Resultate sollten neben den in diesen Verbindungen häufig vorkommenden 6-Desoxyhexosen auch sämtliche Hexosen und Pentosen in die Untersuchungen miteinbezogen werden, zumal gerade in letzter Zeit solche Zucker in Cardenoliden aufgefunden wurden^{10,11}.

EXPERIMENTELLES

Vergleichssubstanzen

D-Arabinose, D-Lyxöse, D-Ribose, D-Xylose, D-Allose, D-Altrose, D-Galaktose, D-Gulose, D-Glucose, D-Idose, D-Mannose, D-Talose, D-Digitoxose, D-Fucose (6-Desoxy-D-galaktose) und L-Rhamnose (6-Desoxy-L-mannose), Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.); 6-Desoxy-D-allose, 6-Desoxy-D-gulose; 6-Desoxy-D-glucose, 6-Desoxy-L-idose, 6-Desoxy-L-talose, 3-O-Methyl-D-glucose: Professor Dr. T. Reichstein, Basel, Schweiz).

Die Glykoside waren isolierte Reinsubstanzen aus *Convallaria majalis*^{10,11,15-17}, *Erysimum cheiri*¹², *Adonis vernalis*¹⁸ und *Ornithogalum boucheanum*¹⁹, die Glykoside Sarmentosid A und Strogosid verdanken wir Herrn Professor Dr. T. Reichstein.

Zum Vergleich wurden 6-Desoxy-allose aus Strophallosid und Strophanollösid¹⁵, 6-Desoxy-gulose aus Desglucocheirotol und Perigulosid¹⁶, 6-Desoxy-glucose aus Glucoallösid¹², Fucose aus Cheirosid A¹², Rhamnose aus Thollosid, Lokundjösid und Rhodexin A^{10,17}, 6-Desoxy-talose aus Sarmentosid A und Strogosid, Digitoxose aus Helveticosid¹², Cymarose aus Cymarin¹⁸, Allose aus Bipindogenin- β -D-allosid¹⁰, Glucose aus Cheirosid A und Glucoallösid¹², Arabinose aus Strophanthidin- β -D-allo-methylösido- α -L-arabinosid¹¹ und Xylose aus Glykosid A₁¹⁹ durch Hydrolyse im Mikromassstab hergestellt.

Als innerer Standard wurde Phenyl- β -D-glucopyranosid, Fluka (Buchs, Schweiz) verwendet. Die Substanzen wurden vor der Einwaage im Hochvakuum getrocknet. Alle verwendeten Lösungsmittel waren p.A. Qualität, Merck (Darmstadt, B.R.D.).

Gaschromatographie

(1) Varian Aerograph 2740 Flammenionisations detektor (FID); Säule; Pyrex 10 ft. \times 1/4 in. O.D. \times 2 mm I.D.; Trennmaterial: 1.6% OV-101 auf Chromosorb G AW DMCS (100-120 mesh); Trägergas: Stickstoff 20 ml/min, Wasserstoff 30

ml/min., Synthetische Luft 300 ml/min; Temperatur: Injektor 230°C, Detektor 240°C; Temperaturprogramm 100–240°C (2°/min); Empfindlichkeit 32×10^{-11} ; Integrator: Perkin-Elmer SIP-1.

(2) Perkin-Elmer F 33/3 (FID); Säule, Pyrex 6 ft. \times 1/4 in. O.D. \times 2 mm I.D.; Trennmaterial: 6% OV-17 auf Chromosorb W AW DMCS (100–120 mesh); Trägergas: Stickstoff 13.5 ml/min, Wasserstoff 30 ml/min, Synthetische Luft 300 ml/min.; Temperatur: Injektor/Detektor 225°C; Temperaturprogramm 100–200°C (2°/min); Empfindlichkeit $8 \cdot 10$; Integrator: Perkin-Elmer M-2.

Hydrolyse (Methode 1)

0.50–1.00 mg Glykosid wurden in einem Kochglas in 0.3 ml Kiliani-Mischung (3.5 ml Eisessig, 5.5 ml destilliertes Wasser und 1.0 ml konz. Salzsäure²⁰) gelöst, gut verschlossen und 1 h auf 100°C (Trockenschrank) erhitzt. Nach dem Abkühlen verdünnten wir mit dem doppelten Volumen Wasser und extrahierten die wässrige Lösung zweimal mit je 0.5 ml Chloroform, um die Aglykon-Artefakte abzutrennen¹. Die Neutralisation der sauren Lösung erfolgte mit Dowex 44 (Serva, Heidelberg, B.R.D.); OH⁻-Form; Säule, 10 \times 1 cm I.D. Dem Eluat setzten wir 0.20 mg Standard (Phenyl- β -D-glucopyranosid) in Form einer methanolischen Lösung zu und brachten unter wiederholtem Zusatz von Methyläthylketon-*n*-Propanol (1:1) bei max. 40°C und unter vermindertem Druck zur Trockene.

Hydrolyse (Methode 2)

Bei dieser Methode versetzten wir 0.50–1.00 mg Glykosid mit 2 ml Aceton und 5 ml 0.05 N Schwefelsäure und erhitzen 2 h auf 95°C. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit Dowex 44 (OH⁻-Form; Säule: 10 \times 1 cm I.D.) neutralisiert und nach Zusatz von 0.20 mg Standard unter wiederholter Zugabe von Methyläthylketon-*n*-Propanol (1:1) bei max. 40°C und vermindertem Druck in einem 3-ml Reacti-Vial (Pierce, Rotterdam, Niederlande) zur Trockene gebracht.

Äquilibrierung der freien Zucker in saurer Lösung

Wir lösten 0.20–0.50 mg Zucker in 0.3 ml Kiliani-Mischung und erhitzen 30 min auf 100°C. Die anschließende Aufarbeitung erfolgte wie unter *Hydrolyse (Methode 1)* angegeben.

Äquilibrierung der freien Zucker in wässriger Lösung

Die Äquilibrierung wurde nach Wulff²¹ ausgeführt. Das Abdampfen der wässrigen Phase erfolgte wie oben.

Derivatisierung

Das nach Hydrolyse oder Äquilibrierung erhaltene Zuckergemisch lösten wir in wasserfreiem Pyridin, wobei für 0.20 mg Zucker 100 μ l Pyridin verwendet wurden, und setzten pro 100 μ l Pyridin 10 μ l Hexamethyldisilazan und 10 μ l Trimethylchlorsilan (Pierce, Rotterdam, Niederlande) zu²². Nach gutem Durchschütteln wurde 1 μ l dieser Suspension direkt in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Lösungen waren bei Aufbewahrung im Exsiccator und Kühlschränk mindestens drei Tage verwendbar.

Quantitative Bestimmung von Zuckern in Glykosiden

Die verschiedenen, in wässriger Lösung äquilibrierten Zucker wurden mit Standard (204.8 mg Phenyl- β -D-glucopyranosid in 100.0 ml Methanol) versetzt und wie oben weiterbehandelt. Die zur Derivatisierung verwendeten Lösungsmittel- und Reagentienmengen wählten wir so, dass die Substanzkonzentrationen denjenigen der Probeneinspritzlösungen entsprachen. Für die Berechnung²³ wurden folgende gemittelte Standard-Korrekturfaktoren verwendet, da die für die einzelnen Zucker gefundenen Werte jeweils nur um $\pm 10\%$ (rel.) differierten: 2,6-Bisdesoxyhexosen 0.90; 6-Desoxyhexosen 0.85; Hexosen und 3-O-Methylhexosen 0.95; Pentosen 1.0.

ERGEBNISSE

Die Gaschromatographie wurde in letzter Zeit häufig zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Zuckern herangezogen. Zwar müssen die Monosaccharide zu diesem Zweck in flüchtige Derivate (z.B. Trimethylsilyl-(TMS)-Äther²⁴⁻³⁴, Acetalditole³⁵, Methyläther³⁵⁻³⁷ oder Trifluoroacetate^{34,38}) überführt werden, doch wird dieser Nachteil bei weitem durch die erreichbare Trennkapazität und den Zeitgewinn wettgemacht^{14,39}. Für die in der vorliegenden Arbeit in erster Linie angestrebte Identifizierung der Monosaccharid-Bausteine verschiedener herzwirksamer Glykoside empfahl sich besonders die Verwendung der TMS-Derivate, welche zum einen durch einfache, in kurzer Zeit quantitativ verlaufende Umsetzung hergestellt werden können und zum anderen durch Stabilisierung der anomeren furanoiden, pyranoiden bzw. auch heptanoiden Formen im Gaschromatogramm charakteristische "fingerprints" der einzelnen Zucker ergeben⁴⁰⁻⁴², woraus eine zusätzliche Absicherung der Analyseergebnisse resultiert.

Bei der Wahl des gaschromatographischen Trennsystems gingen wir davon aus, dass die Trennung einer grossen Anzahl von Hexosen, Desoxyhexosen und Pentosen möglich sein sollte. Zu diesem Zweck musste ein Programm über einen grossen Temperaturbereich gewählt werden, da einerseits eine gute Abtrennung der relativ niedrig siedenden TMS-Derivate der Bisdesoxyhexosen vom Lösungsmittel und andererseits eine gute Auftrennung der höher siedenden TMS-Hexosen bei möglichst kurzer Analysenzeit zu gewährleisten war. Wegen der hohen Temperaturstabilität setzten wir dazu die Siliconphasen OV-101 bzw. OV-17 ein.

Da die Erfassung der Monosaccharid-Bausteine von Glykosiden eine saure Hydrolyse voraussetzt, wurden auch die Vergleichssubstanzen den für die Glykosidspaltung notwendigen Hydrolysebedingungen unterworfen. Die Behandlungszeit musste in Übereinstimmung mit Wulff²¹ allerdings für die freien Zucker herabgesetzt werden, um der Kiliani-Spaltung von Herzglykosiden vergleichbare Bedingungen zu schaffen, da ja die freien Zucker sofort den bekannten Zersetzungsreaktionen ausgesetzt waren. Vergleichende Untersuchungen von freier und durch saure Hydrolyse aus Monoglykosiden gewonnener Glucose, Rhamnose und Fucose ergaben, dass die freien Monosaccharide nach halbstündiger Behandlung mit Kiliani-Mischung die gleichen "fingerprints" wie die aus den Glykosiden nach einstündiger Hydrolyse gewonnenen Zucker aufwiesen. Wir konnten daher einzelne Zucker, die nur in geringen Mengen als Reinsubstanzen zur Verfügung standen, durch Hydrolyse von Monoglykosiden gewinnen, ohne eine Verfälschung der Analyseergebnisse befürchten zu müssen. Für den Nachweis der 2,6-Bisdesoxyzucker verwendeten wir ein schonendes

Hydrolyse und Probenaufbereitung nicht zu vermeidenden Substanzverluste erfasst werden konnten. Bei Einsatz von 0.50–1.00 mg Glykosid erhielten wir gut auswertbare Gaschromatogramme (Figs. 3–6) und stellten fest, dass unter den angegebenen Bedingungen 71–92% der in den Glykosiden enthaltenen absoluten Zuckermengen wiederzufinden waren (Tabelle I). Bei Di- bzw. Triglykosiden waren die mit den Faktoren korrigierten Peakflächenverhältnisse mit dem molaren Verhältnis der Zucker gut korrelierbar.

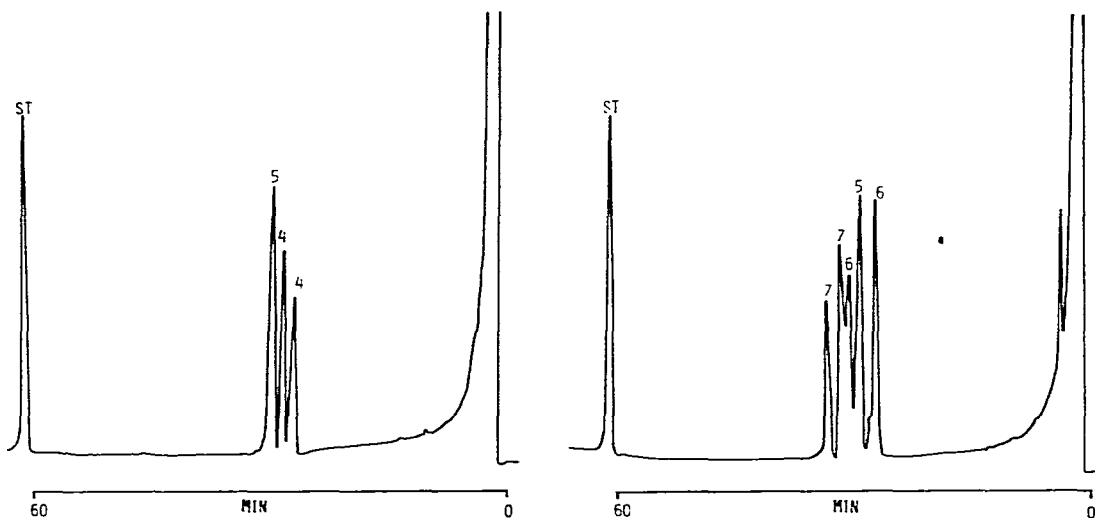


Fig. 5. Gas-Flüssigkeits-Chromatogramm der TMS-Monosaccharide aus Glykosid U (Strophanthidin-6-desoxyallosido-arabinosid) nach saurer Hydrolyse, Trennbedingungen vgl. Fig. 1. 4 = Arabinose, 5 = 6-Desoxyallose, ST = Phenyl- β -D-glucopyranosid.

Fig. 6. Gas-Flüssigkeits-Chromatogramm der TMS-Monosaccharide aus Glykosid A₁ (Lit. 19) nach saurer Hydrolyse, Trennbedingungen vgl. Fig. 1. 5 = 6-Desoxyallose, 6 = Rhamnose, 7 = Xylose, ST = Phenyl- β -D-glucopyranosid.

Das beschriebene Verfahren eignet sich somit nicht nur für die Identifizierung der in herzwirksamen Glykosiden auftretenden Monosaccharid-Bausteine, sondern lässt unter genauer Einhaltung der standardisierten Hydrolysebedingungen auch sichere Aussagen über die Zusammensetzung der Zuckerkette zu. Der Zeit- und Informationsgewinn gegenüber den früher verwendeten Verfahren ist erheblich.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein neues, im Vergleich zu bisher bekannten Methoden einfaches und genaues Verfahren ermöglicht die Identifizierung und quantitative Bestimmung von in herzwirksamen Glykosiden vorkommenden Monosaccharid-Bausteinen. Nach hydrolytischer Spaltung bei standardisierten Bedingungen gelingt unter Verwendung von OV-101 bzw. OV-17 als stationäre Phase die gaschromatographische Identifizierung der Trimethylsilyläther von Digitoxose, Cymarose, Fucose, Rhamnose, 6-Desoxyallose, 6-Desoxygulose, 6-Desoxyglucose, 6-Desoxyidose, 6-Desoxytalose, 3-O-Methylglucose, Allose, Altrose, Gulose, Idose, Glucose, Mannose, Galaktose, Talose,

TABELLE I

WIEDERFINDUNGSRATEN DER ZUCKER NACH SÄUREHYDROLYTISCHER SPALTUNG VON HERZWIRKSAMEN GLYKOSIDEN BEKANNTER KONSTITUTION

Glykosid	Zucker- komponente(n)	Einwaage (mg)	Rückgewinnung (%)
Convallatoxol	Rhamnose	0.98	88
Periplorhamnosid	Rhamnose	0.78	71
Desglucocheirototoxin	6-Desoxygulose	1.00	91
Perigulosid	6-Desoxygulose	0.67	88
Strophallosid	6-Desoxyallose	0.70	85
Peripallosid	6-Desoxyallose	0.83	85
Cheirosid A	{ Fucose Glucose	0.97	83 92
Glucoallisid	{ 6-Desoxyglucose Glucose	0.83	88 89
Glykosid U ¹¹	{ 6-Desoxyallose Arabinose	0.90	83 81
Glykosid A ₁ ¹⁹	{ 6-Desoxyallose Xylose Rhamnose	1.07	84 87 82
Sarmentosid A	6-Desoxytalose	0.56	78
Cymarosin	Cymarose	0.65	73
Helveticosid	Digitoxose	0.73	75

Arabinose, Lyxose, Ribose und Xylose, wobei als Identifizierungsmerkmale neben den Retentionszeiten der Hauptpeaks auch die gut reproduzierbare Peakflächenverteilung ("fingerprints") der mit diesem System trennbaren anomeren Formen der einzelnen TMS-Monosaccharide herangezogen wurden. Mit Hilfe von Phenyl- β -D-glucopyranosid als innerem Standard konnten bei Analyse der Zuckerkomponenten von herzwirksamen Glykosiden bekannter Struktur 71–92% der absoluten Monosaccharidmenge wiedergefunden werden. Das Verfahren erlaubt somit auch die rasche Feststellung der quantitativen Zusammensetzung der Zuckerketten unbekannter Glykoside.

DANK

Für die Überlassung von Vergleichssubstanzen danken wir Herrn Professor Dr. T. Reichstein, Basel, Schweiz auf das herzlichste. Die verwendeten gaschromatographischen Einheiten wurden durch Mittel der Österreichischen Apothekerkammer bzw. aus Sondermitteln des Österreichischen Bundesministeriums für Wissenschaft und Forschung finanziert.

LITERATUR

- 1 T. Reichstein und E. Weiss, *Advan. Carbohyd. Chem.*, 17 (1962) 65.
- 2 J. v. Euw und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 49 (1966) 1475.
- 3 G. Franz und H. Meier, *Planta Med.*, 17 (1969) 396.
- 4 O. Gabriel und L. v. Leuten, in D. J. Manners (Herausgeber), *Biochemistry of Carbohydrates II*, University Park Press, Baltimore, MD, 1978, p. 1.

- 5 W. Förster, in G. Baumgarten (Herausgeber), *Die herzwirksamen Glykoside*, Georg Thieme, Leipzig, 1963, p. 199.
- 6 K. R. H. Repke, *Pharmazie*, 27 (1972) 693.
- 7 M. T. Krauss, H. Jäger, O. Schindler und T. Reichstein, *J. Chromatogr.*, 3 (1960) 63.
- 8 A. R. Manzetti und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 47 (1964) 2320.
- 9 H. Kaufmann, P. Mühlradt und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 50 (1967) 2287.
- 10 B. Kopp und W. Kubelka, in Vorbereitung.
- 11 B. Kopp und W. Kubelka, in Vorbereitung.
- 12 J. B. S. Park, *Dissertation*, Universität Wien, Wien, 1978.
- 13 H. Kirchner, *Dissertation*, Universität Wien, Wien, 1978.
- 14 G. G. S. Dutton, *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 28 (1973) 11.
- 15 W. Kubelka, B. Kopp und K. Jentzsch, *Pharm. Acta Helv.*, 50 (1975) 353.
- 16 W. Kubelka, *Planta Med.*, 19 (1971) 153.
- 17 W. Kubelka und S. Eichhorn-Kaiser, *Pharm. Acta Helv.*, 45 (1970) 513.
- 18 E. Türk, *Dissertation*, Universität Wien, Wien, 1971.
- 19 U. Baumann, *Dissertation*, Universität Wien, in Vorbereitung.
- 20 H. Kiliani, *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 63 (1930) 2866.
- 21 G. Wulff, *J. Chromatogr.*, 18 (1965) 285.
- 22 C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita und W. W. Wells, *J. Amer. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2497.
- 23 R. Kaiser, *Chromatographie in der Gasphase IV*, *Hochschultaschenbuch Nr. 472/472 a*, Bibliographisches Institut, Mannheim, Zürich, 2. Aufl., 1969.
- 24 C. C. Sweeley und B. Walker, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1461.
- 25 D. A. Craven und C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.*, 37 (1968) 414.
- 26 P. K. Davison und R. Young, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 12.
- 27 M. Kimura, M. Tohma, Y. Okazawa und N. Murai, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 110.
- 28 K. Tesářík, *J. Chromatogr.*, 65 (1972) 295.
- 29 A. Raymakers, *Phytochemistry*, 12 (1973) 2331.
- 30 D. G. Pritchard und C. W. Todd, *J. Chromatogr.*, 133 (1977) 133.
- 31 T. Toba und S. Adachi, *J. Chromatogr.*, 135 (1977) 411.
- 32 R. Varma und R. S. Varma, *J. Chromatogr.*, 139 (1977) 303.
- 33 G. A. Janauer und P. Englmaier, *J. Chromatogr.*, 153 (1978) 539.
- 34 A. A. Akhrem, G. V. Avvakumov, O. V. Sviridov und O. A. Strel'chyonok, *J. Chromatogr.*, 166 (1978) 123.
- 35 B. Fournet, J.-M. Dhalluin, Y. Leroy, J. Montreuil und H. Mayer, *J. Chromatogr.*, 153 (1978) 91.
- 36 Y. S. Ovodov und E. V. Evtushenko, *J. Chromatogr.*, 31 (1967) 527.
- 37 F. Janaček, R. Toman, S. Karácsonyi und D. Anderle, *J. Chromatogr.*, 173 (1979) 408.
- 38 G. Eklund, B. Josefsson und C. Roos, *J. Chromatogr.*, 142 (1977) 575.
- 39 G. G. S. Dutton, *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 30 (1974) 10.
- 40 T. Theorghiu und K. Oette, *Z. Naturforsch. B*, 26 (1971) 24.
- 41 R. J. Ferrier, *Tetrahedron*, 18 (1962) 1149.
- 42 E. Bayer und R. Widder, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1452.
- 43 J. A. Mills, *Advan. Carbohydr. Chem.*, 10 (1955) 2.