

CHROM. 14,166

## ZUR BESTIMMUNG VON CARDENOLIDEN AUS GEWEBEKULTUREN VON DIGITALIS-ARTEN

THEODOR KARTNIG

Institut für Pharmakognosie der Karl-Franzens-Universität Graz, Universitätsplatz 4/I, A-8010 Graz (Österreich)

(Eingegangen am 7. Juli 1981)

---

### SUMMARY

#### *Quantification of cardenolides in cell cultures of Digitalis*

As cell cultures of *Digitalis* seem to form only a few cardenolides, a simple method for the identification and quantification of cardenolides from cell culture material was prepared. The ethanolic extract of the cell material is purified by column chromatography using the reversed-phase sorption material LiChroprep RP-18. The eluted cardenolides are separated by thin-layer chromatography on silica gel using different solvent systems. Quantification of cardenolides is carried out by measuring UV absorption *in situ*. The total analysis requires about 14 h.

---

### EINLEITUNG

Für die Analyse der Cardenolidmuster von Gewebekulturen aus *Digitalis*-Arten verwendeten wir bislang das zwar sehr genaue und verlässliche, dafür aber zeitraubende Verfahren nach Kaiser<sup>1</sup> mit der Quantifizierung der Hauptglykoside nach Fuchs *et al.*<sup>2</sup>. Als zusätzliche Verfahren benützten wir nach der Fraktionierung über Silicagel<sup>1</sup> die dünn-schichtchromatographische (DC) Auftrennung nach Kartnig und Nöhammer<sup>3</sup> und die Auftrennung mittels Hochleistung-Dünn-schichtchromatographie (HPTLC) nach Kartnig und Kobosil<sup>4</sup> mit der Quantifizierung durch Remissionsmessung *in situ*.

Da die Cardenolidgehalte der Gewebekulturen aus *Digitalis*-Arten im allgemeinen wesentlich geringer sind als die der *Digitalis*-Pflanzen und -Drogen, werden für eine Analyse nach Kaiser 150–250 g Gewebe benötigt. Die Anzucht solcher Gewebemengen nimmt, insbesondere in Oberflächengewebekulturen, relativ viel Zeit in Anspruch.

Ausgehend von der Beobachtung, dass in den im Laufe von acht Jahren von uns angelegten und analysierten, zahlreichen Gewebekulturstämmen aus *Digitalis purpurea* und *lanata* maximal fünfzehn Cardenolide aufgefunden werden konnten, wurde die nachstehende Analysenmethode ausgearbeitet, die nur *ca.* 10 g Untersuchungsmaterial und *ca.* 13–14 h Arbeitszeit benötigt.

## EXPERIMENTELLES

*Extraktion des Gewebes*

Es werden 10 g Gewebe mit 29 ml Äthanol (96 %) versetzt, mit einem Ultraturrax durch *ca.* 5 min zerkleinert und sodann über 15 min unter Rückflusskühlung am Wasserbad extrahiert. Das blanke Filtrat wird unter vermindertem Druck (Rotavapor) zur Trockene gebracht und in 10 ml Äthanol (70 %, v/v) aufgenommen.

*Reinigung des äthanolischen Extraktes*

10 g LiChroprep RP-18 (Merck, Darmstadt, B.R.D., Nr. 13900) werden in insgesamt 50 ml Äthanol (70 %) suspendiert und annähernd quantitativ in eine Glassäule (*ca.* 400 × 8 mm I.D.) gefüllt. Nach Abtropfen des überstehenden Äthanol werden die 10 ml Extrakt (s. *Extraktion des Gewebes*) in einem aufgebracht. Elution der Cardenolide mit Äthanol (70 %). Vörlauf 10 ml. Auffangen von 10 Fraktionen zu 2 ml.

*DC Ermittlung des Cardenolidmusters*

Abdunsten des Äthanol der einzelnen Fraktionen und Aufnehmen der Rückstände in jeweils 0.5 ml Chloroform-Methanol (1:1).

Sorptionsschicht: DC-Alufolien KG 60 (Merck, Nr. 5553), selbst geschnitten in Streifen von 10 × 5 cm ("Mikro-DC").

Auftragmenge: 3.0 µl (Auftragen mit 0.75-µl Mikrokapillare).

Fließmittelgemisch I (FG I): Cyclohexan-Aceton-Eisessig (4.9:4.9:0.2) (Unter bestimmten Umständen erweisen sich die Volumsrelationen (3.1:6.7:0.2), (3.7:6.1:0.2) oder (4.3:5.5:0.2) als brauchbarer).

Fließmittelgemisch II (FG II): Chloroform-Methanol (8.0:2.0) (Unter bestimmten Umständen erweisen sich die Volumsrelationen (7.0:3.0), (8.5:1.5) oder (9.0:1.0) als brauchbarer).

Laufstrecke: 7 cm, Entwicklungszeit mit FG I und FG II *ca.* 15 Min.

Detektion: Besprühen mit Trichloressigsäurereagens nach Aldrich *et al.*<sup>5</sup> [3.3 g Trichloressigsäure in 10 ml Chloroform und 2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)]. Betrachten im UV-Licht (254 nm). Besprühen mit den Reagentien nach Kedde und/oder Baljet.

*Quantifizierung der Cardenolide*

Durch Messung der Remission *in situ* von einer undetektierten Bahn quer zur Laufrichtung. Spektralphotometer Zeiss PMQ 3 mit Zusatz zur Direktauswertung. Schreiber Servogor Sb. 200 mV. Messung bei 225 nm. Untere Messgrenze für Aglykone *ca.* 150 ng, für Tetraoside *ca.* 300 ng. Relative Standardabweichung für Aglykone ± 2.80 %, für Bioside ± 2.81 % und für Tetraoside ± 2.90 %. Ablesung an den entsprechenden Eichkurven (Fig. 1).

*Dauer der Analyse*

Die Analysendauer beträgt 13–14 h.

*Regeneration der LiChroprep RP-18 Säule*

Elution der Verunreinigungen mit Chloroform. Nachwaschen mit 70 % Äthanol. LiChroprep RP-18 ist oftmalig verwendbar.

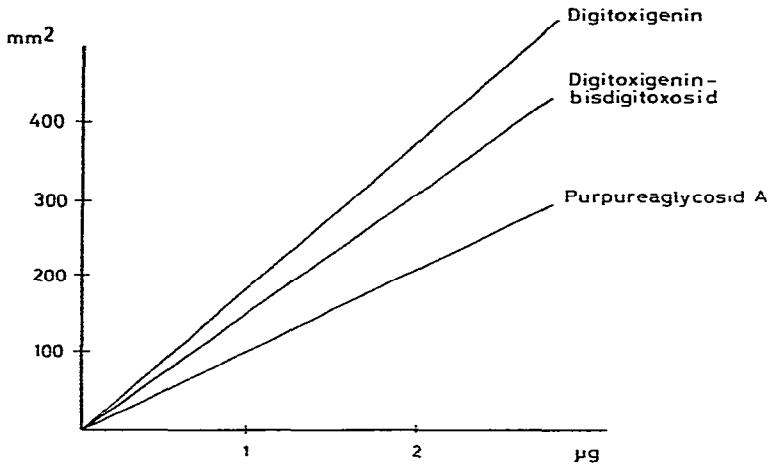


Fig. 1. Eichkurven bei Remissionsmessung *in situ* (225 nm; undetektiert).

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die vorgestellte Analysenmethode zeichnet sich durch geringen Untersuchungsmaterial- und Zeitaufwand aus. Diese Verbesserungen konnten durch vier Änderungen gegenüber herkömmlichen Verfahren erreicht werden:

(1) Ersatz der üblichen Reinigung des Drogenextraktes mittels Ausschüttelung durch säulenchromatographische Reinigung über dem Reversed-phase-Säulenmaterial LiChroprep RP-18. (Extrakte aus *Digitalis*-Gewebeulturen enthalten wesentlich weniger Extraktivstoffe als Extrakte aus *Digitalis*-Drogen).

#### TABELLE I

$R_F$ -WERTE EINIGER CARDENOLIDE (AGLYKONE, DIGITOXIGENINGLYKOSIDE, TETRAOSIDE)

Dtg = Digitoxigenin, Dgx = Digitoxose.

Cardenolide	FG I (4.9:4.9:0.2)	FG II (8.0:2.0)	Fluoreszenzfarbe* (254 nm)
Digitoxigenin	0.74	0.84	gelb
Gitoxigenin	0.61	0.76	blau
Digoxigenin	0.50	0.71	blau
Diginatigenin	0.41	0.61	blau
Gitaloxigenin	0.68	0.81	blau
Dtg-Dgx	0.54	0.80	gelb
Dtg-Dgx-Dgx	0.50	0.77	gelb
Dtg-Dgx-Dgx-Dgx	0.41	0.76	gelb
Purpureaglykosid A	0.01	0.46	gelb
Purpureaglykosid B	0.00	0.37	blau
Lanatosid A	0.07	0.58	gelb
Lanatosid B	0.04	0.54	blau
Lanatosid C	0.01	0.50	blau

\* Nach Besprühen mit Trichloressigsäure-Reagens (Aldrich *et al.*<sup>5</sup>).

(2) Weglassen der säulenchromatographischen Fraktionierung der extrahierten Cardenolide über Silicagel, da 15 bis 20 Cardenolide durch DC- und HPTLC-Systeme ausreichend getrennt werden können.

(3) Ersatz der Papierchromatographie (PC) durch "Mikro-DC" und HPTLC.

(4) Ersatz der kolorimetrischen Quantifizierung durch Remissionsmessung *in situ*.

#### *Reinigungseffekt am äthanolischen, cardenolidhaltigen Auszug*

Für den Reinigungseffekt der LiChroprep RP-18 Säule am äthanolischen, cardenolidhaltigen Auszug aus den Gewebekulturen sind folgende Kriterien ausschlaggebend:

*Äthanolkonzentration des zu reinigenden Extraktes.* Der beste Reinigungseffekt wird bei einer Äthanolkonzentration von 70% erzielt. Da der Wassergehalt der Gewebe etwas schwankt, wird der primäre Äthanolisch-wässrige Extrakt im Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene gebracht und sodann mit 70% Äthanol aufgenommen (*Auftragevolumen*).

*Mengenrelation Gewebe-LiChroprep RP-18.* Unter Einhaltung einer entsprechenden Säulendimension (s.u. "Säulendimension") reicht der Reinigungseffekt von LiChroprep RP-18 bei einer Äthanolkonzentration von 70% annähernd für die gleiche Gewebemenge frisches Gewebekulturmaterial (Trockenrückstand *ca.* 5%). Zur Reinigung eines Extraktes aus 10 g Gewebekulturmaterial sind demnach 10 g LiChroprep RP-18 nötig. (Bei Digitalis-Drogen reichen 10 g LiChroprep RP-18 nur für die Reinigung eines Extraktes aus 1 g Droge!).

*Säulendimension.* Für eine ausreichende Reinigung des Drogenextraktes muss die Säulenfüllung eine Mindesthöhe aufweisen. Für 10 g LiChroprep RP-18 (ausreichend für die Reinigung von maximal 10 g Gewebe) darf der Säulendurchmesser nicht mehr als 8 mm betragen.

*Auftragevolumen.* Der Reinigungs- bzw. Elutionseffekt ist mit vom Auftragevolumen abhängig. Zu grosse Auftragevolumina führen zu einer schlechten Abtrennung der Verunreinigungen. Das kleinstmögliche Auftragevolumen wird von der Löslichkeit des Abdampfrückstandes des Primärextraktes im 70% Äthanol bestimmt. Es beträgt im allgemeinen pro 1 g Gewebekulturmaterial 1 ml Äthanol (70%), d.h. für 10 g Gewebe 10 ml Äthanol (70%), wobei der Rückstand unter leichtem Erwärmen aufgenommen wird. Unmittelbar nach dem Einziehen der aufgeführten äthanolischen Lösung wird mit der Elution mit 70% Äthanol begonnen.

Bei der Elution mit 70% Äthanol aus der LiChroprep Säule erscheinen die Cardenolide nach ihrer chemischen Struktur beim Austritt aus der LiChroprep RP-18 ml. Die Verunreinigungen verbleiben zum grössten Teil als schmaler, dunkelgrüner Ring am Start. Die Cardenolid-enthaltenden Fraktionen (z.B. zu je 2 ml) sind unter Umständen leicht gelblich-bräunlich gefärbt, jedoch stören diese miteluierten Verunreinigungen die folgende DC-Auftrennung der Cardenolide nicht. Eine Reihung der Cardenolide nach ihrer chemischen Struktur beim Austritt aus der LiChroprep RP-18 Säule konnte nicht beobachtet werden. (Nach Abschluss der Elution werden die Verunreinigungen mittels Chloroform und darnach mittels 70% Äthanol aus der Säule gewaschen und die Säule damit regeneriert. Das LiChroprepmaterial ist oftmals verwendbar).

*Auftrennung und Identifizierung der Cardenolide*

Das üblicherweise in Fraktionen zu 2 ml aufgefangene Eluat der LiChrorep RP-18 Säule kann für den Fall, dass nur wenige Cardenolide vorliegen, zusammengelegt und der Untersuchung mittels DC und HPTLC zugeführt werden, die Fraktionen können aber auch —für den Fall, dass mehrere Cardenolide vorliegen— für sich getrennt chromatographiert werden. In jedem Fall wird die Elutionsflüssigkeit (70% Äthanol) abgedunstet und der Rückstand in 0.5 ml Chloroform-Methanol (1:1) aufgenommen.

Die chromatographische Auftrennung der Cardenolide erfolgt auf DC-Alufolien KG 60 in der Grösse von 10 × 5 cm (selbst geschnitten), die bei kürzerer Entwicklungszeit einen besseren Trenneffekt als solche der Grösse 20 × 20 cm erbringen. Als Fliessmittelgemische werden die Systeme Cyclohexan-Aceton-Eisessig und Chloroform-Methanol verwendet, wobei die quantitative Zusammensetzung je nach vorhandenem Cardenolidmuster variiert werden kann (s. Experimentelles). FG I eignet sich besonders zur Auftrennung der Aglykone, FG II besonders zur Auftrennung der Tetraoside (s. Tabelle I).

Zur eventuellen Erhärtung der DC-Befunde kann zusätzlich das HPTLC-System nach Kartnig und Kobosil<sup>4</sup> herangezogen werden.

Die Identifizierung der Cardenolide erfolgt an Hand von authentischen Vergleichssubstanzen, in vereinzelt Fällen an Hand des  $R_F$ -Wertes oder durch Interpolieren des  $R_F$ -Wertes. Die Fluoreszenzfarben der Flecke (Trichloressigsäure; 254 nm; gelb = Digitoxigeninderivate, stahlblau = Digoxigeninderivate, leuchtend blau = die Derivate der drei übrigen Aglika) sind eine weitere Hilfe. Für die Absicherung fraglicher Ergebnisse kann die beschriebene "Mikro-DC" auch in zweidimensionaler Form unter Verwendung der beiden Fliessmittelgemische I und II oder des HPTLC-Trennsystems nach Kartnig und Kobosil<sup>4</sup> herangezogen werden.

Die Quantifizierung der Cardenolide erfolgt durch Remissionsmessung *in situ* bei 225 nm<sup>6</sup>. Die Messung wird am besten auf einer nicht-detektierten Bahn durchgeführt. Sie kann allerdings auch auf einer mit Trichloressigsäure-Reagens nach Aldrich *et al.*<sup>5</sup> detektierten Bahn erfolgen, jedoch ist dabei die Empfindlichkeit entsprechend geringer. Die Remissionsmessung nach Detektion mit dem Reagens nach Baljet ist bei 225 nm wohl durchführbar, aber ebenfalls wenig empfindlich, während die Messung nach Besprühen mit Keddes Reagens auf Grund der zu unruhigen Nulllinie nicht möglich ist. Die Fluoreszenzmessung (Detektion mit Trichloressigsäure-Reagens) brachte keine befriedigenden Ergebnisse, da die Flecken zum Teil inhomogene Fluoreszenzfarben (z.B. im Zentrum blau, am Rande gelb) aufweisen.

Die Remissionsmessung wird quer zur Laufrichtung durchgeführt. Die Spreizung am Schreiber ist je nach vorhandener Cardenolidmenge zu wählen. Durch Verwendung der HPTLC (Auftragen mittels Platin-Iridium Mikrokapillare) kann die Erfassungsgrenze noch weiter (auf *ca.* 50 ng für Aglyka) gesenkt werden (s. Kartnig und Kobosil<sup>4</sup>).

DANK

Für die Durchführung der experimentellen Arbeit danke ich Frau Mag. pharm. Gabriele Kummer-Fustinioni und Frau Ing. Barbara Maunz. Herrn Dr. F. Kaiser (Fa. Boehringer, Mannheim, B.R.D.) danke ich für die freundliche Überlassung von Cardenolid-Reinsubstanzen.

## REFERENCES

- 1 F. Kaiser. *Arch. Pharm.*, 299 (1966) 263.
- 2 L. Fuchs, M. Wichtl und H. Jachs, *Arch. Pharm.*, 291 (1958) 193.
- 3 Th. Kartnig und R. Nöhammer. *Sci. Pharm.*, 40 (1972) 110.
- 4 Th. Kartnig und P. Kobosil, *J. Chromatogr.*, 138 (1977) 238.
- 5 B. J. Aldrich, M. L. Frith und S. E. Wright. *J. Pharm. Pharmacol.*, 8 (1956) 1042.
- 6 E. Bancher, Th. Prey und F. Wurst, *Planta Med.*, 29 (1976) 393.