

## Note

# Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographische Analyse von Digitalis-Blattextrakten

## I. Qualitative Analyse

M. WICHTL\*, M. MANGKUDIDJOJO und W. WICHTL-BLEIER

*Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität, Deutschhausstrasse 17<sup>1/2</sup>, D-3550 Marburg/L. (B.R.D.)*

(Eingegangen am 3. August 1981)

In den letzten Jahren ist für die Analyse einiger Digitalisglykoside, vor allem in Arzneimittelpreparaten, die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) sehr erfolgreich angewendet worden, wobei zunächst Säulen mit Ionenaustauschern<sup>1</sup>, dann mit Silicagel<sup>2–4</sup> und schliesslich mit reversed-phase (RP)<sup>5–8</sup> zum Einsatz kamen. Dabei sind auch die Zusammenhänge zwischen Polarität des Cardenolides und seiner Retentionszeit, bzw. der Einfluss der Fließmittelzusammensetzung auf das Trennergebnis eingehend studiert worden. Für die Detektion zieht man gewöhnlich die UV-Absorption heran; eine beträchtliche Steigerung der Empfindlichkeit wird durch Derivatisierung vor<sup>9</sup> oder nach<sup>10,11</sup> der Säule erreicht.

Allerdings beschränken sich praktisch alle bisherigen Veröffentlichungen auf die Untersuchung der arzneilich bedeutenden Glykoside (vor allem Digitoxin, Digoxin, Acetyldigoxin und Lanatosid C), während die Analyse der übrigen Cardenolide, deren Anteil in Digitalisblättern immerhin 30–70% des Gesamtglykosidgehaltes betragen kann<sup>12</sup>, mittels HPLC bisher nicht beschrieben wurde. Für pflanzenphysiologische und biochemische Untersuchungen ist aber gerade die Analyse der Zusammensetzung des Glykosidgemisches in den Blättern (und nicht nur deren Gehalt an einzelnen, therapeutisch wichtigen Verbindungen) von besonderem Interesse. Bisher sind solche Bestimmungen durch Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen durchgeführt worden<sup>13</sup>. Für die Untersuchung der Glykosidbiogenese im Verlaufe der Vegetationsperiode haben wir nun ein Verfahren entwickelt, das es erlaubt, mittels HPLC alle mengenmässig bedeutenden Glykoside in den Blättern von *Digitalis lanata* sowie einigen anderen Digitalis-Arten und in Digitalishybriden qualitativ und quantitativ zu erfassen. In der vorliegenden ersten Mitteilung berichten wir zunächst über die Probenaufarbeitung und die qualitative Analyse.

## EXPERIMENTELLES

### Gerät und Analysendaten

Flüssigkeits-Chromatograph: 1084 B Hewlett-Packard. Säulen: LiChrosorb RP-8 (10  $\mu\text{m}$ ) und RP-18 (10  $\mu\text{m}$ ), Länge 20 cm, Innendurchmesser 4.6 mm, Stahl. Mobile Phase: Wasser–Acetonitril (75:25; 63:37) isokratisch und Gradientenelution.

Temperatur: 40°C. Durchfluss: 1.5 ml/min. Variabler Wellenlängendetektor: Hewlett-Packard. Schreiber-Integrator: LC-Terminal 79850 B Hewlett-Packard.

### Reagentien

Lösungsmittel: LiChrosolve (Merck, Darmstadt, B.R.D.). Chemikalien z. Analyse (Merck). Die für Vergleichszwecke verwendeten herzwirksamen Glykoside haben wir von den Firmen Boehringer, Mannheim und Sandoz (Basel, Schweiz) erhalten.

### Probenvorbereitung

Feingepulverte Digitalis-Blattdroge (1.500 g) werden in einem tarierten Rundkolben mit 15.0 g heissem Ethanol (70%, v/v) übergossen und 15 min unter Rückflusskühlung auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur fügt man 25.0 g Wasser und 10.0 g einer Lösung von 15 g  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in 100 ml Wasser zu, ergänzt mit Wasser auf 60.00 g und mischt gut durch. Hierauf wird der entstandene Niederschlag abzentrifugiert; von der klaren überstehenden Lösung versetzt man 50.0 g mit 12 g einer Lösung von 10 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in 100 ml Wasser, mischt gut durch und zentrifugiert. Von der überstehenden klaren Lösung werden 57.0 g (entspr. 1.15 g Digitalis-Blattdroge) mit 1 × 30 und 3 × 20 ml Chloroform-Isopropanol (3:2) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen bringt man unter vermindertem Druck bei maximal 40°C zur Trockne (Rotationsverdampfer) und löst den Rückstand in 4.00 ml Methanol p.a. Die über Millipore filtrierte Lösung wird für die HPLC-Analyse verwendet.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### Vorbereitung der Proben für die HPLC-Analyse

Obwohl man grundsätzlich mit Methanol oder Methanol-Wassergemischen hergestellte Extrakte aus Digitalisblättern direkt für die HPLC verwenden kann, so scheidet dieses Verfahren in der Praxis doch zumeist aus und zwar aus zwei Gründen: erstens enthält ein ungereinigter Blattextrakt beträchtliche Mengen an Begleitstoffen ("Ballaststoffe"), von denen ein Teil als mit der Front wandernder Peak erscheint, in dem aber einige Cardenolidglykoside "verschwinden"; zweitens belegt ein anderer Teil dieser Begleitstoffe die Oberfläche des Säulenfüllmaterials, sodass die Säulen sehr schnell unbrauchbar werden. Auf solche Schwierigkeiten haben übrigens auch Jurenitsch *et al.*<sup>14</sup> bei Convallaria-Analysen und Tittel und Wagner<sup>15</sup> bei anderen Herzglykosiddrogen hingewiesen. Versuche zur Abtrennung der "Ballaststoffe" mittels Vorsäulen, Sep-Pak-Kartuschen oder Extrelut<sup>®</sup>-Säulen brachten keine brauchbaren Resultate. Beim Eluieren der Sep-Pak-Kartuschen mit Methanol werden UV-absorbierende Substanzen herausgelöst; selbst wenn man mit Methanol gewaschene Kartuschen benützt gelingt es nicht, Chlorophyll quantitativ von den herzwirksamen Glykosiden abzutrennen.

Die besten Ergebnisse erhält man, wenn man die seit langem bewährte Reinigung von Blattauszügen mit Bleiacetat vornimmt. Dabei werden Chlorophyll und verschiedene phenolische Begleitstoffe (Flavonoide, Gerbstoffe) ausgefällt; aus dem Filtrat lassen sich die Cardenolidglykoside durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln isolieren (Einzelheiten siehe Experimentelles).

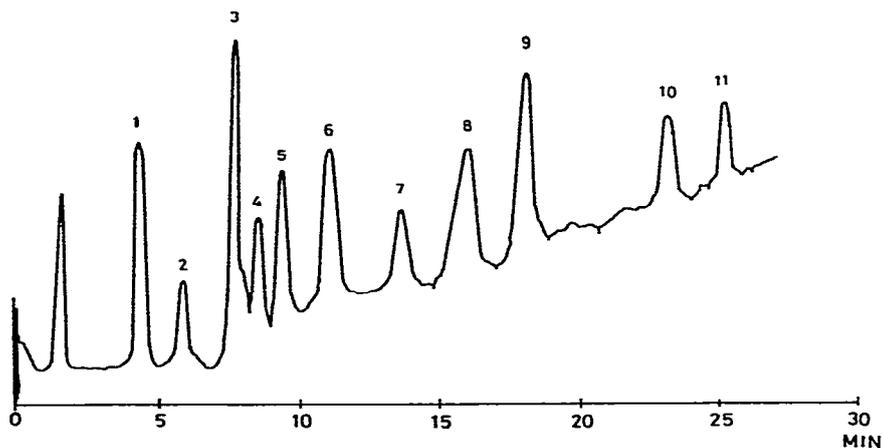


Fig. 1. Trennung eines Gemisches von reinen Digitalisglykosiden mittels HPLC. Bedingungen: LiChrosorb RP-18 Säule (10  $\mu$ m); 4 min isokratisch Acetonitril-Wasser (25:75), dann Gradientenelution in 30 min bis Acetonitril-Wasser (37:63); Fluss 1.5 ml/min; Detektor 230 nm. 1 = Digitalinum verum; 2 = Glucoverodoxin; 3 = Glucogitorosid; 4 = Odorobiosid G; 5 = Lanatosid C; 6 = Glucoevatromonosid; 7 = Glucodigitoxigeninbisdigitoxosid; 8 = Lanatosid B; 9 = Acetylgitoxin; 10 = Lanatosid A; 11 = Digitoxin.

### Qualitative HPLC-Analyse

Bei der Untersuchung des in den Blättern von Digitalis-Arten vorkommenden Glykosidgemisches ist mit einem weiten Polaritätsbereich zu rechnen, der von stark hydrophilen Glykosiden wie z.B. Glucogitofucosid oder Digitalinum verum bis zu extrem lipophilen wie z.B. Digitoxin reicht. Wir haben deshalb das Verhalten ein-

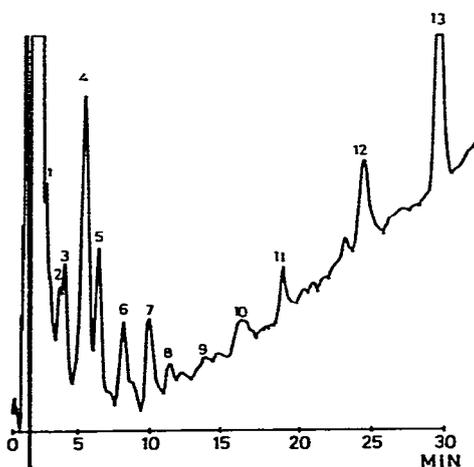


Fig. 2. HPLC-Trennung der Glykoside in einem Blattextrakt von *Digitalis lanata* EHRH. Bedingungen: LiChrosorb RP-Säule (10  $\mu$ m); Gradientenelution 30 min Acetonitril-Wasser von (27:73) bis (37:63). Fluss 1.5 ml/min; Detektor 230 nm. 1 = Digitalinum verum; 2 = Glucoverodoxin; 3 = Glucogitorosid; 4 = Glucolanadoxin; 5 = Glucodigifucosid; 6 = Odorobiosid G; 7 = Lanatosid C; 8 = Glucoevatromonosid; 9 = Glucodigitoxigeninbisdigitoxosid; 10 = Lanatosid B; 11 = Lanatosid A; 12 = Digitoxin; 13 = nicht identifiziert.

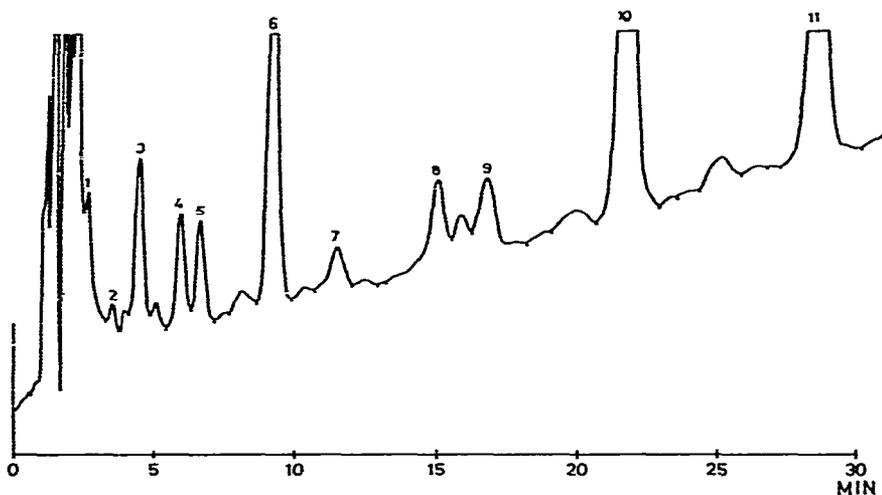


Fig. 3. HPLC-Trennung der Glykoside in einem Blattextrakt von *Digitalis heywoodii* P. et Silva. Bedingungen wie in Fig. 2. 1 = Digitalinum verum; 2 = Glucoverodoxin; 3 = Glucogitorosid; 4 = Glucolanadoxin; 5 = Glucodigifucosid; 6 = Odorobiosid G; 7 = Glucoevatromonosid; 8 = Glucodigitoxigeninbisdigitoxosid; 9 = Lanatosid B; 10 = Lanatosid A; 11 = Digitoxin.

zelter Glykoside unterschiedlicher Polarität bei verschiedenen Bedingungen geprüft. Hierbei erwiesen sich RP-8- und RP-18-Säulen als besonders geeignet; für die mobile Phase kamen vor allem die Gemische Acetonitril-Wasser und Tetrahydrofuran-Dioxan-Wasser zur Anwendung, mit denen die besten Resultate erzielt wurden. Allerdings gelingt unter isokratischen Bedingungen keine völlige Trennung. <sup>14</sup> a jeweils kritisch Substanzpaare auftreten [Beispiele: Lanatosid C und Digoxigenin oder La-

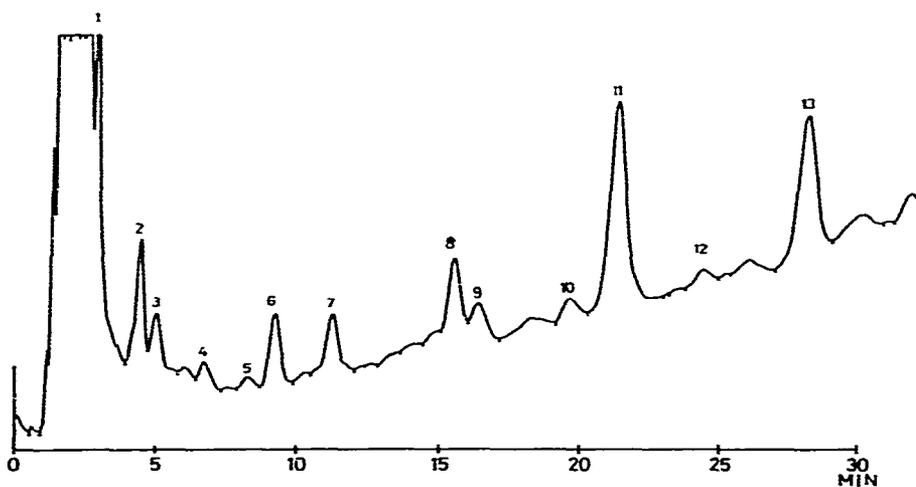


Fig. 4. HPLC-Trennung der Glykoside in einem Blattextrakt der Hybride *Digitalis heywoodii* x *Digitalis lanata*. Bedingungen wie in Fig. 2. 1 = Digitalinum verum; 2 = Glucoverodoxin; 3 = Glucogitorosid; 4 = Glucolanadoxin; 5 = Glucodigifucosid; 6 = Odorobiosid G; 7 = Glucoevatromonosid; 8 = Glucodigitoxigeninbisdigitoxosid; 9 = Lanatosid B; 10 = nicht identifiziert; 11 = Lanatosid A; 12 = Acetylgitoxin; 13 = Digitoxin.

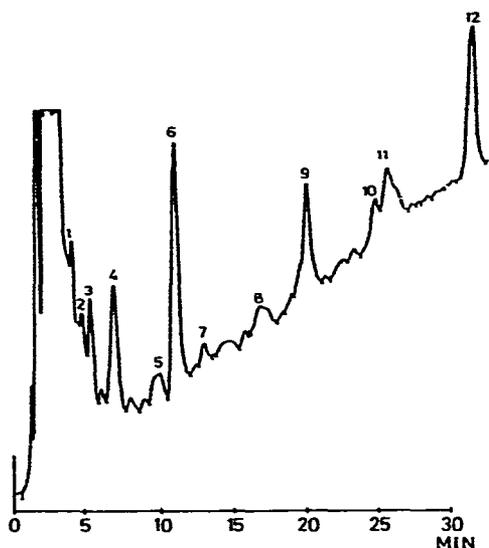


Fig. 5. HPLC-Trennung der Glykoside in einem Blattextrakt von *Digitalis lutea* L. Bedingungen wie in Fig. 2. 1 = Digitalinum verum; 2 = Glucoverodoxin; 3 = Glucogitorosid; 4 = Glucolanadoxin; 5 = Lanatosid C; 6 = Glucoevatromonosid; 7 = Glucodigitoxigeninbisdigitoxosid; 8 = Lanatosid B; 9 = Acetylglitoxin; 10 = Lanatosid A; 11 = Digitoxin; 12 = nicht identifiziert.

atosid B und Lanatosid E an RP-18-Säulen bei Verwendung von Acetonitril-Wasser (37:63)]. Durch Gradientenelution kann man diese Schwierigkeiten ausschalten und zu einer vollständigen Auftrennung des in Blattextrakten vorliegenden Glykosidgemisches gelangen. Von den als Referenz verwendeten Digitalisglykosiden haben wir 2–5  $\mu\text{l}$  einer 0.08 %igen methanolischen Lösung eingespritzt, von den gereinigten Blattextrakten wurden 2–10  $\mu\text{l}$  einer methanolischen Lösung verwendet, entsprechend ca. 0.5–2.5 mg trockener Blattdroge. Als Messwellenlänge haben wir 230 nm gewählt, obwohl dies nicht dem Absorptionsmaximum der Cardenolide (218–220 nm) entspricht. Während man bei reinen Glykosiden noch relativ gut bei 220 nm arbeiten kann<sup>5–7</sup>, empfiehlt es sich bei gereinigten Drogenextrakten und bei Gradientenelution die Detektion bei 230 nm vorzunehmen, da das Signal-Rausch-Verhältnis hier günstiger liegt. Lindner und Frei<sup>3</sup> haben schon früher für die Messung den Bereich von  $225 \pm 10$  nm vorgeschlagen und auch Erni und Frei<sup>6</sup> haben etliche Chromatogramme bei 230 nm aufgenommen. Die Fig. 1–5 zeigen die Trennungen der wichtigsten in *Digitalis lanata* EHRH., *Digitalis heywoodii* P. et Silva und *Digitalis lutea* L. vorkommenden Glykoside. Die Identität jeder Substanz bzw. jedes peaks wurde durch Cochromatographie mit authentischem Material gesichert.

Die ausgezeichneten Resultate, die man durch Derivatisierung der Glykoside vor der Säule erhält —Umwandlung in die 4-Nitrobenzoyl ester nach Nachtmann *et al.*<sup>9</sup>— lassen sich nach unseren Erfahrungen nicht auf Gesamtextrakte übertragen. Offenbar enthalten selbst gereinigte Extrakte noch beträchtliche Mengen an acylierbaren Begleitstoffen, die bei der HPLC-Analyse als nicht identifizierbare peaks erscheinen<sup>16</sup>. Wir ziehen deshalb bei der Untersuchung von Blattextrakten die Analyse der underivatisierten Cardenolide vor, während wir bei der Prüfung von Reinglyko-

sidpräparaten die HPLC-Trennung der 4-Nitrobenzoylderivate als besonders vorteilhaft ansehen.

In der zweiten Mitteilung berichten wir über die quantitative Bestimmung der herzwirksamen Glykoside in Digitalisblättern mittels HPLC.

#### DANKSAGUNG

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bonn-Bad Godesberg) für die Bereitstellung des HPLC-Gerätes und für finanzielle Unterstützung. Herrn Dr. F. Kaiser, Boehringer-Mannheim danken wir für die Überlassung von Glucoevatronosid, Glucogitorosid, Glucolanadoxin, Glucoverodoxin und Glucogitofucosid. Herrn Dr. A. Angliker, Sandoz AG, Basel für die Lanatoside A, B, C und für Digitalinum verum.

#### LITERATUR

- 1 F. J. Evans. *J. Chromatogr.*, 88 (1974) 411.
- 2 M. C. Castle. *J. Chromatogr.*, 115 (1975) 437.
- 3 W. Lindner und R. W. Frei. *J. Chromatogr.*, 117 (1976) 81.
- 4 P. H. Cobb. *Analyst, (London)*, 101 (1976) 768.
- 5 K. Karch, I. Sebastian, I. Halász und H. Engelhardt. *J. Chromatogr.*, 122 (1976) 171.
- 6 F. Erni und R. W. Frei. *J. Chromatogr.*, 130 (1977) 169.
- 7 Y. Fujii, H. Fukuda, Y. Saito und M. Yamazaki. *J. Chromatogr.*, 202 (1980) 139.
- 8 V. Ya. Davydov, M. E. Gonzalez und A. V. Kiselev. *J. Chromatogr.*, 204 (1981) 293.
- 9 F. Nachtmann, H. Spitzzy und R. W. Frei. *J. Chromatogr.*, 122 (1976) 293.
- 10 J. C. Gfeller, G. Frey und R. W. Frei. *J. Chromatogr.*, 142 (1977) 271.
- 11 G. Schwedt. *Angew. Chemie*, 91 (1979) 192.
- 12 M. Wichtl und R. Freier. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 118 (1978) 798.
- 13 F. Hammerstein und F. Kaiser. *Planta Med.*, 21 (1972) 5.
- 14 J. Jurenitsch, B. Kopp, H. Kirchner und W. Kubelka. *Planta Med.*, 39 (1980) 272.
- 15 G. Tittel und H. Wagner. *Planta med.*, 39 (1980) 125.
- 16 R. W. Frei. *Planta Med.*, 38 (1980) 1.