

CHROM. 14,697

HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER HERZWIRKSAMEN GLYKOSIDE VON *CONVALLARIA MAJALIS* L. DURCH SERIENSCHALTUNG VERSCHIEDEN POLARER "REVERSED-PHASE" SÄULEN*

J. JURENITSCH*, B. KOPP, E. BAMBERG-KUBELKA, R. KERN und W. KUBELKA
Institut für Pharmakognosie der Universität Wien, Währingerstrasse 25, A-1090 Wien (Österreich)
(Eingegangen am 30. Dezember 1981)

SUMMARY

*High-performance liquid chromatographic separation of the cardiac glycosides of *Convallaria majalis* L. by coupling "reversed-phase" columns of different polarity*

A systematic investigation of high-performance liquid chromatographic (HPLC) conditions employing 27 cardenolide glycosides of *Convallaria majalis* showed that LiChrosorb RP-2 possesses the best separation efficiency for the "polar" glycosides whereas LiChrosorb RP-8 can be used for analysis of the "less polar" fraction. For crude extracts from *Convallaria majalis* the best results were obtained by coupling of a LiChrosorb RP-2 precolumn and two analytical columns (LiChrosorb RP-2 and LiChrosorb RP-8) in series in combination with stepwise gradient elution with acetonitrile–water. A comparison of the new method with the paper chromatographic technique currently used showed that the HPLC method gives much more information about the composition of these complex mixtures of cardiac glycosides. It also offers great advantages for the quantitative determination of single cardenolides in *Convallaria majalis* L.

EINLEITUNG

Das Maiglökchen (*Convallaria majalis* L.) wird seit langem wegen seines Gehaltes an herzwirksamen Cardenolidglykosiden^{1–14} pharmazeutisch verwendet. Für die Qualitätskontrolle zog man zunächst biologische Verfahren oder die photometrische Bestimmung des Gesamtcardenolidgehaltes heran (vgl. Lit. 15–18). Aussagekräftiger ist die auch heute noch häufig angewendete^{19–21} Methode nach Wichtl *et al.*¹⁵, welche die Erfassung der Convallariaglykoside nach papierchromatographischer Trennung in 6 bzw. 7 Zonen vorsieht. Dieses Verfahren kann jedoch in Anbetracht der grossen Anzahl an inzwischen neu gefundenen

* Auszugsweise vorgetragen beim "International Research Congress on Natural Products as Medicinal Agents", Strasbourg, 6.–11. Juli 1980; Teil der Diplomarbeiten R. Kern und E. Bamberg-Kubelka, Universität Wien, 1979 und 1980.

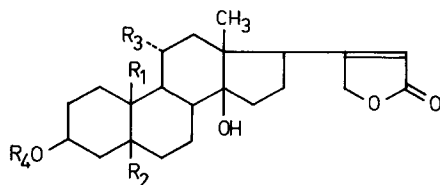
Convallaria-Cardenoliden¹³ (vgl. Tabelle I) nicht mehr befriedigen. Da auch die Dünnschichtchromatographie eine zu geringe Trennkapazität aufweist (kurze Laufstrecke, störende Ballaststoffe), können einigermaßen sichere Aussagen über den Gehalt an einzelnen Glykosiden nur durch photometrische Messung nach kombinierter Anwendung von Säulen-, Dünnschicht- und/oder Papierchromatographie gemacht werden.

Eine wesentliche Verbesserung versprach der Einsatz der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), die in letzter Zeit verschiedentlich für die Analyse von

TABELLE I

STRUKTUR DER IN DER VORLIEGENDEN ARBEIT VERWENDETEN HERZWIRKSAMEN GLYKOSIDE, GEORDNET IN DER AN "REVERSED PHASE" HPLC-SYSTEMEN AUFTRETENDEN ELUTIONS FOLGE

Allose = β -D-Allopyranosyl; AllM = 6-Desoxy- β -D-allopyranosyl; Arab = α -L-Arabinopyranosyl; Glu = β -D-Glucopyranosyl; GuM = 6-Desoxy- β -D-gulopyranosyl; Rh = 6-Desoxy- α -L-mannopyranosyl.



Glykoside	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Lit.
Glykosid P ₂	CH ₃	OH	OH	Allose-	13
Glykosid K	CH ₂ OH	OH	OH	Rh-	13
Thollosid	CHO	OH	OH	Rh-	13
Glykosid L	CH ₂ OH	OH	OH	GuM-	13
Glykosid G	CH ₂ OH	H	OH	Rh-	13
Glykosid P ₁	CH ₃	OH	OH	Rh-AllM-	13
Lokundjosid	CH ₃	OH	OH	Rh-	8
Glykosid E ₃	CHO	OH	OH	GuM-	13
Glykosid E ₁	CH ₃	OH	OH	GuM-	13
Rhodexosid	CH ₃	H	OH	Glu-Rh-	10
Rhodexin A	CH ₃	H	OH	Rh-	10
Convallatoxosid	CH ₂ OH	OH	H	Glu-Rh-	7
Convallolid	CHO	OH	H	Glu-Rh-	3
Convallatoxol	CH ₂ OH	OH	H	Rh-	4
Desglucocheirotoxol	CH ₂ OH	OH	H	GuM-	11
Glykosid U	CHO	OH	H	Arab-AllM-	13
Glykosid H ₁	CHO	OH	H	Glu-Rh-	13
Convallatoxin	CHO	OH	H	Rh-	1,2
Strophanollosid	CH ₂ OH	OH	H	AllM-	12
Glykosid F	CHO	OH	H	Rh-AllM-	13
Desglucocheirotoxin	CHO	OH	H	GuM-	5
Glykosid S	CH ₂ OH	H	H	Glu-Rh-	13
Glykosid Z	CH ₂ OH	H	H	Rh-AllM-	13
Strophallosid	CHO	OH	H	AllM-	12
Periplorhamnosid	CH ₃	OH	H	Rh-	9
Perigulosid	CH ₃	OH	H	GuM-	11
Peripallosid	CH ₃	OH	H	AllM-	12

Cardenoliden (meist Digitalisglykosiden) und Bufadienoliden herangezogen wurde²²⁻³⁴. Der weitaus grösste Teil dieser Arbeiten setzt sich mit der Trennung einer beschränkten Zahl dieser Verbindungen auseinander, wobei neben dem Einsatz verschiedener Sorbentien und mobiler Phasen auch durch Derivatisierung versucht wurde, die Selektivität, Auflösung und Nachweisgrenzen zu optimieren. Mit der Erfassung der herzwirksamen Glykoside in pflanzlichen Drogen beschäftigten sich bisher nur wenige Autoren, wobei neben *Digitalis lanata* kürzlich auch *Urginea maritima*, *Nerium oleander* und *Nerium odorum* untersucht wurden^{25,35-39}.

Für die HPLC-Bestimmung der Cardenolide in *Convallaria majalis* war das Hauptgewicht auf die Entwicklung eines Systems mit hoher Trennkapazität zu richten, welches weitgehend die Erfassung der einzelnen Cardenolidglykoside (Tabelle I) erlaubt. Im Hinblick auf eine möglichst einfache apparative Anordnung sollte alleine mit UV-Detektion ohne jede Derivatisierung das Auslangen gefunden werden.

EXPERIMENTELLES

Apparaturen

Flüssigkeits-Chromatograph Perkin-Elmer Series 3 + Rheodyne Injektor (175- μ l Schleife); Detektor Perkin-Elmer LC 65 T, Wellenlänge 221 nm; Integrator Perkin-Elmer M 2; Schreiber Perkin-Elmer 023.

Säulen (Knauer, Oberursel, B.R.D.) 250 \times 4.6 mm I.D.: LiChrosorb RP-2 (10 μ m), LiChrosorb RP-8 (7 μ m), LiChrosorb RP-18 (7 μ m). Vorsäule (40 \times 4.6 mm I.D.): LiChrosorb RP-2 (5 μ m). Bei Analysen mit Säulenkombinationen wurden die einzelnen Säulen unter Verwendung totvolumenfreier Zwischenstücke jeweils in Serie geschaltet.

Mobile Phase: Acetonitril (HPLC Grade S, Rathburn Chemicals, Walkerburn, Grossbritannien)-Wasser; Zusammensetzung und Durchflussraten vgl. Legenden zu den Abbildungen.

Substanzen: Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Reinglykoside wurden im Institut für Pharmakognosie der Universität Wien aus *Convallaria majalis* L. isoliert (vgl. z.B. Lit. 13).

Testlösungen: Pro Analyse injizierten wir 1-10 μ g je Reinglykosid, gelöst in 30 μ l 70%igem Äthanol.

Papierchromatographie: Die Aufbereitung der *Convallaria*-Droge und die papierchromatographische Trennung der Cardenolide führten wir nach der Vorschrift von Wichtl *et al.*¹⁵ durch. Nach Markieren der einzelnen Zonen an Hand des besprühten Leitchromatogrammes schnitten wir die einzelnen Zonen in etwa 1 cm² grosse Stücke und eluierten eine Stunde lang unter häufigem Umschwenken mit Methanol. Nach Filtrieren der Lösung wurde unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft und die einzelnen Rückstände in je 1.0 ml 70%igem Äthanol aufgenommen. Von diesen Lösungen wurden 30 μ l zur HPLC-Messung verwendet.

Dünnschichtchromatographie: Lokundjoid/Glykosid P₁/Glykosid E₃ bzw. Convallatoxin/Glykosid H₁/Strophanollosid und Desglucocheirotxin/Glykosid S lassen sich mit folgendem DC-System trennen: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (MERCK, Darmstadt, B.R.D.); Mobile Phase: Chloroform-Methanol-Wasser

(70:30:10; Unterphase), hR_F -Werte: Lokundjosid = 47, Glykosid P₁ = 29, Glykosid E₃ = 42; Convallatoxin = 60, Strophanollosid = 53, Glykosid H₁ = 20; Desglucocheirototoxin = 64, Glykosid S = 18; Detektion: Besprühen der auf 103–105°C erhitzten Platte mit Vanillin–Schwefelsäure-Reagens (0.1 g Vanillin + 4 ml Äthanol + 16 ml konz. Schwefelsäure). Die angeführten Cardenolide zeigen —je nach Aglykon— unterschiedliche Färbungen, weshalb auch die Substanzen mit ähnlichem hR_F -Wert eindeutig zugeordnet werden können.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Nachdem entsprechende Vorversuche gezeigt hatten, dass sich für die HPLC-Trennung der Convallariacardenolide in erster Linie "reversed phase" Systeme mit Acetonitril–Wasser als mobile Phase eignen³⁰, überprüften wir zunächst die —teilweise differierenden— Literaturangaben^{22,23,30,40} bezüglich des Absorptionsmaximums in diesem Lösungsmittel. Sowohl bei "stop flow" Messungen im HPLC-System als auch bei direkter Aufnahme der UV-Spektren lag das durch den ungesättigten Laktanring bedingte Maximum, das in methanolischer Lösung bei 217 nm auftritt, in Acetonitril–Wasser (20:80) bei 221 nm. Wir detektierten daher bei allen folgenden HPLC-Messungen, bei denen ausschliesslich Acetonitril–Wasser als mobile Phase diente, bei 221 nm. Nun wurde mittels einer Lösung von sieben Glykosiden (Lokundjosid, Convallosid, Convallatoxin, Desglucocheirototoxin, Convallatoxin, Desglucocheirototoxin und Periplorhamnosid) versucht, optimale Trennbedingungen zu finden. In erster Linie prüften wir den Einfluss der Polarität der stationären Phase, indem wir das Testgemisch an LiChrosorb RP-18, RP-8 und RP-2 chromatographierten. Dabei variierten wir zunächst im isokratischen Betrieb die Eluentszusammensetzung und -geschwindigkeit, aber auch die Säulentemperatur. Bei Verwendung von LiChrosorb RP-18 liessen sich die meisten Komponenten des Testgemisches gut trennen. Desglucocheirototoxin und Convallatoxin jedoch wiesen unter allen Versuchsbedingungen nahezu gleiche Retentionszeit auf. Da wir uns in diesem Fall von einer Anhebung der Säulentemperatur keine Verbesserung der Trennung versprachen, setzten wir die Untersuchungen an LiChrosorb RP-8 fort: Mit Acetonitril–Wasser (23:77) konnte nunmehr das Paar Desglucocheirototoxin/Convallatoxin bei Durchflussraten von 0.9, 1.0, 1.2 und 1.5 ml/min getrennt erfasst werden, während höhere Flussgeschwindigkeiten auch bei gleichzeitigem Absenken der Acetonitril-Konzentration zu einer Verschlechterung der Auflösung führten; keine Trennung der beiden Substanzen war bei Erhöhung der Säulentemperatur zu erzielen. Auch bei Zusatz weiterer Cardenolide fanden wir unter diesen Bedingungen noch zufriedenstellende Trennleistungen (Fig. 1). Als Nachteil erwiesen sich die niedrigen Kapazitätsverhältnisse der polaren Glykoside: Glykosid G und Lokundjosid konnten nicht einzeln erfasst werden. Im Bereich der weniger polaren Glykoside stellten Desglucocheirototoxin und Glykosid U ein kritisches Paar dar.

Wir setzten daher LiChrosorb RP-2 ein, wobei wir vor allem in bezug auf die mit kurzer Retentionszeit eluierten Glykoside eine Verbesserung der Selektivität erhofften. Zunächst ergab das an LiChrosorb RP-8 vollständig trennbare Cardenolidgemisch (Fig. 2) bei Verwendung von Acetonitril–Wasser (23:77) nur noch 9 Peaks, allerdings wiesen die Chromatogramme im Bereich der mit kurzer Retentionszeit eluierten Verbindungen eine deutlich verbesserte Auflösung auf. Die vorerst nicht

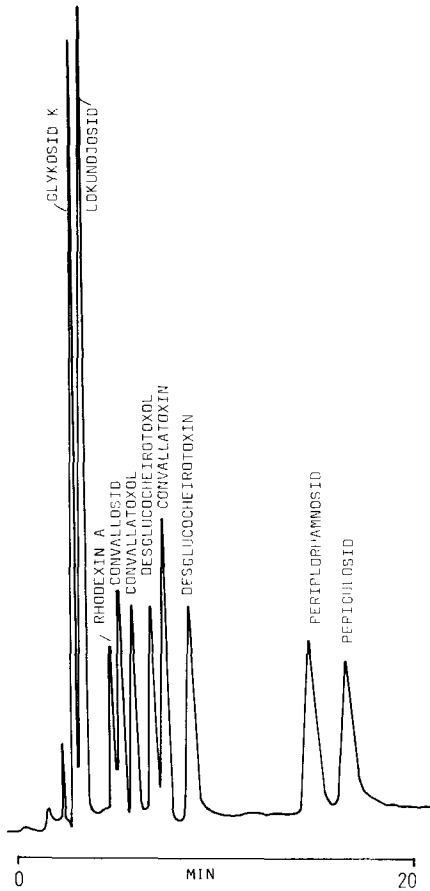


Fig. 1. HPLC-Trennung von 10 Cardenolidglykosiden aus *Convallaria majalis* bei isokratischer Arbeitsweise. Säule: LiChrosorb RP-8 ($7 \mu\text{m}$), $250 \times 4.6 \text{ mm}$ I.D. Mobile Phase: Acetonitril-Wasser (23:77), 1.5 ml/min. Temperatur: 22°C .

getrennten Komponenten Convallolid und Rhodexin A konnten nach Senken der Acetonitril-Konzentration auf 18 % einzeln erfasst werden, was jedoch mit einer drastischen Verlängerung der Gesamtanalysenzeit verbunden war (Fig. 2). Auch an RP-2 bildeten Lokundjosid/Glykosid G bzw. Desglucocheirotxin/Glykosid U kritische Paare. Die Lösung dieses Trennproblems versuchten wir durch Einsatz der Gradiententechnik zu erreichen.

Während an LiChrosorb RP-8 weder mit Lineargradienten noch mit Stufengradienten eine Verbesserung der Trennleistung gegenüber isokratischem Betrieb eintrat, fanden wir an LiChrosorb RP-2 bei Anwendung eines Stufengradienten sowohl hinsichtlich der Auftrennung der polaren Glykoside als auch in bezug auf die Gesamtanalysendauer günstigere Bedingungen vor. Die kritischen Paare Lokundjosid/Glykosid G und Desglucocheirotxin/Glykosid U konnten nunmehr getrennt erfasst werden und auch die Chromatographie eines nach Wichtl *et al.*¹⁵ bereiteten vorgereinigten Droгенаuszuges lieferte zufriedenstellende Ergebnisse (Fig. 3). Beim Zuspritzen weiterer Reinglykoside stellten wir aber fest, dass die Glykoside K, P₂ und L₁ ebenso wie

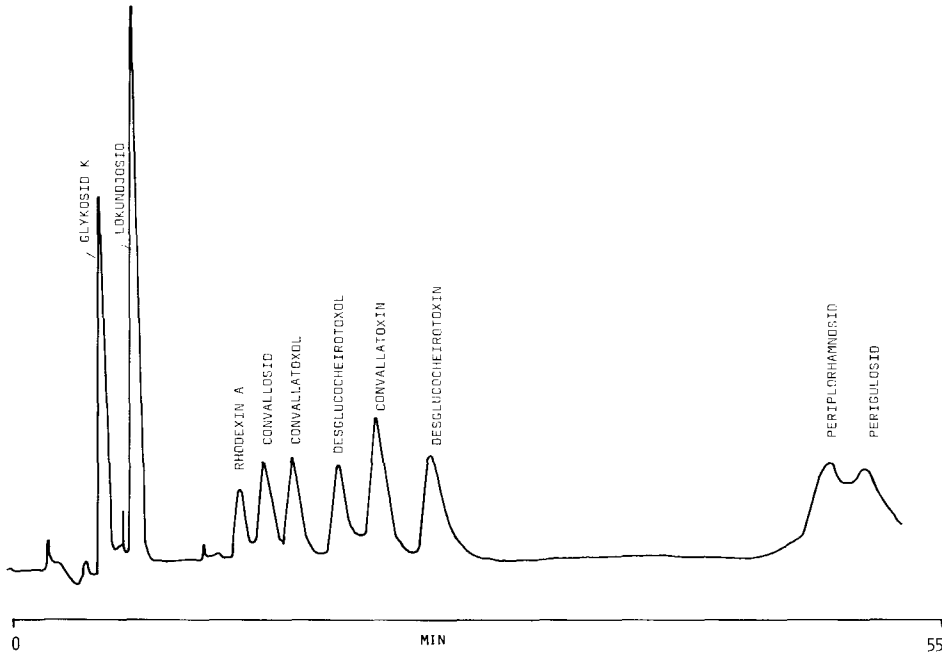


Fig. 2. HPLC-Trennung von 10 Convallariaglykosiden an LiChrosorb RP-2. Säule: LiChrosorb RP-2 (10 μ m), 250 \times 4.6 mm I.D. Mobile Phase: Acetonitril-Wasser (18:82), 1 ml/min. Temperatur: 22°C.

Thollosid, Glykosid L und K bzw. auch die Glykoside G, E₃ und P₁ mit nahezu gleichen Retentionszeiten eluiert werden.

Obszwar diese einfachen HPLC-Systeme einen wesentlich besseren Einblick in die Zusammensetzung natürlicher Gemische von Convallaria-Cardenoliden erlaubten als andere chromatographische Verfahren, hatten sich auch gewisse Nachteile gezeigt. So mussten wir bei der Messung von mit Bleifällung vorgereinigten Drogenextrakten nach *ca.* 50 Analysenläufen ein drastisches Absinken der Auflösung durch verschmutzte Säulenköpfe feststellen. Der mit Bleiacetat nicht entfernte Begleitstoffanteil wirkte sich hinsichtlich der Auswertbarkeit der Chromatogramme nachteilig aus, da im Bereich der ohnehin schwierig zu trennenden polaren Glykoside störende Peaks auftraten. Zur Lösung dieser Probleme bot sich zunächst der Einbau von Vorsäulen an, die eine rasche Reinigung verschmutzter Säulenköpfe erlauben; die zur Verbesserung der Trennung im ersten Teil des Chromatogrammes notwendige Erhöhung der Trennstufenzahl hofften wir durch Serienschaltung zweier analytischer Trennsäulen zu erreichen.

Während der Einbau einer mit LiChrosorb RP-2 gefüllten Vorsäule keinen signifikanten Einfluss auf die Trennleistung ergab und sich somit für die Analyse verunreinigter Drogenextrakte empfahl, kam es bei Kopplung mit einer weiteren analytischen LiChrosorb RP-2-Säule zu einer starken Peak-verbreiterung und damit drastischen Abnahme der Auflösung. Bessere Ergebnisse erzielten wir bei Anwendung eines Stufengradienten durch Serienschaltung der LiChrosorb RP-2 Vorsäule mit zwei analytischen Säulen, von denen die eine mit LiChrosorb RP-2 und die andere mit LiChrosorb RP-18 gefüllt war (Fig. 4). Die im ersten Abschnitt des Chro-

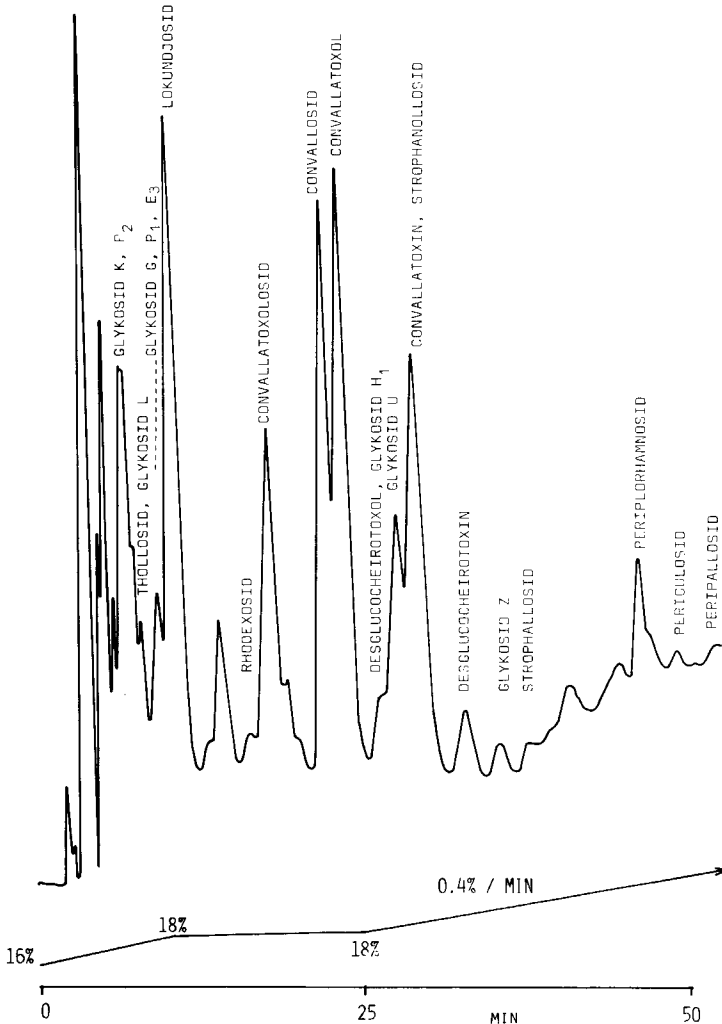


Fig. 3. HPLC eines Drogenauszuges aus *Convallaria majalis*. Säule: LiChrosorb RP-2 (10 μm), 250 \times 4.6 mm I.D. Mobile Phase: Acetonitril-Wasser, Gradient 16:84 bis 18:82 mit 0.2%/min, nach 25 min mit 0.4%/min bis Ende der Analyse, Fluss: 1 ml/min. Temperatur: 22°C.

matogramms auftretenden polaren Glykoside lagen nun über einen grösseren Retentionsbereich verteilt vor, Convallatoxol und Convallosid, beides Hauptkomponenten natürlicher Gemische von Convallariaglykosiden, waren fast vollständig getrennt und Desglucocheirototoxin und Glykosid F konnten einzeln nachgewiesen werden.

Eine noch grössere Trennschärfe erzielten wir bei Austausch der LiChrosorb RP-18 gegen eine LiChrosorb RP-8 Säule. Diese Säulenkombination RP-2/RP-8 stellte sowohl hinsichtlich der Trennung der polaren als auch der unpolaren Convallariaglykoside den günstigsten Kompromiss dar. Vor allem Convallatoxol und Convallosid waren fast bis zur Basislinie aufgetrennt und auch zwischen Desglucocheirototoxin, Glykosid U und Convallatoxin waren Minima vorhanden, die eine quantitati-

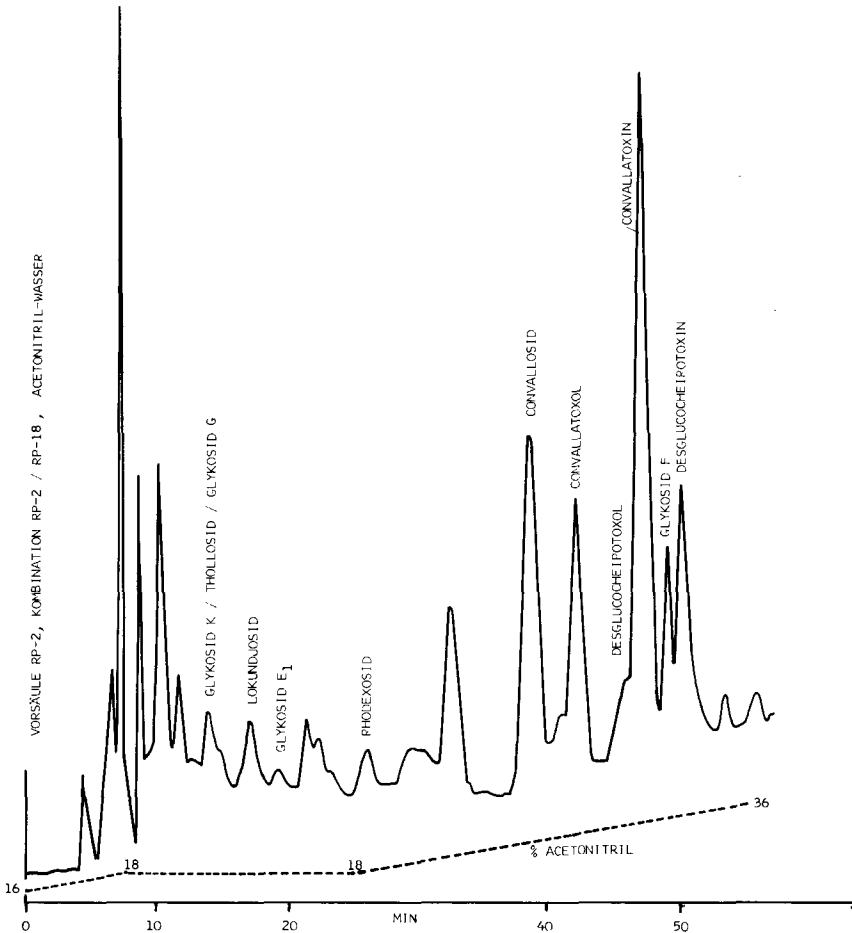


Fig. 4. HPLC eines Drogenauszuges von *Convallaria majalis* unter Verwendung einer RP-2/RP-18 Säulenkombination. Säulen: LiChrosorb RP-2 ($5\ \mu\text{m}$), $40 \times 4.6\ \text{mm}$ I.D. (Vorsäule), LiChrosorb RP-2 ($10\ \mu\text{m}$), $250 \times 4.6\ \text{mm}$ I.D. und LiChrosorb RP-18 ($7\ \mu\text{m}$), $250 \times 4.6\ \text{mm}$ I.D. in Serie geschaltet. Mobile Phase: Acetonitril-Wasser, Gradient 16:84 bis 18:82 mit $0.2\ \%/min$, nach 25 min mit $0.4\ \%/min$ bis Ende der Analyse, Fluss: $1\ \text{ml}/min$. Temperatur: 22°C .

ve Auswertung mittels Integrator erlaubten (Fig. 5). Durch die Verlängerung der Trennstrecke wurde ausserdem eine gute Abtrennung der mit kurzer Retentionszeit eluierten Begleitstoffe erreicht. Das Chromatogramm einer Mischung von Hauptglykosiden und solchen Cardenoliden, die —soweit bisher bekannt— nur in sehr kleinen Mengen in *Convallaria majalis* enthalten sind, zeigt allerdings noch verbleibende Trennprobleme auf (Fig. 5): So besitzt Lokundjosid die gleiche Retentionszeit wie die Nebenglykoside P_1 und E_3 , Convallatoxin überdeckt die Nebenglykoside H_1 und Strophanollosid; Desglucocheirotoxin und Glykosid S konnten ebenfalls nicht einzeln erfasst werden. Diese Substanzen lassen sich allerdings dünnstschichtchromatographisch trennen, wodurch eine entsprechende Kontrolle des HPLC-Eluates möglich ist.

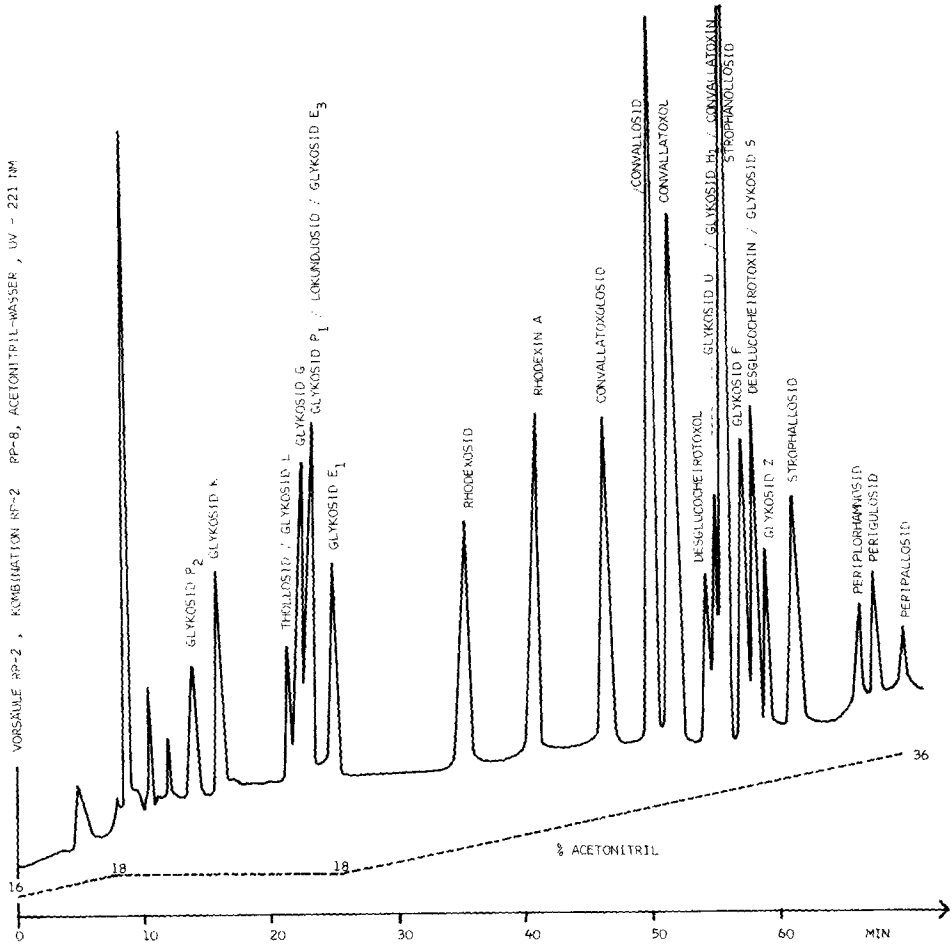


Fig. 5. HPLC-Trennung von 27 Reinglykosiden aus *Convallaria majalis* unter Verwendung einer RP-2/RP-8 Säulenkombination. Säulen: LiChrosorb RP-2 (5 μ m), 40 \times 4.6 mm I.D. (Vorsäule), LiChrosorb RP-2 (10 μ m), 250 \times 4.6 mm I.D. und LiChrosorb RP-8 (7 μ m), 250 \times 4.6 mm I.D. in Serie geschaltet. Mobile Phase: Acetonitril-Wasser, Gradient, Fluss und Temp. vgl. Fig. 4.

Eindrucksvoll lässt sich die Leistungsfähigkeit des neuen HPLC-Verfahrens durch Vergleich mit der bisher für die Einzelglykosidbestimmung eingesetzten Methode¹⁵ demonstrieren. Dazu wurde ein Drogenauszug papierchromatographisch getrennt und die einzelnen Zonen wie für die photometrische Cardenolidbestimmung ausgeschnitten. Die HPLC-Trennung der Cardenolide ergab, dass in den PC-Zonen jeweils bis zu 6 Komponenten vorlagen (Fig. 6). Auffallend war die geringe Trennschärfe der Papierchromatographie: so konnte das in Zone C auftretende Convallatoxin auch in den benachbarten Zonen B und D detektiert werden, ähnliches gilt bezüglich Lokundjosid, Glykosid E₁, Desglucocheirototoxin und Desglucocheirotokol.

Die durch Serienschaltung unterschiedlich polarer HPLC-Säulen erzielte Trennung der herzwirksamen Glykoside von *Convallaria majalis* stellt somit im Vergleich zum papierchromatographischen Verfahren eine deutliche Verbesserung dar. Wegen

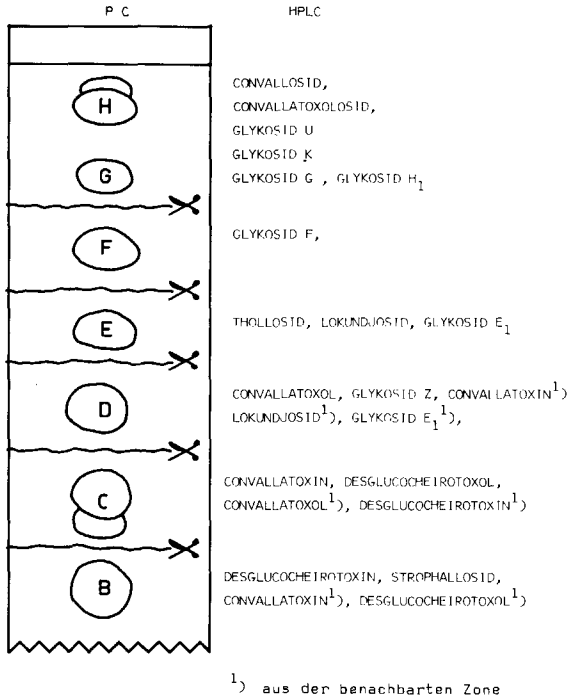


Fig. 6. Ergebnisse der HPLC-Analysen eines papierchromatographisch fraktionierten *Convallaria*-Extraktes.

der relativ kurzen Analysendauer und der Möglichkeit, auch bei Vorliegen extremer Konzentrationsunterschiede die einzelnen Substanzen zu erfassen, eignet sich das HPLC-Verfahren vorzüglich für die quantitative Erfassung der Herzglykoside in *Convallaria*-Drogen⁴¹.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Laufe einer systematischen Untersuchung zur Trennung der Cardenolide von *Convallaria majalis* L. mittels HPLC wurden 27 Reinglykoside berücksichtigt. Die stationäre Phase LiChrosorb RP-2 zeigte sich für die Trennung der "polaren" Glykosidfraktion besonders geeignet, während sich LiChrosorb RP-8 eher für die Untersuchung der "schwächer polaren" Glykoside bewährte. Da jedoch eine einzige Säule für die Auftrennung des gesamten Komplexes nicht ausreichte, wurde durch Serienschaltung unterschiedlich polarer "reversed phase" Säulen die Trennstrecke verlängert. Am besten geeignet erwies sich das Hintereinanderschalten einer LiChrosorb RP-2 Vorsäule und zweier analytischer Säulen (LiChrosorb RP-2 und RP-8) in Kombination mit einem Stufengradienten von Acetonitril-Wasser. Neben einer Besprechung von Vor- und Nachteilen der untersuchten Systeme wird auch ein Vergleich mit der bisher verwendeten Papierchromatographie beschrieben. Das neue HPLC-Verfahren erlaubt einen wesentlich besseren Einblick in die Zusammensetzung dieser komplexen Substanzgemische; es ermöglicht erstmals die Trennung der Hauptglykoside sowie der Mehrzahl der Nebenkomponenten in einem Arbeitsgang.

LITERATUR

- 1 W. Karrer, *Helv. Chim. Acta*, 12 (1929) 506.
- 2 K. Mohr und T. Reichstein, *Pharm. Acta, Helv.*, 23 (1948) 369.
- 3 J. Schmutz und T. Reichstein, *Pharm. Acta, Helv.*, 22 (1947) 359.
- 4 R. Tschesche und F. Seehofer, *Chem. Ber.*, 87 (1954) 1108.
- 5 R. Tschesche, H. J. Wulff, U. Dölberg und G. Snatzke, *Naturwissenschaften*, 46 (1959) 109.
- 6 R. Laufke, *Planta Med.*, 6 (1958) 237.
- 7 N. F. Komissarenko, *Dokl. Akad. Naukl. SSR*, 147 (1962) 625.
- 8 W. Bleier, W. Kubelka, Ek. Weiss und M. Wichtl, *Pharm. Acta Helv.*, 40 (1965) 554.
- 9 W. Kubelka, *Monatsh. Chem.*, 98 (1967) 1262.
- 10 W. Kubelka und S. Eichhorn-Kaiser, *Pharm. Acta Helv.*, 45 (1970) 513.
- 11 W. Kubelka, *Planta Med.*, 19 (1971) 153.
- 12 W. Kubelka, B. Kopp und K. Jentzsch, *Pharm. Acta Helv.*, 50 (1975) 353.
- 13 B. Kopp und W. Kubelka, *Planta Med.*, (1982) im Druck.
- 14 B. Schenk, P. Junior und M. Wichtl, *Planta Med.*, 40 (1980) 1.
- 15 M. Wichtl, G. Peithner und L. Fuchs, *Planta Med.*, 10 (1962) 304.
- 16 L. Fuchs, M. Wichtl und G. Peithner, *Arzneimittelforschung*, 13 (1963) 220.
- 17 M. Wichtl, *Arzneimittelforschung*, 17 (1967) 1277.
- 18 K. P. Odenthal, G. Vogel und K. Görler, *Pharm. Ind.*, 40 (1978) 149.
- 19 J. König, *Diplomarbeit*, Universität Wien, Wien, 1978.
- 20 A. Mathé und W. Kubelka, *Acta Horticulturae*, 73 (1978) 35.
- 21 B. Kopp, W. Kubelka und K. Jentzsch, *Sci. Pharm.*, 49 (1981) 265.
- 22 M. C. Castle, *J. Chromatogr.*, 115 (1975) 437.
- 23 W. Lindner und R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, 117 (1976) 81.
- 24 F. Nachtmann, H. Spitzky und R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, 122 (1976) 293.
- 25 P. H. Cobb, *Analyst (London)*, 101 (1976) 768.
- 26 K. Shimada, M. Hasegawa, K. Hasebe, Y. Fujii und T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, 24 (1976) 2995.
- 27 F. Erni und R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, 130 (1977) 169.
- 28 M. S. F. Ross, *J. Chromatogr.*, 141 (1977) 107.
- 29 J. C. Gfeller, G. Frey und R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, 142 (1977) 271.
- 30 J. M. Enson und J. N. Seiber, *J. Chromatogr.*, 148 (1978) 521.
- 31 V. Y. Davydov, A. V. Kiselev, I. V. Mironova und Y. M. Saponikov, *Chromatographia*, 11 (1978) 591.
- 32 H. A. Nelson, S. V. Lucas und T. P. Gibson, *J. Chromatogr.*, 163 (1979) 169.
- 33 E. Heftmann und I. R. Hunter, *J. Chromatogr.*, 165 (1979) 283.
- 34 Y. Fujii, H. Fukuda, Y. Saito und M. Yamazaki, *J. Chromatogr.*, 202 (1980) 139.
- 35 J. Jurenitsch, B. Kopp, H. Kirchner und W. Kubelka, *Planta Med.*, 39 (1980) 272.
- 36 G. Tittel und H. Wagner, *Planta Med.*, 39 (1980) 125.
- 37 J. Jurenitsch, H. Kirchner und W. Kubelka, *Sci. Pharm.*, 49 (1981) 281.
- 38 G. Tittel und H. Wagner, *Planta Med.*, 42 (1981) 113.
- 39 G. Tittel und H. Wagner, *Planta Med.*, 43 (1981) 252.
- 40 M. Pilarski, *Diplomarbeit*, Universität Wien, Wien, 1979.
- 41 J. Jurenitsch, B. Kopp, E. Bamberg-Kubelka und W. Kubelka, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 235.