

CHROM. 14,698

Note

Bestimmung des Einzel- und Gesamtcardenolidgehaltes in *Convallaria majalis* L. mittels Hochleistungsflüssigchromatographie*

J. JURENITSCH*, B. KOPP, E. BAMBERG-KUBELKA und W. KUBELKA

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

(Eingegangen am 30. Dezember 1981)

Zur quantitativen Erfassung der Cardenolidglykoside in *Convallaria majalis* L. bediente man sich bisher eines Verfahrens, das nach papierchromatographischer Trennung des Glykosidkomplexes in sieben Zonen und Umsetzung mit Baljet-Reagens eine photometrische Bestimmung zuließ¹. In Anbetracht der grossen Anzahl inzwischen bekannt gewordener Convallariaglykoside^{2–4} genügt diese Methode jedoch keineswegs mehr den heutigen Anforderungen.

Nachdem kürzlich die Trennung von über 20 Convallaria-Cardenoliden mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gelang⁵, war es naheliegend, diese Methode auch für quantitative Zwecke nutzbar zu machen. Im Vordergrund stand dabei die Frage nach einer möglichst einfachen Probenaufbereitung und die Suche nach einem geeigneten inneren Standard, da neben der Bestimmung der Zusammensetzung des Glykosidkomplexes auch die Erfassung des Gesamtgehaltes an herz-wirksamen Glykosiden in Herba Convallariae angestrebt wurde.

EXPERIMENTELLES

Apparaturen: Flüssigkeitschromatograph 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.

Säulenkombination: Vorsäule (40 \times 4.6 mm I.D.) LiChrosorb RP-2 (5 μ m) und 2 Trennsäulen (250 \times 4.6 mm I.D.) LiChrosorb RP-2 (10 μ m) und LiChrosorb RP-8 (7 μ m) mittels totvolumenfreier Zwischenstücke in Serie geschaltet. Alle Säulen von Knauer (Oberursel, B.R.D.). Mobile Phase: Acetonitril (HPLC Grade S, Rathburn Chemicals, Walkerburn, Grossbritannien)–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.

Vergleichssubstanzen: Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Convallariaglykoside wurden im Institut für Pharmakognosie der Universität Wien isoliert (vgl. Lit. 5). Als innerer Standard diente Helveticosid reinst (Serva, Heidelberg, B.R.D.). Die einzelnen Cardenolide wurden an Hand der Retentionszeiten und durch Zuspritzen der Vergleichssubstanzen identifiziert.

* Teil der Diplomarbeit E. Bamberg-Kubelka, Universität Wien, 1980.

Probenaufbereitung: 1.5 g Folium (Herba, Flos) *Convallariae* (Sieb V, ÖAB 9) werden in einem 100-ml fassenden Rundkolben mit 15.00 ml Standardlösung (10.00 mg Helveticosid in 100.0 ml 70 %igem Äthanol) übergossen und 15 min auf dem siedenden Wasserbad unter Rückflusskühlung erhitzt; nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur fügt man 35 ml Wasser und zur Fällung der Ballaststoffe 10.0 ml Bleiessig (DAB. 6) zu und mischt gut durch. Der Bleiüberschuss wird durch Zugabe von 12.5 ml einer 10 %igen wässrigen Lösung von Dinatriumhydrogenphosphat ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wird durch Zentrifugieren abgetrennt, die klare Lösung abgegossen und ein aliquoter Teil von 50 ml mit 30 ml und viermal mit je 20 ml Chloroform-*n*-Butanol (2:1) ausgeschüttelt. Die in einem Rundkolben gesammelten Fraktionen bringt man unter vermindertem Druck bei max. 60°C zur Trockene und löst den verbleibenden Rückstand in 10 ml 70 %igem Äthanol. Nach Filtrieren durch ein Millipore-Filter (Type FA; Porenweite 1 µm) verwendet man 30 µl der klaren, hellgelb gefärbten Lösung für die HPLC-Messung. Berechnung: Die Korrekturfaktoren und die Einzelglykosidanteile bzw. der Gesamtcardenolidgehalt werden in der üblichen Weise berechnet⁶. Es empfiehlt sich eine tägliche Kontrolle der Faktoren.

Untersuchungsmaterial: Probe 1: Herba *Convallariae* ÖAB. 9, Kottas, Wien; Probe 2: Herba *Convallariae*, Wolkersdorf, Niederösterreich; Probe 3: Flos *Convallariae*, Wolkersdorf, Niederösterreich; Probe 4: Herba *Convallariae* ÖAB. 9, Kottas, Wien; Probe 5: Folium *Convallariae* russ. Typmuster 24536, Paul Müggenburg, Hamburg, B.R.D.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der direkten Einspritzung alkoholischer Drogenauszüge erschwerten intensive, durch Ballaststoffe verursachte Peaks die Zuordnung der Cardenolide erheblich. Eine Reinigung über Sep-Pak Silika bzw. C₁₈ Kartuschen (Waters Assoc., Milford, MA, U.S.A.) verlief unbefriedigend, da die Begleitstoffe nur zum Teil zurückgehalten wurden. Wir verwendeten daher im wesentlichen das schon von Wichtl *et al.*¹ vorgeschlagene Verfahren (Fällung der Ballaststoffe mit Bleiacetat, Ausschütteln der Cardenolide mit organischem Lösungsmittel) mit geringfügiger Modifikation. Vor der HPLC-Messung wurden die Proben durch Millipore-Filter gepresst, um eine Verlegung der Säulen zu vermeiden. Für die Aufbereitung der Proben war somit eine Reihe von Arbeitsschritten erforderlich, die eine gewisse Fehleranfälligkeit befürchten liessen. Um derartige Fehlerquellen auszuschliessen, versuchten wir einen inneren Standard zu finden, der schon bei der Drogenextraktion zugesetzt werden konnte. Die Digitalisglykoside Digoxin, α-Acetyldigoxin, Digitoxin und Lanatosid C erwiesen sich als ungeeignet, weil sie erst bei einer Steigerung des Acetonitrilanteiles in der mobilen Phase auf 60 % eluiert wurden, was die Analysenzeit nahezu verdoppelte. Cymarol, Cymarol, k-Strophanthin β, Erysimosol, α-Antiarin, Acovenosid A, Cheirosid A und Helveticosol überlappten mit einzelnen *Convallariaglykosiden*. Von allen geprüften Substanzen bildete nur Helveticosid eine Ausnahme: diese Verbindung war nahezu vollständig (4σ-Trennung) von Periplorhamnosid getrennt und bewirkte durch ihre günstige Lage im Chromatogramm auch keine Analysenverlängerung (Fig. 1).

Für die Eichung des Messsystems zogen wir die Hauptglykoside Lokundjosid, *Convallatoxol*, *Convallatoxin*, *Desglucocheirotxin* und *Convallosid* heran, von wel-

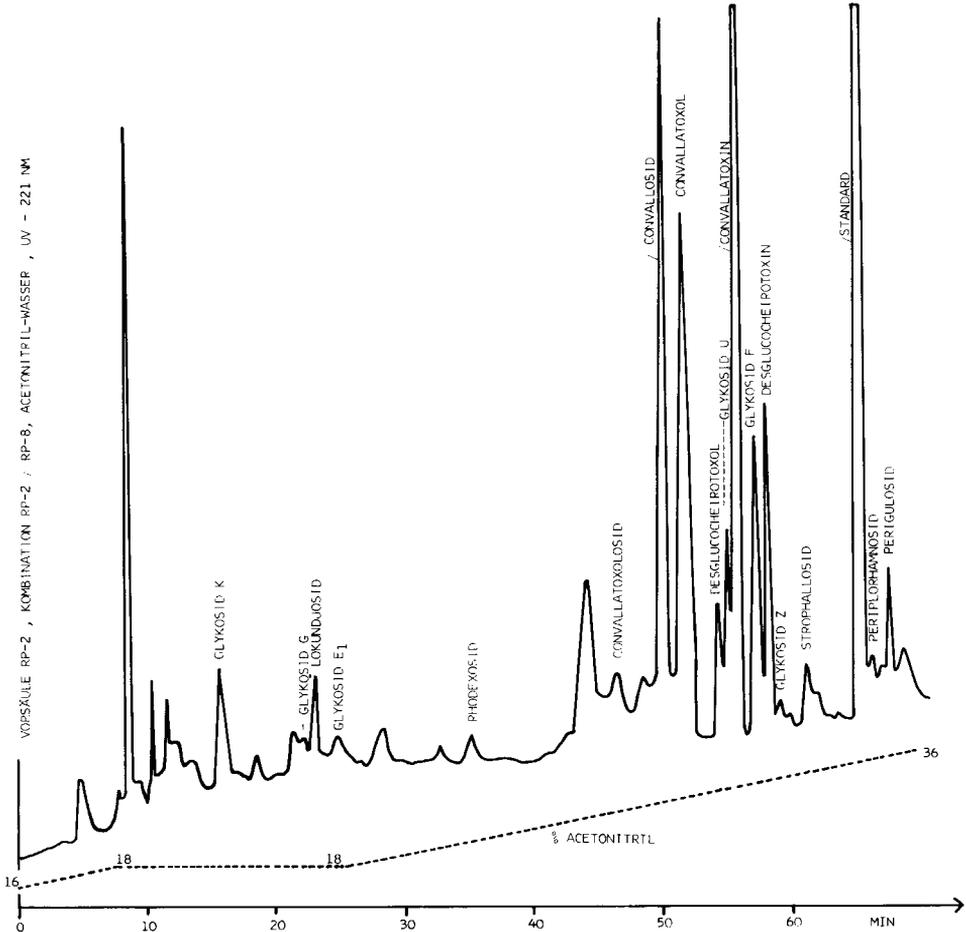


Fig. 1. HPLC eines vorgereinigten Drogenauszuges von *Convallaria majalis*. Säulen: LiChrosorb RP-2 (5 μm), 40×4.6 mm I.D. (Vorsäule), LiChrosorb RP-2 (10 μm), 250×4.6 mm I.D. und LiChrosorb RP-8 (7 μm), 250×4.6 mm I.D. in Serie geschaltet. Mobile Phase: Acetonitril-Wasser, Gradient 16:84 bis 18:82 mit 0.2%/min, nach 25 min mit 0.4%/min bis Ende der Analyse, Fluss: 1 ml/min. Temperatur: 22°C.

chen letzteres ein Diglykosid darstellt. Es ergaben sich in allen Fällen Eichgerade, die durch den Nullpunkt verliefen, womit die Korrekturfaktoren in der üblichen Weise⁶ berechnet werden konnten. Als Beispiel ist in Fig. 2 die Eichgerade von Convallatoxin dargestellt.

Da die Korrekturfaktoren (F) der Monoglykoside (Lokundjosid $F = 1.08$; Convallatoxol $F = 1.12$; Convallatoxin $F = 1.16$; Desglucocheirotosin $F = 1.10$) relativ geringe Unterschiede aufwiesen, schien es gerechtfertigt, bei den späteren Gehaltsbestimmungen von Drogen für die bei der Eichung nicht berücksichtigten Monoglykoside — diese liegen ja nur in geringer Menge vor — einen aus den oben angegebenen Faktoren gemittelten Wert ($F = 1.12$) heranzuziehen. Für die Ermittlung der Diglykoside verwendeten wir den Faktor von Convallosid ($F = 1.41$). Der gemittelte Korrekturfaktor der Monoglykoside verhält sich zum Faktor von Convallosid annä-

TABELLE I
 QUANTITATIVE AUSWERTUNG VON PROBE 2
 Anteil am Gesamtglykosidgehalt in %, Mw = Mittelwert.

| Cardenolide | 1. Extraktion | | | 2. Extraktion | | | 3. Extraktion | | | Gesamt- mittelwert |
|-----------------------------|---------------|-------|-------|---------------|-------|-------|---------------|-------|-------|-----------------------|
| | I* | 2* | Mw | I* | 2* | Mw | I* | 2* | Mw | |
| Glykosid K | 1.85 | 1.87 | 1.86 | 2.44 | 2.46 | 2.45 | 2.17 | 2.18 | 2.17 | 2.16 |
| Lokundjosid | 11.53 | 11.10 | 11.32 | 10.72 | 11.57 | 11.15 | 8.88 | 10.22 | 9.55 | 10.67 |
| Glykosid E ₁ | 1.16 | 1.22 | 1.19 | 0.99 | 1.25 | 1.12 | 1.22 | 1.29 | 1.26 | 1.19 |
| Rhodexin A | 2.17 | 2.79 | 2.48 | 3.28 | 1.34 | 2.31 | 1.45 | 1.69 | 1.57 | 2.12 |
| Convallatoxolosid | 1.26 | 1.60 | 1.43 | 1.68 | 0.58 | 1.13 | 2.43 | 1.52 | 1.98 | 1.51 |
| Convallatoxol | 11.75 | 11.65 | 11.70 | 12.62 | 12.29 | 12.45 | 12.44 | 13.53 | 12.99 | 12.38 |
| Desglucocheirotoxol | 16.87 | 15.77 | 16.32 | 15.26 | 15.57 | 15.41 | 13.45 | 14.39 | 13.92 | 15.22 |
| Convallatoxin | 3.82 | 3.28 | 3.55 | 3.49 | 3.17 | 3.33 | 3.41 | 3.50 | 3.46 | 3.45 |
| Glykosid F | 28.34 | 29.06 | 28.70 | 27.83 | 27.79 | 27.81 | 26.91 | 27.08 | 26.99 | 27.83 |
| Desglucocheirotoxin | 4.72 | 4.99 | 4.85 | 5.05 | 5.57 | 5.31 | 6.36 | 6.24 | 6.30 | 5.49 |
| Strophallojosid | 14.37 | 14.66 | 14.52 | 13.67 | 15.19 | 14.43 | 14.90 | 13.80 | 14.35 | 14.43 |
| Periporhamnosid | 0.48 | 1.01 | 0.75 | 1.33 | 2.00 | 1.67 | 2.89 | 1.96 | 2.38 | 1.60 |
| Perigulosid | 0.98 | 0.53 | 0.75 | 0.27 | 0.45 | 0.36 | 0.23 | 0.67 | 0.45 | 0.52 |
| Peripallosid | 0.71 | 0.45 | 0.58 | 0.18 | 0.29 | 0.24 | 1.43 | 0.40 | 0.92 | 0.58 |
| | — | — | — | 1.20 | 0.48 | 0.84 | 1.74 | 1.53 | 1.64 | 1.24 |
| % Gesamt- glykosidgehalt | 0.273 | 0.267 | | 0.266 | 0.272 | | 0.306 | 0.306 | | 0.282 |

* Getrennte HPLC-Messung.

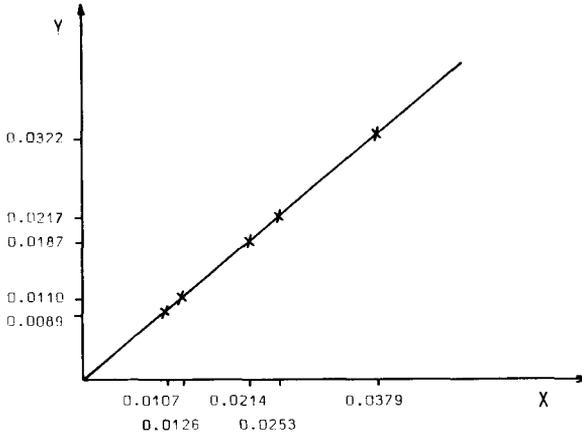


Fig. 2. Eichgerade von Convallatoxin. x = Einwaage Convallatoxin in mg; y = [Einwaage (mg Standard) \times Peakfläche (Convallatoxin)]/Peakfläche (Standard).

hernd umgekehrt proportional wie die entsprechenden spezifischen Extinktionskoeffizienten, was die Richtigkeit der näherungsweise Ermittlung der unbekanntenen Faktoren bestätigt.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Richtigkeit des neuen HPLC-Verfahrens wählten wir Convallaria-Proben mit unterschiedlichem Begleitstoffanteil, aber bekanntem Cardenolidgehalt (photometrische Messung nach Baljet-Reaktion¹), um Auskunft über die Anwendbarkeit des Verfahrens bzw. über die Effizienz der Probenvorbereitung zu erhalten. Zunächst führten wir von den Convallaria-Mustern 2 und 4, deren Gesamtcardenolidgehalt im üblichen Bereich¹ lag, jeweils drei getrennte Extraktionen durch und chromatographierten jeden Auszug zweimal (Tabelle I und II).

Aus den Daten ermittelten wir sodann die absolute Standardabweichung⁷ für die Einzelglykosidzusammensetzung (Tabelle III) und den Gesamtcardenolidgehalt. Letztere lag mit ± 0.024 in einem sehr günstigen Bereich, da sich die Werte durch Summierung einer grossen Anzahl von Einzeldaten ergeben.

Auch die in Tabelle III gezeigten absoluten Standardabweichungen der Einzelglykosidanteile liegen in einem für biologisches Material günstigen Bereich, wenn man berücksichtigt, dass es durch die relativ grosse Peakanzahl zu Flächenüberlappungen kommt. Die für die Hauptkomponenten gefundene maximale Abweichung von ± 1.08 spricht ebenfalls für die gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens.

Um die allgemeine Anwendbarkeit des Verfahrens zu gewährleisten, wurden im weiteren auch die Proben 1, 3 und 5 analysiert, wobei sich ebenfalls keine Störungen durch Ballaststoffe ergaben. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengestellt, die zusätzlich auch einen Vergleich mit den photometrisch ermittelten Gesamtcardenolidgehalten erlaubt. Unter Berücksichtigung der doch sehr unterschiedlichen Messtechniken stimmen die Daten ausgezeichnet überein, was als Beweis für die Präzision des neuen HPLC-Verfahrens gewertet werden kann, das sich hinsichtlich Zeitaufwand und Informationsgehalt den bisherigen Methoden überlegen zeigt.

Das neue HPLC-Verfahren scheint auch für die Standardisierung von Herba Convallariae geeignet. Wegen der in Tabelle IV aufgezeigten Variabilität der Einzel-

TABELLE II
 QUANTITATIVE AUSWERTUNG VON PROBE 4
 Anteil am Gesamtglykosidgehalt in %. Mw = Mittelwert.

| Cardenolide | 1. Extraktion | | | 2. Extraktion | | | 3. Extraktion | | | Gesamt- mittelwert |
|-----------------------------|---------------|-------|-------|---------------|-------|-------|---------------|-------|-------|-----------------------|
| | I* | 2* | Mw | I* | 2* | Mw | I* | 2* | Mw | |
| Lokundjoid | 0.46 | 0.22 | 0.34 | 1.02 | 0.70 | 0.86 | 0.95 | 0.69 | 0.82 | 0.67 |
| Rhodexoid | 1.50 | 1.25 | 1.37 | 1.50 | 1.50 | 1.50 | 1.40 | 1.25 | 1.32 | 1.0 |
| Convallatoxoid | 0.31 | — | 0.31 | 0.31 | 0.26 | 0.28 | 0.58 | 0.50 | 0.54 | 0.38 |
| Convallolid | 22.80 | 23.31 | 23.05 | 20.98 | 22.09 | 21.53 | 26.47 | 25.67 | 26.07 | 23.55 |
| Convallatoxol | 14.68 | 14.28 | 14.48 | 15.25 | 15.02 | 15.13 | 16.69 | 15.91 | 16.30 | 15.30 |
| Glykosid ? | 3.33 | 4.0 | 3.66 | 3.34 | 2.38 | 2.86 | — | — | — | 3.26 |
| Desglucoheirotoxol | 5.40 | 3.85 | 4.62 | 4.24 | 3.28 | 3.76 | 3.24 | 3.31 | 3.27 | 3.88 |
| Convallatoxin | 31.38 | 31.73 | 31.55 | 32.46 | 33.14 | 32.80 | 31.60 | 33.60 | 32.60 | 32.32 |
| Glykosid F | 7.56 | 7.35 | 7.45 | 7.85 | 7.75 | 7.80 | 7.15 | 7.46 | 7.30 | 7.52 |
| Desglucoheirotoxin | 9.11 | 9.20 | 9.15 | 9.94 | 9.83 | 9.88 | 8.85 | 8.94 | 8.89 | 9.31 |
| Strophallosid | 1.25 | 1.13 | 1.19 | 1.06 | 1.59 | 1.32 | 1.27 | 1.15 | 1.21 | 1.30 |
| Periplorhamnosid | 0.70 | 0.62 | 0.66 | 0.48 | 0.97 | 0.72 | 0.59 | 0.51 | 0.55 | 0.64 |
| Perigulosid | 1.39 | 2.86 | 2.12 | 1.55 | 1.35 | 1.45 | 1.20 | 1.0 | 1.10 | 1.56 |
| Peripallosid | 0.12 | 0.18 | 0.15 | 0.02 | 0.12 | 0.07 | — | — | — | 0.11 |
| % Gesamt- glykosidgehalt | 0.269 | 0.265 | | 0.253 | 0.234 | | 0.226 | 0.239 | | 0.248 |

* Getrennte HPLC-Messung.

TABELLE III

ABSOLUTE STANDARDABWEICHUNGEN DER EINZELGLYKOSIDANTEILE DER PROBEN 2 UND 4, BERECHNET NACH LIT. 7

| | | | |
|-------------------------|--------|-----------------------|--------|
| Glykosid K | ± 0.29 | Convallatoxin | ± 0.77 |
| Lokundjosid | ± 0.72 | Glykosid F | ± 0.55 |
| Glykosid E ₁ | ± 0.07 | Desglucocheirototoxin | ± 0.37 |
| Rhodexin A | ± 0.48 | Strophallosid | ± 0.59 |
| Rhodexosid | ± 0.29 | Periplorhamnosid | ± 0.16 |
| Convallatoxolosid | ± 0.32 | Perigulosid | ± 0.53 |
| Convallatoxol | ± 1.08 | Peripallosid | ± 0.40 |
| Desglucocheirototoxol | ± 0.33 | | |

TABELLE IV

MITTELWERTE DER EINZEL- UND GESAMTCARDENOLIDGEHALTE DER UNTERSUCHTEN CONVALLARIA-PROBEN IM VERGLEICH ZUM PHOTOMETRISCH BESTIMMTEN GESAMTCARDENOLIDGEHALT

Anteil am Gesamtglykosidgehalt in %.

| Droge | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Glykosid K | 2.92 | 2.16 | 1.23 | — | 3.15 |
| Lokundjosid | 11.73 | 10.67 | 6.51 | 0.67 | 9.78 |
| Glykosid E ₁ | 2.08 | 1.19 | 1.26 | — | 1.36 |
| Rhodexosid | 1.70 | — | — | 1.0 | 3.09 |
| Rhodexin A | 1.80 | 2.12 | — | — | 3.23 |
| Convallatoxolosid | 1.53 | 1.51 | 0.93 | 0.38 | 2.19 |
| Convallallosid | 19.90 | 12.38 | 7.37 | 23.55 | 11.71 |
| Convallatoxol | 16.81 | 15.22 | 17.95 | 15.30 | 11.66 |
| Desglucocheirototoxol | 2.31 | 3.45 | 4.08 | 3.88 | — |
| Convallatoxin | 24.18 | 27.83 | 42.10 | 32.32 | 21.03 |
| Glykosid F | 1.95 | 5.49 | — | 7.52 | 6.45 |
| Desglucocheirototoxin | 7.56 | 14.43 | 15.81 | 9.31 | 15.13 |
| Strophallosid | 0.74 | 1.60 | 1.73 | 1.30 | 1.94 |
| Periplorhamnosid | 2.82 | 0.52 | 0.48 | 0.64 | 3.02 |
| Perigulosid | 0.74 | 0.58 | 0.29 | 1.56 | 3.72 |
| Peripallosid | 0.62 | 1.24 | 0.27 | 0.11 | 0.71 |
| % Gesamtglykosidgehalt (HPLC) | 0.215 | 0.282 | 0.407 | 0.248 | 0.191 |
| % Gesamtglykosidgehalt (photom. Lit. 1) | 0.244 | 0.324 | 0.461 | 0.235 | 0.216 |

glykosidanteile von Haupt- und Nebenkomponten müssten zu diesem Zweck die Wirkwerte aller erfassbaren Herzglykoside bekannt sein, weshalb es notwendig erscheint, die Ergebnisse der pharmakologischen Prüfung der in geringerer Menge vorkommenden Convallaria-Cardenolide abzuwarten.

LITERATUR

- 1 M. Wichtl, G. Peithner und L. Fuchs, *Planta Med.*, 10 (1962) 304.
- 2 W. Kubelka, B. Kopp und K. Jentzsch, *Pharm. Acta Helv.*, 50 (1975) 353.

- 3 B. Schenk, P. Junior und M. Wichtl, *Planta Med.*, 40 (1980) 1.
- 4 B. Kopp und W. Kubelka, *Planta Med.*, 1982, im Druck.
- 5 J. Jurenitsch, B. Kopp, E. Bamberg-Kubelka, R. Kern und W. Kubelka, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 125.
- 6 R. Kaiser, *Chromatographie in der Gasphase, Band IV*, Hochschul-Taschenbuch Nr. 472/472a, Bibliographisches Institut, Mannheim, Zürich, 2. Aufl., 1969.
- 7 K. Doerffel, *Beurteilung von Analyseverfahren und Ergebnissen*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1965.