

CHROM. 15,068

Note

Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographische Analyse von Digitalis-Blattextrakten

II. Quantitative Analyse

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

Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität, Deutschhausstrasse 17¹/₂, D-3550 Marburg/L. (B.R.D.)

(Eingegangen am 27. April 1982; geänderte Fassung eingegangen am 25. Mai 1982)

In einer ersten Mitteilung¹ haben wir über die qualitative Analyse von Digitalis-Blattextrakten mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) berichtet. Wie dort bereits angekündigt wollen wir nun die Bedingungen für die quantitative Analyse mitteilen.

Um Schwankungen in der Volumendosierung bei der Probeneingabe auszu-schalten haben wir für die quantitative Bestimmung einen internen Standard gewählt. Nach zahlreichen Vorversuchen haben wir bei isokratischem Betrieb mit Acetonitril-Wasser (30:70) Hexobarbital (1,5-Dimethyl-6-[1'-cyclohexenyl]-barbitursäure), sowie bei der Gradientenelution Diazepam (7-Chlor-1-methyl-2-oxo-3H-1,4-benzodiazepin) als besonders geeignet befunden. Beide Substanzen weisen in den verwendeten Fließmitteln ein Absorptionsmaximum von 225 nm auf und interferieren praktisch nicht mit einem der Digitalisglykoside. Während Diazepam universell anwendbar ist, kann bei der Benutzung von Hexobarbital unter bestimmten Bedingungen ein Überlappen des peaks von Glucoevatromonosid mit dem des Hexobarbitals beobachtet werden. Da die meisten Cardenolidglykoside in Acetonitril-Wasser (35:65) ein Absorptionsmaximum bei 222–226 nm aufweisen (in methanolischer Lösung liegt es bei 218–219 nm) haben wir als Messwellenlänge bei der quantitativen Bestimmung durchwegs 225 nm gewählt.

Zunächst haben wir mit 11 Digitalisglykosiden, die uns in ausreichender Menge als analysenreine Substanzen zur Verfügung standen eine Calibrierung vorgenommen und hierauf unter konstanten Bedingungen mit Glykosidgemischen, die mengenmäßig unterschiedlich zusammengesetzt waren, Calibrierungsläufe mehrfach wiederholt, wobei die Wiederfindungsraten zwischen 94.5 und 99.1 % lagen. Unter Zugrundelegung der bei Gradientenbetrieb ansteigenden Basislinie haben wir das Rechenprogramm des Gerätes so festgelegt, dass die einzelnen Zählwerte (counts) unter Berücksichtigung der Calibrierung und des inneren Standards direkt in mg/100 g Blattdroge umgerechnet werden. Da das Gerät auch die counts jedes einzelnen peaks ausdrückt, ist immer eine zusätzliche Kontrolle möglich.

EXPERIMENTELLES

Gerät und Analysendaten

Wir verwendeten einen 1084 B Hewlett-Packard Flüssigkeits-Chromatograph, und LiChrosorb RP-8 (10 μm) und RP-18 (10 μm) Säulen, Länge 20 cm \times 4.6 mm I.D.. Stahl. Mobile Phase: Wasser-Acetonitril, Gradientenelution von (73:27) nach (61:39) innerhalb 35 min, linearer Anstieg. Temperatur: 40°C. Durchfluss: 1.5 ml/min. Variabler Wellenlängendetektor: Hewlett-Packard 1030 B. Schreiber-Integrator: LC-Terminal 79850 B Hewlett-Packard. Injizierte Probenmenge: 10–30 μl , entsprechend ca. 2.7–8.1 mg Blattdroge.

Reagentien

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

Probenvorbereitung

Feingepulverte Digitalis-Blattdroge (1.500 g) werden in einem tarierten Rundkolben mit 15.0 g heissem Ethanol (70%) 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 \times 30 und 3 \times 20 ml Chloroform-Isopropanol (3:2) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen bringt man unter vermindertem Druck bei maximal 40° C zur Trockne (Rotationsverdampfer), löst den Rückstand in 3.00 ml Methanol p.a. und setzt 1.00 ml einer frisch bereiteten Lösung von 40.00 mg Diazepam/100 ml Methanol p.a. (entspr. 0.4 mg Diazepam) zu. Die Lösung wird über Millipore filtriert; je nach Digitalis-Art werden für die HPLC-Analyse 10, 20 oder 30 μl verwendet. Die Menge des internen Standards kann bei Bedarf auch reduziert werden.

Messung

Um sich über die Trennung der Glykoside und den Verlauf der Basislinie einen Überblick zu verschaffen wird zunächst ein Testchromatogramm angefertigt. Hierauf gibt man dem Rechner die aus dem Eichlauf (calibration run) errechneten Faktoren [Menge/Peakfläche; amount/area], die zu erwartenden Retentionszeiten sowie die sich aus dem Testlauf ergebende Integrationsart bei nicht vollständig getrennten peaks (Tangentenverfahren, bzw. Lot zur Basislinie) ein. Die peaks von nicht kalibrierten Substanzen wurden als Digitoxin berechnet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Quantitative HPLC-Analyse

In Fig. 1 wird das für die Calibrierung von 11 reinen Digitalisglykosiden ermittelte Chromatogramm dargestellt. Es belegt die gute Trennung der einzelnen Substanzen und die Eignung von Diazepam als innerem Standard. Die Fig. 2–4 zeigen die Trennungen der wichtigsten in *Digitalis purpurea*, *Digitalis heywoodii* und in einer Hybride *Digitalis heywoodii* × *Digitalis lanata* vorkommenden Glykoside.

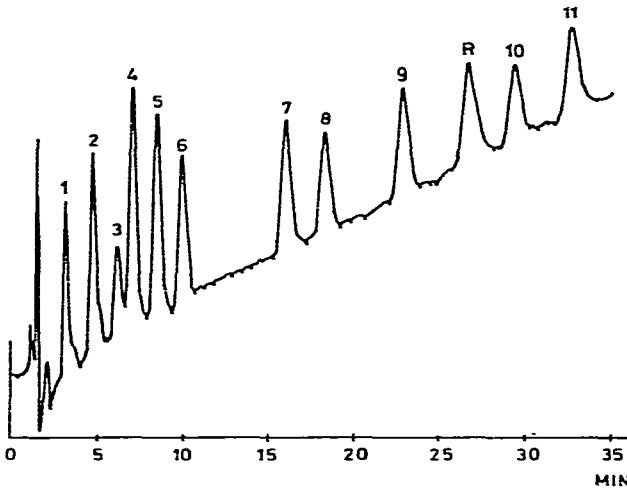


Fig. 1. Calibrierung von reinen Digitalisglykosiden bei der HPLC-Analyse. Bedingungen: RP-18-Säule (10 μm) LiChrosorb; Acetonitril-Wasser. Gradient (27:73) bis (39:61) innerhalb 35 min, linear; Fluss 1.5 ml/min, 40°C, Detektor 225 nm. Injizierte Probenmenge 20 μl . R = Diazepam (Innerer Standard, C = 0.1075 mg/ml); 1 = Digitalinum verum (C = 0.200 mg/ml); 2 = Glucoverodoxin (C = 0.425 mg/ml); 3 = Neo-Glucodigifucosid (C = 0.250 mg/ml); 4 = Neo-Odorobiosid G (C = 0.360 mg/ml); 5 = Lanatosid C (C = 0.650 mg/ml); 6 = Glucoevatromonosid (C = 0.280 mg/ml), 7 = Glucodigitoxigeninbisdigitoxosid (C = 0.375 mg/ml); 8 = Lanatosid B (C = 0.385 mg/ml); 9 = Purpureaglykosid A (C = 0.415 mg/ml); 10 = Lanatosid A (C = 0.385 mg/ml); 11 = Digitoxin (C = 0.325 mg/ml).

Um sich über die Reproduzierbarkeit der Methode ein Bild zu machen, haben wir aus sieben Analysen einer homogenen Probe von *Digitalis heywoodii*-Blättern, von den einzelnen Werten ausgehend die Standardabweichungen berechnet und in Tabelle I zusammengestellt. Wie man daraus ersieht, ist die Streuung der Werte relativ gering und eine Störung durch noch vorhandene Ballaststoffe kaum zu befürchten.

Vergleich mit der Methode von Kaiser²

Wir haben die von uns vorgeschlagene quantitative HPLC-Analyse mit der quantitativen Analyse von Digitalisblattextrakten nach Kaiser² (Kombination Säulen-Papierchromatographie, photometrische Bestimmung über die Farbreaktion nach Baljet^{3,4}) verglichen. Wie Tabelle II ausweist, sind die beobachteten Differenzen gering. Die HPLC-Analyse bietet gegenüber dem Verfahren von Kaiser zwei wesentliche Vorteile: der Bedarf an Probenmaterial kann von 50 g auf 1.5 g reduziert werden und die Analysendauer lässt sich sehr stark, von ca. 35 h auf ca. 2–3 h verkürzen.

TABELLE I

EINZELWERTE, MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG BEI DER QUANTITATIVEN HPLC-ANALYSE VON *DIGITALIS HEYWOODII*-BLÄTTERN.

Alle Angaben in mg/100 g trockener Blattdroge.

	Einzelwerte							Mittelwert	Standardabweichung ⁵
	1	2	3	4	5	6	7		
Digitalinum verum	42	39	41	38	42	37	36	39	± 2.44
Glucoverodoxin	41	42	46	44	44	46	45	44	± 1.91
Glucodigifucosid	22	21	22	23	22	21	23	22	± 0.81
Odorobiosid G	22	24	22	25	23	24	21	23	± 1.41
Glucoevatromonosid	194	198	204	205	200	196	196	199	± 4.20
Lanatosid B	138	139	140	136	135	136	135	137	± 2.00
Purpureaglykosid A	594	597	606	602	589	614	584	598	± 10.24
Lanatosid A	408	414	411	407	405	416	416	411	± 4.47
Digitoxin	67	69	69	72	70	65	71	69	± 2.38

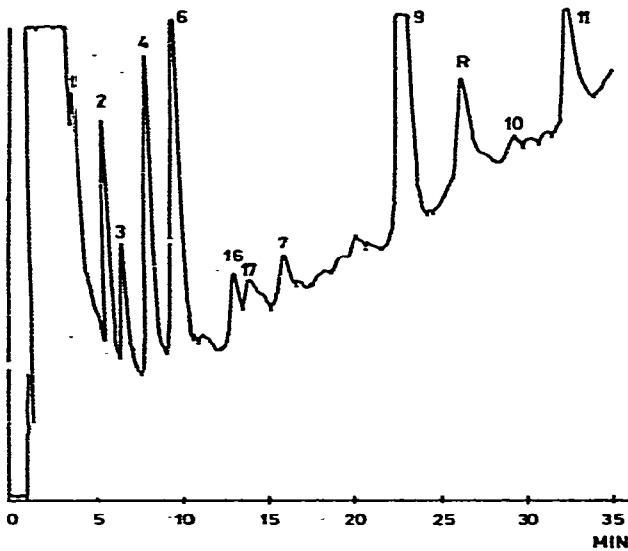


Fig. 2. HPLC-Trennung eines Blattextraktes aus *Digitalis purpurea* L. Bedingungen: s. Fig. 1. R = Innerer Standard Diazepam ($C = 0.027$ mg/ml); 1 = Digitalinum verum; 2 = Glucoverodoxin; 3 = Neo-Glucodigifucosid; 4 = Neo-Odorobiosid G; 6 = Glucoevatromonosid; 7 = Glucodigitoxigeninbisdigitoxosid; 9 = Purpureaglykosid A; 10 = Lanatosid A; 11 = Digitoxin; 16 = Purpureaglykosid B; 17 = nicht identifiziert.

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 Glucoeva-

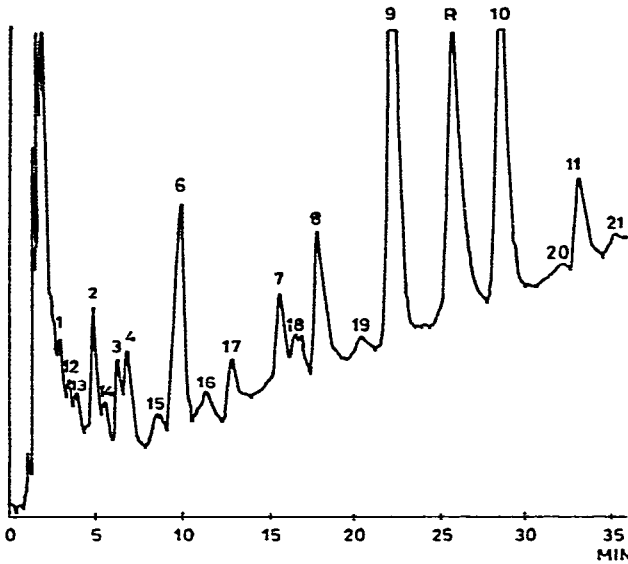


Fig. 3. HPLC-Trennung von *Digitalis heywoodii* P. et M. Silva. Bedingungen: s. Fig. 1. R = Innerer Standard Diazepam (C = 0.0625 mg/ml); 1 = Digitalinum verum; 2 = Glucoverodoxin; 3 = Neo-Glucodigifucosid; 4 = Neo-Odorobiosid G; 6 = Glucoevatromonosid; 7 = Glucodigitoxigeninbisdigitoxosid; 8 = Lanatosid B; 9 = Purpureaglykosid A; 10 = Lanatosid A; 11 = Digitoxin; 12, 13, 14 = nicht identifiziert; 15 = Digoxin; 16 = Desacetyllanatosid B; 17 = β -Acetyldigoxin; 18 = α -Acetyldigoxin; 19 = Acetylgitoxin; 20, 21 = nicht identifiziert.

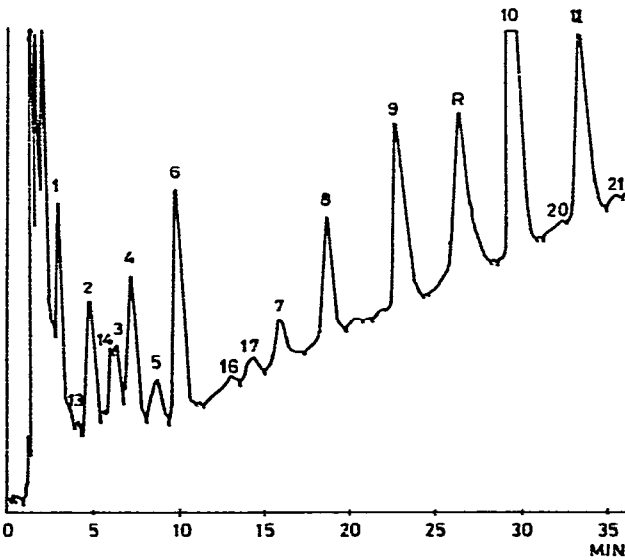


Fig. 4. HPLC-Trennung von *Digitalis heywoodii* P. et M. Silva \times *Digitalis lanata* EHRH. Bedingungen: s. Fig. 1. R = Innerer Standard Diazepam (C = 0.0535 mg/ml); 1 = Digitalinum verum; 2 = Glucoverodoxin; 3 = Neo-Glucodigifucosid; 4 = Neo-Odorobiosid G; 5 = Lanatosid C; 6 = Glucoevatromonosid; 7 = Glucodigitoxigeninbisdigitoxosid; 8 = Lanatosid B; 9 = Purpureaglykosid A; 10 = Lanatosid A; 11 = Digitoxin; 13, 14 = nicht identifiziert; 16 = Desacetyllanatosid B; 17 = Acetyldigoxin; 20, 21 = nicht identifiziert.

TABELLE II

VERGLEICH DER NACH KAISER² UND MITTELS QUANTITATIVER HPLC ERHALTENEN WERTE BEI DER GLYKOSIDBESTIMMUNG IN BLÄTTERN VERSCHIEDENER DIGITALIS-ARTEN UND HYBRIDE; ES SIND NUR MENGENMÄSSIG BEDEUTENDE GLYKOSIDE ANGE-
GEBEN.

Mittelwerte aus jeweils 4 bis 7 HPLC-Analysen. Alle Angaben in mg/100 g trockener Blattfröge.

	<i>D. purpurea</i>		<i>D. lutea</i>		<i>D. purpurea</i> × <i>D. lutea</i>		<i>D. lutea</i> × <i>D. purpurea</i>		<i>D. heywoodii</i> × <i>D. lanata</i>			
	Kaiser	HPLC	Kaiser	HPLC	Kaiser	HPLC	Kaiser	HPLC	Kaiser	HPLC		
Digitalinum verum	47	43	15	11	58	47	45	47	46	39	18	21
Glucoverodoxin	23	19	3	6	17	20	14	12	42	44	68	73
Glucodigitofucosid (einsch. Neo- Verbindung)	12	9	Spuren	--	Spuren	3	Spuren	Spuren	22	22	21	19
Odorobiosid G (einschl. Neo- Verbindung)	43	37	8	6	78	72	70	79	22	23	71	69
Lanatosid C	--	--	Spuren	3	Spuren	--	Spuren	--	--	--	10	11
Glucoveantromonosid	55	49	14	15	73	70	89	77	222	199	116	101
Lanatosid B	--	--	8	10	12	10	16	20	133	137	36	34
Purpurenglykosid A	75	79	--	--	11	9	67	60	680	598	98	89
Lanatosid A	--	2	22	24	38	43	33	35	426	411	240	256
Digitoxin	18	21	20	18	17	22	13	13	72	69	89	92

tromonosid, Glucogitorosid, Glucolanadoxin, Glucoverodoxin und Glucogitofucosid, Herrn Dr. A. Angliker, Sandoz AG, Basel, für die Lanatoside A, B, C und für Digitalinum verum.

NOTIZ

Nach Abschluss dieser Arbeit erhielten wir Kenntnis von der Publikation von Jurenitsch *et al.*⁶ über die HPLC-Analyse von Convallaria-Glykosiden. Die Autoren kommen methodisch (Probenvorbereitung, mobile Phase, Detektion) zu sehr ähnlichen Resultaten; ihre Ergebnisse bestätigen eindrucksvoll die Überlegenheit der HPLC in der Herzglykosidanalytik gegenüber den bisherigen Verfahren.

LITERATUR

- 1 M. Wichtl, M. Mangkudidjojo und W. Wichtl-Bleier, *J. Chromatogr.*, 234 (1982) 503.
- 2 F. Kaiser, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 299 (1966) 263.
- 3 H. Baljet, *Pharm. Weekbl.*, 55 (1918) 457.
- 4 L. Fuchs, M. Wichtl und H. Jachs, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 291 (1958) 193; 292 (1959) 15.
- 5 E. Kreyszig, *Statistische Methoden und ihre Anwendungen*, Verlag Vandenhoeck und Ruprecht, 3. Aufl. Göttingen 1968.
- 6 J. Jurenitsch, B. Kopp, E. Bamberg-Kubelka und W. Kubelka, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 235.