

CHROM. 15,495

## Note

---

### Verbesserte hochleistungsflüssigchromatographische Trennung der herzwirksamen Glykoside von *Urginea maritima* (L.) Baker durch Serienschaltung verschieden polarer "reversed-phase" Säulen\*

B. KOPP, J. JURENITSCH\*, B. CZERNIA und W. KUBELKA

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

(Eingegangen am 5. November 1982)

Im Rahmen von Untersuchungen über die Biosynthese der herzwirksamen Glykoside der Meerzwiebel<sup>1</sup> benötigten wir für die semipräparative Isolierung kleiner Mengen einzelner Bufadienolide ein hochleistungsflüssigchromatographisches Verfahren, das auch bei hoher Belastung der Säulen eine gute Trennung der Substanzen zulässt. Eine kürzlich von uns ausgearbeitete Methode<sup>2</sup> erlaubte zwar die Bestimmung der Bufadienolidglykoside im analytischen Massstab, wobei die Trennung an einer LiChrosorb RP-8 Säule mit Acetonitril-Wasser unter Anwendung der Gradiententechnik erfolgte; bei höherer Belastung der Säule mussten wir jedoch feststellen, dass die Auflösung zweier Substanzpaare im mittelpolaren Bereich des Chromatogramms für eine rationelle Isolierung der einzelnen Glykoside zu gering war. Wie aus Tabelle I ersichtlich, betraf dies in erster Linie Desacetylscillirosid-Scillirubrosid ( $R = 0.4$ ) und Scillirosid-Scillareninglucosid ( $R = 0.5$ ), aber auch für Scilliphäosid-inglucosid erschien ein höheres Kapazitätsverhältnis wünschenswert, um eine bessere Abtrennung von polaren Begleitstoffen zu erreichen.

#### EXPERIMENTELLES

##### Apparaturen

Flüssigkeits-Chromatograph Perkin-Elmer Serie 2 + Rheodyne Injektor (175- $\mu$ l Schleife); Detektor Perkin-Elmer LC 75, Wellenlänge 300 nm; Integrator Perkin-Elmer M 2; Schreiber Perkin-Elmer 023. Säulen: Vorsäule 40  $\times$  4.6 mm I.D. LiChrosorb RP-2 (5  $\mu$ m) und zwei analytische Säulen 250  $\times$  4.6 mm I.D. (alle Knauer, Oberursel, B.R.D.) LiChrosorb RP-2 (10  $\mu$ m) bzw. LiChrosorb RP-8 (7  $\mu$ m) in der angegebenen Reihenfolge unter Verwendung totvolumenfreier Zwischenstücke in Serie geschaltet. Mobile Phase: Acetonitril-Wasser (18:82). Gradient 0.3%/min, Fluss 1.5 ml/min. Empfindlichkeit: 16 (Detektorausgang)  $\times$  2 (Integratorausgang).

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Da die Bufadienolidglykoside von *Urginea maritima* ähnlich grosse Polaritäts-

\* Teil der Diplomarbeit B. Czernia, Universität Wien, in Vorbereitung.

TABELLE I

KAPAZITÄTSVERHÄLTNISSE ( $k'$ -WERTE) UND AUFLÖSUNG ( $R$ )\* DER BUFADIENOLID-BANDEN NACH HPLC-TRENNUNG AN DER LICHROSORB RP-2/RP-8 SÄULENKOMBINATION (VGL. FIG. 1) IM VERGLEICH ZUM VERFAHREN NACH KIRCHNER U. MITARB.<sup>2</sup>

Säule: LiChrosorb RP-8, 7  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.6 mm, I.D.; Mobile Phase: Acetonitril-Wasser (24:76). Gradient 0.3% Acetonitril/min, 2 ml/min; Temperatur 50°C (Lit. 2).

Glykosid**	System nach Kirchner u. Mitarb. <sup>2</sup>		Neues System (vgl. Fig. 1)	
	$k'$ -Werte	$R$	$k'$ -Werte	$R$
Scilliphäosidin- $\beta$ -D-glucosid	0.60	3.4	3.90	10.8
Scilliphäosid	1.80	1.3	7.45	1.2
Gammabufotalin- $\alpha$ -L-rhamnosid	2.20	1.6	7.86	3.8
12- <i>epi</i> -Scilliphäosid	2.73	2.6	9.24	4.6
Desacetylsцилліросид	3.73	0.4	10.83	0.7
Scillirubrosid	3.93	1.3	11.07	1.3
Scilliglaucosid	4.47	1.7	11.52	2.8
Scillirosid	5.20	0.5	12.48	1.8
Scillarenin- $\beta$ -D-glucosid	5.40	2.3	13.10	3.5
Scilliglaucosidin- $\alpha$ -L-rhamnosid	6.93	3.0	14.31	5.3
Scillaren A	9.07	1.5	16.24	2.5
Scillirubrosidin- $\alpha$ -L-rhamnosid	10.20	3.2	17.10	5.6
Proscillaridin A	13.07		19.14	

\* Zur Berechnung vgl. z.B. Lit. 5.

\*\* Struktur der Verbindungen vgl. Lit. 2.

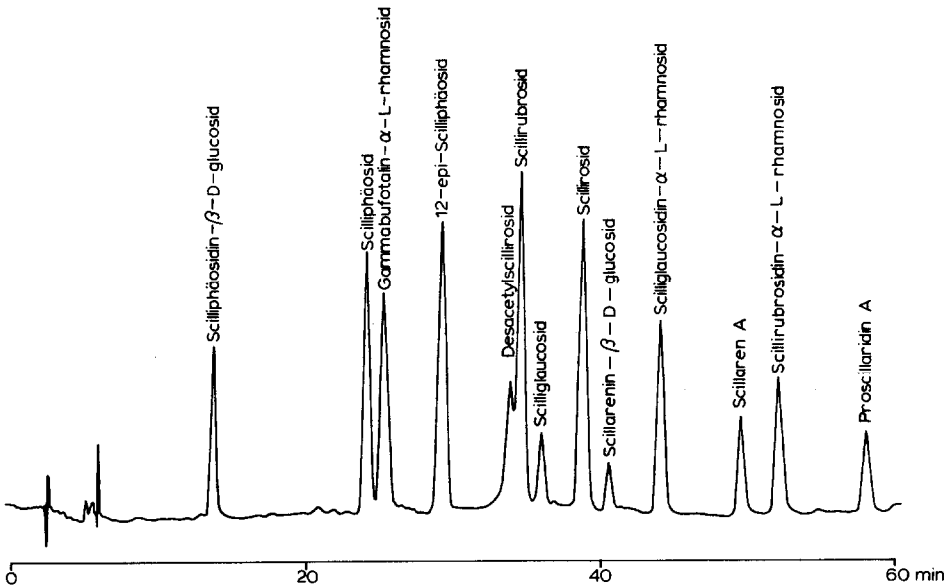


Fig. 1. HPLC-Trennung von 13 Reinglykosiden aus *Urginea maritima* unter Verwendung einer RP-2/RP-8 Säulenkombination. Säulen: LiChrosorb RP-2 (5  $\mu\text{m}$ ), 40  $\times$  4.6 mm I.D. (Vorsäule), LiChrosorb RP-2 (10  $\mu\text{m}$ ), 250  $\times$  4.6 mm I.D. und LiChrosorb RP-8 (7  $\mu\text{m}$ ), 250  $\times$  4.6 mm I.D. in Serie geschaltet. Mobile Phase: Acetonitril-Wasser (18:82), Gradient 0.3%/min, 1.5 ml/min, 25°C. Dosierte wurden je 2–7  $\mu\text{g}$  Einzelglykosid/30  $\mu\text{l}$ . Detektion, UV 300 nm.

differenzen wie die Cardenolidglykoside von *Convallaria majalis* L. aufwiesen, war es naheliegend, auf die zu deren Trennung bewährte Serienschaltung verschieden polarer "reversed-phase" Säulen zurückzugreifen<sup>3,4</sup>. Die Kombination einer Vorsäule LiChrosorb RP-2 und zweier analytischer Trennsäulen LiChrosorb RP-2 und RP-8 führte auch bei den Bufadienolidglykosiden nach entsprechender Optimierung der Durchflussrate und Gradientensteilheit zu einer stark verbesserten Trennung (Tabelle I, Fig. 1). Dies kann einerseits auf die verlängerte Trennstrecke und andererseits auf die verbesserte Anpassung der Polarität der stationären Phase zurückgeführt werden. Im semipräparativen Massstab liess sich mit der gleichen Säulenordnung die dosierte Glykosidmenge bei nahezu gleicher Trennleistung bis auf das 30-fache ( $R \geq 0.7$ ) bis 200-fache ( $R \geq 1.5$ ) der im analytischen Massstab applizierten Mengen (2–7  $\mu\text{g}$  Einzelglykosid/30  $\mu\text{l}$ ) steigern, sodass die verlängerte Analysenzeit bei weitem wettgemacht wurde.

#### LITERATUR

- 1 B. Kopp und B. Czernia, in Vorbereitung.
- 2 H. Kirchner, J. Jurenitsch und W. Kubelka, *Sci. Pharm.*, 49 (1981) 281.
- 3 J. Jurenitsch, B. Kopp, E. Bamberg-Kubelka, R. Kern und W. Kubelka, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 125.
- 4 J. Jurenitsch, B. Kopp, E. Bamberg-Kubelka und W. Kubelka, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 235.
- 5 H. Engelhardt, *Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Auflage, 1977, S. 15.