

CHROM. 16,703

Note

Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographische Trennverfahren für Dihydroergotoxin und Abbauprodukte

P. SPIEGL* und H. VIERNSTEIN

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

(Eingegangen am 27. Januar 1984; geänderte Fassung eingegangen am 5. März 1984)

Flüssige Dihydroergotoxin (DHE)-Zubereitungen können einer Vielzahl von Isomerisierungs- und Abbaureaktionen unterliegen, wodurch eine nicht unwesentliche Verminderung der pharmakologischen Wirkung eintreten kann¹.

Bei hydrierten Ergotalkaloiden treten relativ leicht hydrolytische Spaltungen zu Dihydrolysergsäure und Dihydrolysergsäureamid auf, bei der sog. 'Aci-Umlagerung' erfolgt eine am C-2 des Peptidteils ablaufende Epimerisierung zu den jeweiligen Aci-Komponenten von DHE²⁻⁴.

Bei Qualitätsuntersuchungen war es bisher nicht möglich mit ausreichender analytischer Genauigkeit eine quantitative Bestimmung der Epimerisierungs- und Hydrolyseprodukte von DHE (Co-Dergocrin) vorzunehmen, weil lediglich spektral-photometrische Analysenmethoden oder die kolorimetrischen Bestimmungen auf Kieselgel-Dünnschichtplatten nach van Urk-Reaktion für die Analytik verfügbar waren⁵.

Es war daher beabsichtigt eine Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographische (HPLC)-Methode auszuarbeiten, die es erlaubt, gleichzeitig sowohl den Gehalt an chemischen Umsetzungsprodukten zu erfassen, als auch Aussagen über die unverändert gebliebenen Wirkstoffkomponenten und deren Mengenverhältnisse zueinander zu treffen.

EXPERIMENTELLES

Die Untersuchungen wurden unter folgenden chromatographischen Bedingungen durchgeführt: Gerät, Perkin-Elmer Serie 3B; Detektor, Perkin-Elmer LC 85; Integrator, Perkin-Elmer Sigma 15 + Bantam 550; Schreiber, Perkin-Elmer 561; Stationäre Phase, LiChrosorb RP-18, 7 μm (Merck), 250 \times 4.6 mm I.D.; Fluss, 2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$; Detektion, UV 281 nm; Dosierung, 2-6 μg Substanz bzw. Substanzgemisch in 20 μl Acetonitril-Wasser (1:1).

System A: Mobile Phase, wässrige, 0.01 M Ammoniumcarbonat-Lösung-Acetonitril (57:43), 6 min; anschliessend Gradient: Endpunkt (48:52), 6 min, Kurve 0.5. System B: Gemisch I, Wasser-Acetonitril-Triäthylamin (220:50:0.2); Gemisch II, Wasser-Acetonitril-Triäthylamin (290:120:12). Mobile Phase: Gemisch I-II (97:3), 1.5 min; anschliessend Gradient: Endpunkt, Gemisch I-II (1:99), 4 min, Kurve 3; 11 min Gemisch I-II (1:99).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden zwei HPLC-Verfahren (System A und B) entwickelt, die eine Trennung der Komponenten des intakten Wirkstoffgemisches neben den Abbauprodukten (Epimerisierungs- und Hydrolyseprodukte)

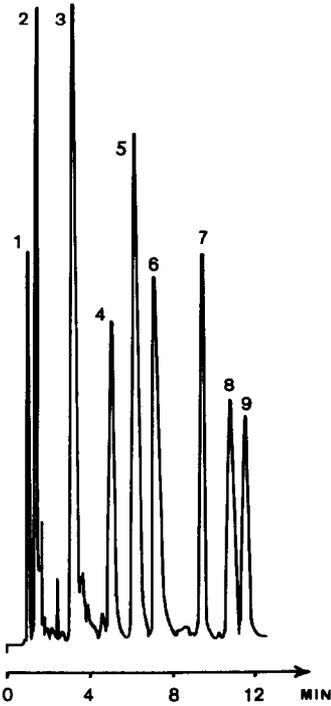


Fig. 1. HPLC-Trennung von drei DHE-Komponenten und fünf Abbauprodukten (System A); interner Standard, *m*-OH-Benzoesäure (Chromatographische Bedingungen siehe unter Experimentelles).

Komponente	Retentionszeit (min)	Auflösung 'R'
1 <i>m</i> -OH-Benzoesäure	1.18	1.80
2 Dihydrolysergsäure	1.43	6.70
3 Dihydrolysergsäureamid	3.24	3.13
4 Aci-Dihydroergocornin	5.18	3.33
5 Aci-Dihydro- α -ergokryptin	6.38	2.00
6 Aci-Dihydroergocristin	7.38	4.72
7 Dihydroergocornin	9.74	3.48
8 Dihydro-($\alpha + \beta$)-ergokryptin	11.13	1.90
9 Dihydroergocristin	11.89	

ermöglichen und auf diese Weise eine Differenzierung der Inhaltsstoffe in wirksame und unwirksame Bestandteile gestatten.

Wie aus dem in Fig. 1 wiedergegebenen Chromatogramm (System A) ersichtlich ist, gelang die Trennung von Dihydroergocornin, Dihydroergocristin, Dihydro-($\alpha + \beta$)-ergokryptin und fünf Abbauprodukten. Im System B (Fig. 2) wird

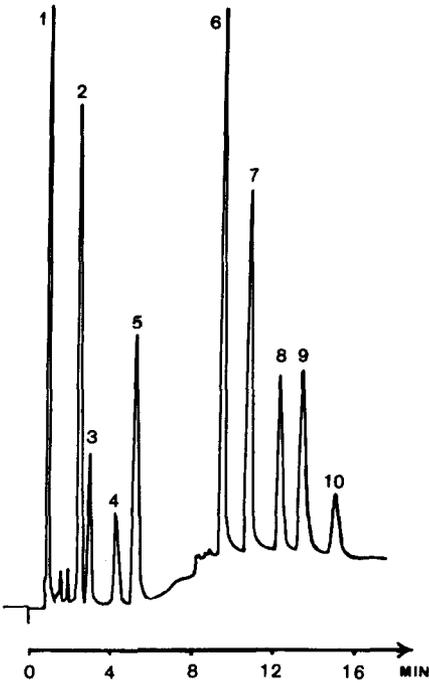


Fig. 2. HPLC-Trennung von vier DHE-Komponenten und fünf Abbauprodukten (System B); interner Standard, Papaverin HCl (Chromatographische Bedingungen siehe unter Experimentelles).

Komponente	Retentionszeit (min)	Auflösung 'R'
1 Dihydrolysergsäure	1.00	8.64
2 Aci-Dihydro- α -ergokryptin	2.60	2.80
3 Aci-Dihydroergocornin	3.10	4.00
4 Aci-Dihydroergocristin	4.50	2.40
5 Dihydrolysergsäureamid	5.40	9.56
6 Papaverin HCl	9.70	3.30
7 Dihydroergocornin	11.10	3.80
8 Dihydro- α -ergokryptin	12.70	2.90
9 Dihydroergocristin	13.60	3.60
10 Dihydro- β -ergokryptin	15.40	

eine zusätzliche Trennung von α - und β -Dihydroergokryptin erzielt, wodurch die beiden isomeren Formen, die sich in ihrem pharmakodynamischen Verhalten voneinander unterscheiden, getrennt erfasst werden.

Zur Charakterisierung der Trennqualität wurden für alle Banden die Auflösung R berechnet⁶. In beiden Systemen sind die Werte für R grösser als 1.5, als Ausdruck dafür, dass die Peaks jeweils bis zur Basislinie voneinander getrennt sind (6σ -Trennung).

Um die Wiederfindungsraten und damit die Genauigkeit der Methoden zur Quantifizierung der angegebenen Ergotalkaloide zu bestimmen, wurde flüssigen, DHE-hältigen Pharmazeutika ein bestimmter Anteil der in den Fig. 1 und 2 genannten Einzelkomponenten z.T. in Form der Mesilate zugesetzt, sodass sich eine annähernde Verdoppelung des jeweiligen Gehaltes ergab. In den beiden Systemen A und B ergaben je sechs Analysen folgende Ergebnisse: die Wiederfindungsraten lagen im Bereich von 96.3 bis 101.1% (System A) bzw. 98,2 bis 101.3% (System B) bezogen auf die jeweiligen Einwaagen und wiesen im Mittel eine relative Standardabweichung von 4,0 bzw. 3,2% auf.

Weiters wurden im selektiveren System B die im linearen Kalibrierbereich (170 ng bis $> 30 \mu\text{g}$) liegenden Erfassungsgrenzen für quantitative Bestimmungen ermittelt. Sie lagen sowohl für die Wirkstoffkomponenten, als auch für die chemischen Umsetzungsprodukte bei 170 ng pro Einspritzung.

Es ist daher möglich, einerseits die wirksamen Komponenten in flüssigen DHE-Zubereitungen direkt zu quantifizieren und andererseits auch die in geringen Mengen auftretenden Hydrolyse- und Umlagerungsprodukte von DHE in einem chromatographischen Lauf zu erfassen, wobei die Analysenmethode B aufgrund höherer Trennleistung für Qualitätskontrollen oder Stabilitätstests besser geeignet erscheint als das System A.

LITERATUR

- 1 B. Berde und H. O. Schild, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, s. 29ff.
- 2 V. Hartmann, G. Schnabel und H. J. Ohlrich, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 2276.
- 3 E. Ermer, *Pharm. Ztg.*, 126 (1981) 1269.
- 4 H. Ott, A. Hofmann und A. J. Frey, *J. Amer. Chem. Soc.*, 88 (1966) 1251.
- 5 W. Döbbelin und V. Hartmann, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 120 (1980) 1821.
- 6 H. Engelhardt, *Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, zweite überarbeitete Auflage, 1977, s. 15.