

Note

Verteilungschromatographie von Mutterkornalkaloiden auf Formamid-gesättigten Kieselgel-Säulen

H. PÖTTER*, M. HÜLM und S. SCHUMANN

Hauptabteilung Naturstoffforschung des Direktionsbereiches Forschung und Entwicklung des VEB Pharmazeutisches Kombinat GERMED Dresden, Stammbetrieb VEB Arzneimittelwerk Dresden, Wilhelm-Pieck-Str. 35, 8122 Radebeul (D.D.R.)

(Eingegangen am 17. Oktober 1984)

Um optimale Trennergebnisse bei der Reinheits- und Gehaltsbestimmung im Rahmen der Qualitätskontrolle von wasserlöslichen Mutterkornalkaloiden (Ergometrin), Lysergsäurederivate vom Peptidtyp, hydrierte Lysergsäurederivate vom Peptidtyp und 2-Brom-Lysergsäurederivate vom Peptidtyp sowie Nebenprodukten zu erreichen, wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Macek *et al.*^{1,2} und Macek und Vaneček³ die Mutterkornalkaloide mit sehr guten Ergebnissen durch Verteilungschromatographie an Papier mit Formamid als stationärer Phase trennten, versucht, dieses System auf die Hochdruck Flüssigkeitschromatographie (HPLC) zu übertragen. Die Methode wird mit Erfolg bei der Qualitätskontrolle von Mutterkornalkaloidsubstanzen eingesetzt. Bei den bisher zur Trennung der Mutterkornalkaloide durch HPLC angewandten Verfahren gelang es nicht, wasserlösliche Mutterkornalkaloide (Ergometrin), Lysergsäurederivate vom Peptidtyp, hydrierte Lysergsäurederivate vom Peptidtyp und 2-Brom-Lysergsäurederivate vom Peptidtyp an einer Säule zufriedenstellend zu trennen. Es wurde allgemein mit Kieselgel-Säulen^{4–9} und Reversed-Phase-Säulen^{8–17} gearbeitet. Bei der Trennung von Strukturisomeren lag der pH-Wert der mobilen Phase zwischen pH 10 und 12, wodurch die Lebensdauer der Säulen stark negativ beeinflusst wurde. Versuche mit chemisch gebundenen Alkylamin-Phasen^{18–21} führten besonders bei der Trennung von 2-Brom-Lysergsäurederivaten vom Peptidtyp zu keinem befriedigenden Ergebnis.

EXPERIMENTELLER TEIL

Apparatur

Die Versuche wurden mit einer Altex Pump (LC-X PD), einem Pye Unicam AR 55 Linear Recorder, einem Pye Unicam DP 88 Computing Integrator, einem Rheodyne Syringe Loading Sample Injektor Model 7120 (20 μ l Dosierschleife) sowie einem Pye Unicam PU 4020 UV-Detektor durchgeführt. Die Detektion wurde bei 312 nm für wasserlösliche Mutterkornalkaloide und Lysergsäurederivate vom Peptidtyp, 280 nm für hydrierte Lysergsäurederivate vom Peptidtyp und 305 nm für 2-Brom-Lysergsäurederivate vom Peptidtyp vorgenommen. Die Trennung erfolgte an Li-Chrosorb Si 60-Säulen (250 mm \times 4,6 mm I.D.) Merck, Partikelgröße 5 μ m. Als inneren Standard verwendeten wir Chlorcarbonyliminostilben.

Die UV-Absorption des Eluates erfolgte mit dem UV-Spektrophotometer VSU₂ (Carl Zeiss, Jena).

Chemikalien und Reagentien

Das für die Versuche eingesetzte Ergometrinbimaleinat, Ergotamintartrat, Ergocristinmethansulfonat, Ergocorninmethansulfonat, α -Ergokryptinmethansulfonat, β -Ergokryptinmethansulfonat, Ergocorninin, Ergokryptinin, Dihydroergotaminmethansulfonat, Dihydroergocristinmethansulfonat, Dihydroergocorninmethansulfonat, α -Dihydroergokryptinmethansulfonat und Chlorcarbonyliminostilben wurden im VEB Pharmazeutisches Kombinat GERMED Dresden hergestellt.

Mobile Phase

Für die mobile Phase wurden eingesetzt: *n*-Hexan spektroskopisch rein für UV vom VEB Petrolchemisches Kombinat Schwedt; Ethylacetat zur Analyse der Firma Lachema n.p. Brno; Formamid zur Analyse der Firma Merck; Triethylamin rein VEB Laborchemie Apolda (nach Destillation). Zur Herstellung der Eichlösungen wurden jeweils Ergotamintartrat, Dihydroergotaminmesylat und 2-Brom- α -ergokryptinmesylat unter Zusatz von Chlorcarbonyliminostilben in der mobilen Phase gelöst und verdünnt, so dass Konzentrationsreihen von 1 μ g Alkaloid und 0,8 μ g Chlorcarbonyliminostilben/20 μ l; 3 μ g Alkaloid und 0,8 μ g Chlorcarbonyliminostilben/20 μ l; 7 μ g Alkaloid und 0,8 μ g Chlorcarbonyliminostilben/20 μ l; 11 μ g Alkaloid und 0,8 μ g Chlorcarbonyliminostilben/20 μ l; und 15 μ g Alkaloid und 0,8 μ g Chlorcarbonyliminostilben/20 μ l entstanden.

Für die Gehaltsbestimmung von Reinsubstanzen werden von Lysergsäurederivaten vom Peptidtyp (z.B. Ergotamin) 20 mg und 5 mg Chlorcarbonyliminostilben genau eingewogen und zu 100 ml in mobiler Phase gelöst. Von hydrierten Lysergsäurederivaten vom Peptidtyp (z.B. Dihydroergotamin) sowie 2-Brom-Lysergsäurederivaten vom Peptidtyp (z.B. 2-Brom- α -ergokryptin) werden 40 mg und 5 mg Chlorcarbonyliminostilben zu 100 ml in mobiler Phase gelöst.

TABELLE I

MOBILE PHASEN ZUR TRENNUNG DER MUTTERKORNALKALOIDE

No.	Alkaloidgruppen	<i>n</i> -Hex- an (V)		Ethyl- acetat (V)		Triethyl- amin (V)		Formamid (V)
I	Wasserlösliche Alkaloide	50	+	48	+	1	+	1
II	Lysergsäurederivate vom Peptidtyp	50	+	48	+	1	+	1
	<i>Hydrierte Lysergsäurederivate vom Peptidtyp</i>							
III	Dihydroergotoxingruppe	40	+	58	+	1	+	1
IV	Dihydroergotamin	30	+	70	+	1	+	1
V	2-Brom-Lysergsäurederivate vom Peptidtyp	60	+	38	+	1	+	1

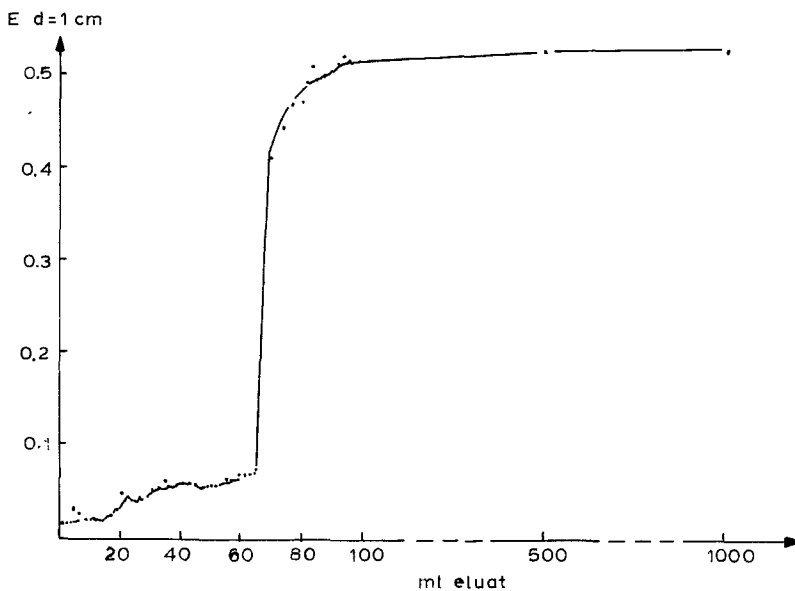


Fig. 1. Sättigung einer Li-Chrosorb-Si 60-Säule (250 mm \times 4,6 mm I.D.) Merck, Partikelgröße 5 μ m mit Formamid. Fließgeschwindigkeit 2 ml/min, Mobile Phase: *n*-Hexan-Ethylacetat-Triethylamin-Formamid (60:38:1:1). Die Formamidkonzentration der Eluatfraktionen (jeweils 2 ml) wurden am UV-Spektrophotometer bei 250 nm bestimmt.

TABELLE II

REPRODUZIERBARKEIT DER TRENNERGEBNISSE VON MUTTERKORNALKALOIDEN AN EINER FORMAMIDIMPRÄGNIERTEN LICHROSORB SI 60-SÄULE, MERCK

Alkaloid	Mob. Phase No.	Retentionszeit (min)						
		1. Tag	5. Tag	10. Tag	15. Tag	20. Tag	25. Tag	30. Tag
Chlorcarbonyl- iminostilben	II	1,8	1,7	1,8	1,7	1,8	1,9	1,8
Ergokryptinin		2,8	2,7	2,8	2,6	2,9	2,8	2,7
Ergocorninin		3,6	3,5	3,6	3,6	3,7	3,7	3,6
β -Ergokryptin		4,1	4,0	4,0	4,1	4,1	4,0	4,0
α -Ergokryptin		4,6	4,7	4,6	4,7	4,7	4,5	4,6
Ergocornin		5,5	5,4	5,6	5,7	5,4	5,6	5,5
Ergocristin		7,2	7,3	7,3	7,1	7,3	7,4	7,4
Ergotamin		8,4	8,4	8,5	8,5	8,6	8,7	8,5
Ergometrin		24,8	24,5	24,3	24,7	24,9	24,8	24,3
Chlorcarbonyliminostilben	III	2,8	2,6	2,7	2,8	2,8	2,6	2,7
DH-Ergokryptin		5,2	5,1	5,1	5,3	5,2	5,2	5,1
DH-Ergocornin		6,8	6,7	6,8	6,8	6,7	6,6	6,7
DH-Ergocristin		8,5	8,3	8,3	8,4	8,5	8,5	8,3
Chlorcarbonyliminostilben		1,3	1,4	1,2	1,3	1,3	1,2	1,4
Ergokryptinin	V	5,2	5,2	5,0	5,2	5,3	5,2	5,4
2-Bromergokryptinin		6,1	6,2	6,0	6,0	6,2	6,1	6,3
2-Brom- β -ergokryptin		7,6	7,7	7,5	7,7	7,6	7,7	7,8
2-Brom- α -ergokryptin		9,0	9,1	9,0	9,1	9,3	9,1	9,3
2-Bromergocornin		10	10,2	9,8	9,9	10,0	10,1	10,3

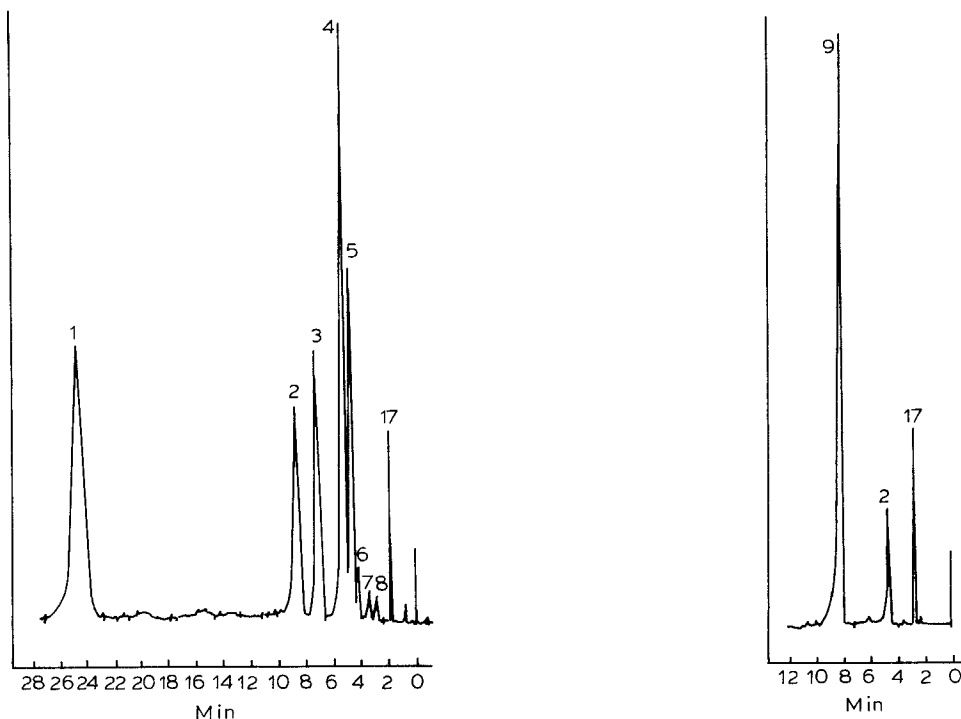


Fig. 2. Chromatogramm von Lysergsäurederivaten. 1 = Ergometrin ($4 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 2 = Ergotamin ($1,4 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 3 = Ergocristin ($1,8 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 4 = Ergocornin ($4 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 5 = α -Ergokryptin ($2,4 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 6 = β -Ergokryptin ($0,3 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 7 = Ergocorninin ($0,2 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 8 = Ergokryptinin ($0,2 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 17 = Chlorcarbonyliminostilben ($1 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$). Mobile Phase: *n*-Hexan–Ethylacetat–Triethylamin–Formamid (50:48:1:1). Detektion: UV 312 nm.

Fig. 3. Chromatogramm von Dihydrolysergsäurederivaten vom Peptidtyp. 9 = Dihydroergotamin ($8 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 2 = Ergotamin ($0,7 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 17 = Chlorcarbonyliminostilben ($1 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$). Mobile Phase: *n*-Hexan–Ethylacetat–Triethylamin–Formamid (30:70:1:1). Detektion: UV 280 nm.

Die mobile Phase wird entsprechend der zu trennenden Alkaloidgruppe (Tabelle I) gemischt und in einem Schütteltrichter kräftig geschüttelt. Scheidet sich danach etwas Formamid ab, so wird dieses abgetrennt.

Imprägnierung der Säule

Die Kieselgel-Säule wird mit Formamid imprägniert, indem mit Formamid gesättigte mobile Phase mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min während 45 min über die Säule gepumpt wird. Der Zeitpunkt der Sättigung wird durch Messen der Formamid-konzentration im Eluat, mit einem UV-Spektrophotometer bestimmt.

Es wird bei relativ konstanter Raumtemperatur, $20 \pm 2^\circ\text{C}$, gearbeitet.

ERGEBNISSE

Zu Beginn der Imprägnierung wird fast alles Formamid von der Kieselgelsäule adsorbiert, nach 45 min ist die Säule mit Formamid gesättigt und es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase ein, vorausgesetzt, dass mit einer Formamid-gesättigten mobilen Phasen gearbeitet wird (Fig. 1). Während einer Versuchsdauer von 30 Tagen waren die Trennergebnisse reproduzierbar (Tabelle II).

TABELLE III

STANDARDABWEICHUNG BEI DER GEHALTSBESTIMMUNG VON MUTTERKORNKALKALOID-REINSUBSTANZEN

Mutterkornalkaloid-Reinsubstanzen	Gehalt (%)		n	s (%)
Ergotamintartrat	98,4	Ergotamintartrat	10	± 1,1
Dihydroergotamin-methansulfonat	99,7	Dihydroergotaminmethansulfonat	10	± 1,2
Dihydroergotoxin-methansulfonat:	32,8	DH-Ergokryptin-methansulfonat	10	± 1,8
	32,3	DH-Ergocornin-methansulfonat	10	± 1,5
	32,0	DH-Ergocristin-methansulfonat	10	± 1,7
2-Brom- α -ergokryptin-methansulfonat	99,5	2-Brom- α -ergokryptinmethansulfonat	10	± 1,1

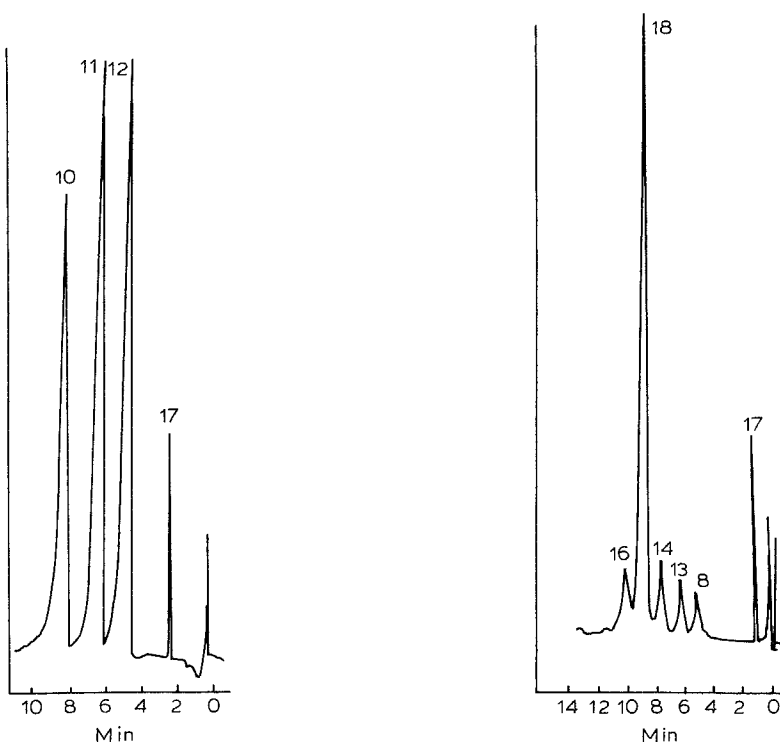


Fig. 4. Chromatogramm von Dihydrolysergsäurederivaten vom Peptidtyp. 10 = Dihydroergocristin ($7 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 11 = Dihydroergocornin ($8 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 12 = α -Dihydroergokryptin ($8 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 17 = Chlorcarbonyliminostilben ($1 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$). Mobile Phase: *n*Hexan-Ethylacetat-Triethylamin-Formamid (40:58:1:1). Detektion: UV 280 nm.

Fig. 5. Chromatogramm von 2-Brom-Lysergsäurederivaten vom Peptidtyp. 8 = Ergokryptinin ($0,5 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 13 = 2-Brom-Ergokryptin ($0,7 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 14 = 2-Brom- β -Ergokryptin ($0,9 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 15 = 2-Brom- α -Ergokryptin ($8 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 16 = 2-Brom-Ergocornin ($0,9 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), 17 = Chlorcarbonyliminostilben ($1 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$). Mobile Phase: *n*-Hexan-Ethylacetat-Triethylamin-Formamid (60:38:1:1). Detektion: UV 305 nm.

Die beschriebenen Mutterkornalkaloide lassen sich an einer formamid-gesättigten LiChrosorb Si 60-Säule mit den in Tabelle I beschriebenen mobilen Phasen trennen (Tabelle I und Fig. 2-5). Es ist in jeder Gruppe möglich, die aktiven Verbindungen von Verunreinigungen zu trennen. Die Eichkurven für Ergotamin (Lysergsäurederivat vom Peptidtyp), Dihydroergotamin (hydriertes Lysergsäurederivat vom Peptidtyp) und 2-Brom- α -ergocryptin (2-Brom-Lysergsäurederivat vom Peptidtyp) sind im Bereich von 1-15 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ linear. Die Nachweisgrenze liegt bei Ergotamin bei 0,1 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$, bei Dihydroergotamin bei 0,5 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ und bei 2-Brom- α -ergocryptin bei 0,25 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$.

Zur Überprüfung der Methode wurde der Gehalt der Reinsubstanzen von Ergotamin tartrat, Dihydroergotaminmethansulfonat, Dihydroergotoxinmethansulfonat und 2-Brom- α -ergocryptinmethansulfonat bestimmt. Auf Grund der niedrigen Standardabweichung, S (Tabelle III) eignet sich die Methode sehr gut zur Gehaltsbestimmung von Reinsubstanzen. Mit Hilfe der beschriebenen Methode ist es möglich an einem Säulentyp alle aktiven Mutterkornalkaloide sowie ihre Stereo- und Strukturisomeren zu trennen.

LITERATUR

- 1 K. Macek, A. Cerný und M. Semonský, *Pharmazie*, 9 (1954) 388.
- 2 K. Macek, M. Semonský, S. Vaneček, V. Zirkán und A. Cerný, *Pharmazie*, 9 (1954) 752.
- 3 K. Macek, S. Vaneček, *Pharmazie*, 10 (1955) 422.
- 4 R. A. Heacock, K. R. Langille, J. P. MacNeil und R. W. Frei *J. Chromatogr.*, 77 (1973) 425.
- 5 J. D. Wittwer, Jr. und J. H. Kluckholm, *J. Chromatogr. Sci.*, 11 (1973) 1.
- 6 A. Yoshida, S. Yamazaki und T. Sakai, *J. Chromatogr.*, 170 (1979) 399.
- 7 R. V. Vivilecchia, R. L. Cotter, R. J. Limpert, N. Z. Thimot und J. N. Little, *J. Chromatogr.*, 99 (1974) 407.
- 8 J. Dolinar, *Chromatographia*, 10 (1977) 364.
- 9 L. Szepesy, I. Fehér, G. Szepesi und M. Gazdag, *J. Chromatogr.*, 149 (1978) 271.
- 10 I. Jane und B. B. Wheals, *J. Chromatogr.*, 84 (1973) 181.
- 11 J. Christie, M. W. White und J. M. Wiles, *J. Chromatogr.*, 120 (1976) 496.
- 12 H. Bethke, B. Delz und K. Stich, *J. Chromatogr.*, 123 (1976) 193.
- 13 V. Hartmann, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1978) 1.
- 14 N.-E. Larsen, R. Öhmen, M. Larsson und E. F. Hvidberg, *J. Chromatogr.*, 174 (1979) 341.
- 15 D. A. Giron-Forest und W. D. Schönleber, *Anal. Profiles Drug Subst.*, 8 (1979) 47.
- 16 B. Herényi und S. Görög, *J. Chromatogr.*, 238 (1982) 250.
- 17 L. Zecca, L. Bonini und S. R. Bareggi, *J. Chromatogr.*, 272 (1983) 401.
- 18 M. Wurst, M. Flieger und Z. Řeháček, *J. Chromatogr.*, 150 (1978) 477.
- 19 M. Wurst, M. Flieger und Z. Řeháček, *J. Chromatogr.*, 174 (1979) 401.
- 20 M. Flieger, M. Wurst, J. Stuchlík und Z. Řeháček, *J. Chromatogr.*, 207 (1981) 139.
- 21 M. Flieger, P. Sedmera, J. Vokoun, A. Řičicová und Z. Řeháček, *J. Chromatogr.*, 236 (1982) 453.