

# CAMAG

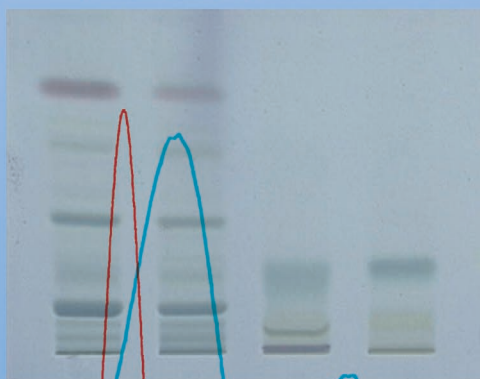
CAMAG LITERATURDIENST  
PLANAR-CHROMATOGRAPHIE

# CBS

CAMAG BIBLIOGRAPHY SERVICE



**Planar-Chromatographie  
im Jahr der Chemie 2003**  
begeistert und  
macht Chromatographie  
begreiflich –



am Beispiel der  
Unterscheidung zwischen  
echtem und  
verfälschtem Safran

Wichtiger Termin:

International Symposium for High Performance  
Thin-Layer Chromatography,  
Lyon, 15.-18. Oktober 2003

<http://www.camag.com>

September  
2003

# 91

CBS91 September 2003

## IN DIESER AUSGABE

### Verfahren, Anwendungen

Schnelle Analytik von Vinca Alkaloiden.....	2-4
Verbesserte Trennung von Benzodiazepinen mittels AMD.....	5-7
Identifizierung von echtem Safran .....	9-11
Stabilitätsprüfung von Mönchspfefferextrakt.....	12-13
Analytik von Flavonglykosiden in Weissdorn und Passionsblumenkraut .....	14-15

### In dieser Ausgabe hervor- gehobene CAMAG Produkte

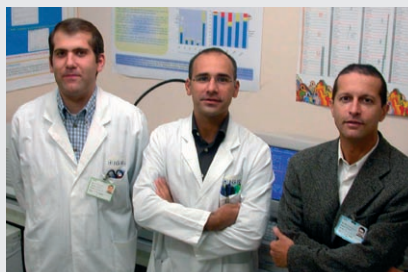
HPTLC-Vario System.....	3
DC-Probenautomat (ATS 4) mit beheizbarer Sprühdüse .....	7
Horizontal-Entwicklungskammer.....	11
Neues von winCATS.....	16

### Rubrik: Kennen Sie CAMAG?

CEO-Wechsel CAMAG unter neuer Führung.....	8
---	---

# Planar-Chromatographie in der Praxis

## Schnelle Analytik von Vinca Alkaloiden in Infusionsbeuteln



◀ L. Mercier, Dr. A. Paci, Dr. P. Bourget  
(Abteilungsleiter), von links nach rechts

Dr. Paci\* und sein Team arbeiten seit 3 Jahren im führenden französischen Krebsforschungszentrum, dem Institut Gustave Roussy. In der Abteilung Klinische Pharmazie, die etwa 35.000 medizinische Zubereitungen pro Jahr herstellt, ist Planar-Chromatographie ein integraler Bestandteil der pharmazeutischen Qualitätssicherung. Sie bevorzugen die HPTLC als relativ einfache und kostengünstige Methode für Gehaltsbestimmungen, die weder den Einsatz von radioaktiv-markierten Drogen, komplexen Derivatisierungen noch teure Ausrüstung erfordert. Sie betrachten HPLC und GC als effiziente, aber für die Analytik vieler Proben zeitaufwendige Verfahren. Für 24 cytotoxische Präparate wurden bisher HPTLC-Methoden entwickelt. Die HPTLC-Plattform ist inzwischen ein Hauptbestandteil des Qualitätsmanagements nach ISO 9001 in der Produktionsabteilung geworden.

### Problemstellung

Schon im letzten CBS wurde eine hervorragende Arbeit von Prof. Creche et al. über Vinca-Alkaloide vorgestellt, allerdings aus dem Blickwinkel der biotechnologischen Prozesskontrolle und -optimierung. In diesem Artikel setzen Dr. Paci und sein Team die Planar-Chromatographie als eine leistungsstarke analytische Methode zur Gehaltskontrolle von Vinca-Alkaloiden in chemotherapeutischen Infusionsbeuteln ein. Sie bestimmen die vier gegen Krebs wirkenden Vinca-Alkaloide, Vindesin, Vinblastin, Vinorelbin und Vincristin, die in der Chemotherapie als antineoplastische Wirkstoffe in Infusionsbeuteln eingesetzt werden.

**Die Gruppe bevorzugt Planar-Chromatographie aufgrund ihrer Schnelligkeit, Kostengünstigkeit und Effizienz. Sie tragen bis zu 60 Proben pro Platte auf. Die Chromatographie aller Proben benötigt nur 15 min (10 min Vorkonditionierung und 5 min zur eigentlichen Chromatographie). Alles in allem, inklusive Auftragung und Auswertung, benötigt die Analytik von 20 Proben 30 min, i.e. 1.5 min pro Probe, verglichen mit einer typischen HPLC-Methode, bei der ein Lauf mehr als 10 min dauert. Die Planar-Chromatographie erfordert keinen Konditionierschritt und ist um den Faktor 6 schneller. Sie ist auch kostengünstiger.**

## Probenvorbereitung

Proben verschiedener Chargen werden mit einer Methanol-Wasser Mischung (1:1) verdünnt.

## Schicht

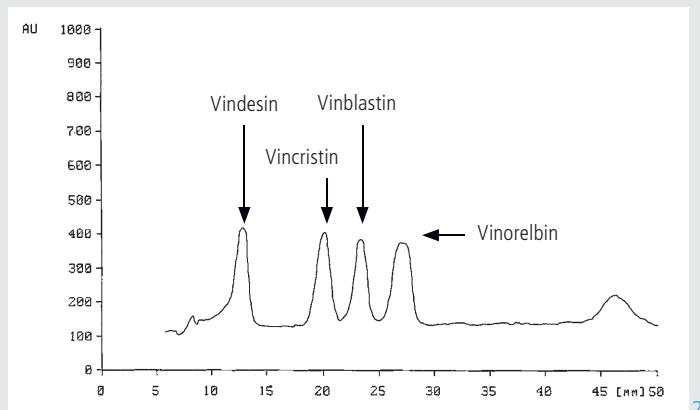
HPTLC-Platten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck), 20 × 10 cm

## Probenauftragung

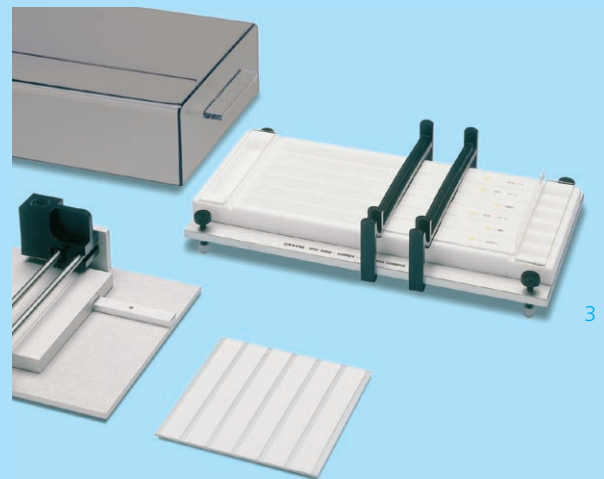
Bandförmig mit DC-Probenautomat, 60 Bahnen (30 pro Seite), Bandlänge 3 mm, Auftragevolumen 50–300 nL, unterer Randabstand 8 mm, seitlicher Randabstand 15 mm, Bahnabstand 5,5 mm

## Chromatographie

In der Horizontal-Entwicklungskammer 20 × 10 cm von beiden Seiten mit je 5 mL Dichlormethan – Methanol 93:7<sup>1</sup> mit Vorkonditionierung für 10 min, Laufstrecke ca. 50 mm, Laufzeit 5 min



▲ Densitogramm der vier Vinca-Alkaloide



## HPTLC-Vario System

Die HPTLC-Vario Kammer wurde bei dieser Anwendung von Dr. Paci und seinem Team zur Fließmittelloptimierung bzw. zur effizienten Methodenentwicklung eingesetzt. Der Vorteil der HPTLC-Vario Kammer liegt darin, dass sechs verschiedene Fließmittel auf einer 10 × 10 cm Platte in einem Lauf getestet werden. Sechs auf einen Streich! Der direkte Fließmittelvergleich auf sechs nebeneinanderliegenden Bahnen erleichtert die Evaluation.

Der geringe Lösungsmittelverbrauch (1 mL des jeweiligen Fließmittels) ist zudem von Vorteil. Im Vergleich zu einer Flachbodenkammer spart man 90% an Fließmittel.

Weitere Variationsmöglichkeiten lassen sich kombinieren:

- Die Entwicklungsbedingungen in Tank- und Sandwich-Konfiguration lassen sich nebeneinander simulieren.
- Sechs verschiedene Bedingungen der Schicht-Vorkonditionierung können nebeneinander untersucht werden, darunter auch der Einfluss der relativen Feuchte.

Die HPTLC-Vario Kammer ist unübertroffen ökonomisch und vielseitig bei der Optimierung der Entwicklungsbedingungen.

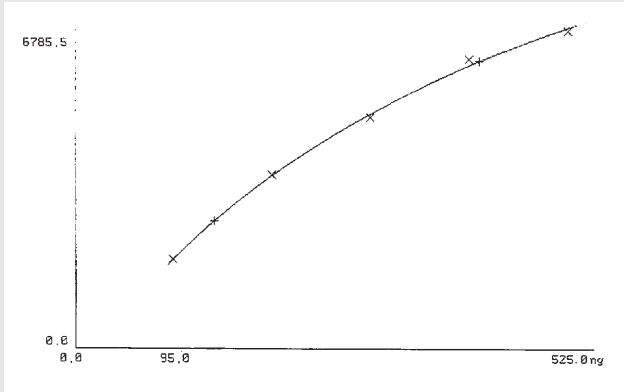
<sup>1</sup> Das Fließmittel wurde zuvor in der HPTLC-Vario Kammer optimiert, in der bis zu 6 Fließmittel simultan getestet werden können.



# ... Planar-Chromatographie in der Praxis

## Densitometrische Auswertung

TLC-Scanner 3 mit CATS Software, Absorptionsmessung bei 274 nm, Michaelis-Menten Regression über die Peakfläche



▲ Michaelis-Menten Regression von Vinorelbin

Richtigkeit		Vincristin	Vinorelbin	Vindesin	Vinblastin
geringe Konzentration	Mittelwert	73.4 (75)	152.0 (150)	150.6 (150)	150.9 (150)
	± RSD	2.58	7.70	3.56	4.36
mittlere Konzentration	Mittelwert	181.1 (175)	251.2 (250)	251.5 (250)	245.5 (250)
	± RSD	6.72	11.05	8.68	5.88
hohe Konzentration	Mittelwert	231.3 (225)	443.7 (450)	452.8 (450)	444.9 (450)
	± RSD	11.43	8.44	14.38	9.34

▲ Richtigkeit für 3 unterschiedliche Konzentrationen (Sollwert) (n = 6)

Variationskoeffizient		Vincristin	Vinorelbin	Vindesin	Vinblastin
Präzision CV <sub>r</sub> (%)	geringe Konzentration	2.1	1.4	2.7	2.3
	mittlere Konzentration	1.8	2.0	2.6	1.3
	hohe Konzentration	0.7	2.2	3.5	2.7
Präzision unter Wiederholbedingungen CV <sub>r</sub> (%)	geringe Konzentration	3.5	5.1	2.4	2.9
	mittlere Konzentration	3.7	4.4	3.5	2.4
	hohe Konzentration	4.9	1.9	3.4	2.1

▲ Präzision (CV<sub>r</sub>) und Präzision unter Wiederholbedingungen (CV<sub>r</sub>) (n = 6)

## Diskussion und Ergebnisse

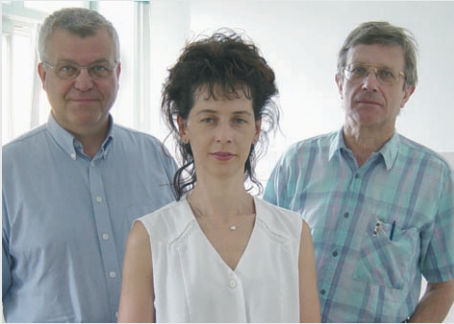
Das analytische Verfahren erlaubt die zuverlässige Quantifizierung der vier Vinca-Alkaloide im Hinblick auf den beabsichtigten Zweck. Die Methode ist genau und präzise. Die Präzision ist besser als 3.5% und die Präzision unter Wiederholbedingungen besser als 5.1%. Bei einem vorgegebenen Akzeptanzbereich von ± 10% des Sollwertes, liegen 97,8% der getesteten Lösungen innerhalb dieses Bereichs. Die resultierende Nicht-Konformitätsrate von 2,2% ist für die Routineanalyse akzeptabel. Analysen, die ausserhalb des Akzeptanzbereiches lagen, liessen sich auf eine schlechte Homogenisierung der hergestellten Chargen vor der Probenahme zurückführen.

Mehr Informationen sind erhältlich von A.Paci (apaci@igr.fr) oder von CAMAG.

\* A. Paci, Dept. of Clinical Pharm., Inst. Gustave Roussy, 39 Rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France



## Verbesserte Trennung von Benzodiazepinen mittels AMD



▲ Dr. R. Werner, Chr. Arndt und Dr. U. Demme (von links nach rechts)

Dr. Demme\*, Dr. Werner und Frau Arndt sind im toxikologisch-chemischen Labor des Instituts für Rechtsmedizin am Klinikum der FSU in Jena tätig. Das Labor beschäftigt sich seit über 20 Jahren mit der Systematischen Toxikologischen Analyse, d. h. der chemisch-analytischen Suche nach einem unbekanntem »Gift« in biologischem Material. Die älteste dafür eingesetzte Methode ist die Dünnschicht-Chromatographie. Daneben werden heute in ihrem Labor die Ion trap-GC-MS und die HPLC verwendet, die jedoch in den letzten 10 Jahren weitgehend durch die HPTLC ersetzt wurden. Die HPTLC dient in Kombination mit der Spektrenmessung nicht nur zum Nachweis unbekannter Verbindungen (hier wird u.a. die hohe Trennleistung nach zweidimensionaler Entwicklung genutzt), sondern auch zur quantitativen Bestimmung von Arzneistoffen im Rahmen der Therapiekontrolle (therapeutic drug monitoring).

\*Dr. Ulrich Demme, Dr. Rolf Werner, Christina Arndt, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Rechtsmedizin, Fürstengraben 23, D-07743 Jena

### Einleitung

Eine Wirkstoffgruppe von hoher toxikologischer Relevanz stellen die Benzodiazepine dar, da diese Stoffe therapeutisch sehr häufig eingesetzt werden und auch ein hohes Missbrauchspotential (z. B. Beikonsum bei Drogenmissbrauch) besitzen. In Deutschland befinden sich 22 Benzodiazepine im Handel. Im Verdachtsfall eines Arzneistoff- oder Drogenabusus und auch einer unklaren Vergiftung muss u.a. auf diese Substanzen geprüft werden. In die Untersuchungen wurden zusätzlich Clotiazepam und zwei wirksame Metaboliten (Amino-Flunitrazepam und Norflunitrazepam) einbezogen. Es wurde nach einer analytischen Methode gesucht, die möglichst viele dieser chemisch zum Teil sehr ähnlichen 25 Verbindungen in einem Lauf trennt. Es wurden 8 Fließmittel (aus Literaturangaben) und 13 Gradienten zu diesem Zweck getestet.

**Die Kombination chromatographischer Daten mit der Spektrenmessung ermöglicht eine gute Identifizierung. Durch AMD konnte die Trennung der 25 Benzodiazepine verbessert werden. Dies beruht neben einer stärkeren Unterscheidung der Laufstrecken insbesondere auf den geringeren Peakbreiten und einer besseren Abtrennung des biologischen Untergrundes. Mit dem besten Trennsystem waren von den 25 Benzodiazepinen nur 2 Substanzpaare auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit nicht unterscheidbar. Die Trennleistung ist durchaus mit der HPLC vergleichbar, bei Einsatz einer zweidimensionalen Trennung sogar etwas höher. Ein weiterer Vorteil ist die Durchführung von Serienanalysen, d. h. bis zu 20 Analysen können auf einer Platte durchgeführt werden. Dieses Verfahren wird als kosteneffizientes, schnelles Screening erfolgreich eingesetzt.**

### Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung wurde für diese Arbeit nicht gezielt untersucht. Serum kann z. B. mit 1-Chlorbutan in schwach basischem Milieu (pH ~ 9) Phasenverhältnis  $\geq 3:1$  extrahiert werden.

### Schicht

HPTLC-Platten LiChrospher® Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck), 20 x 10 cm

### Probenauftragung

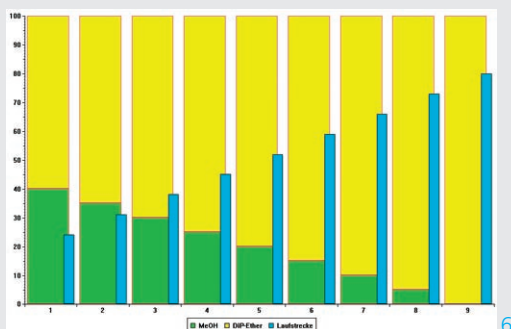
Bandförmig, 25 Bahnen, Bandlänge 2 mm, Auftragevolumen 1–4  $\mu\text{L}$  (je 200 ng Benzodiazepin), unterer Randabstand 10 mm, seitlicher Randabstand 10 mm, Bahnabstand 7 mm



# ... Planar-Chromatographie in der Praxis

## Chromatographie

Mit AMD2-System: Methanol, Diisopropylether, Toluol, Dichlormethan und t-Butylmethylether wurden als Lösungsmittel sowie Ammoniak und Ameisensäure als polare Modifier getestet. Ein 9-Stufen Gradient aus Methanol und Diisopropylether zeigte die höchste Trennleistung (Laufstrecke 80 mm).



▲ AMD 2 Gradient auf Basis von Methanol und Diisopropylether

## Densitometrische Auswertung

TLC-Scanner mit CATS Software, Absorptionssmessung bei 230 und 320 nm gefolgt von einer Spektrenmessung von 200 bis 330 nm

## Ergebnisse und Diskussion

Nachfolgende Tabelle zeigt die Laufstrecken der 25 Benzodiazepine einschliesslich der gemessenen Halbwertsbreiten (Mittelwerte aus drei Versuchen), sowie die Maxima der Absorptionsspektren (\* = Hauptmaximum).

$$DP = 1 - \frac{2 \times M}{N(N-1)}$$

Nr	Benzodiazepin	Y (mm)	B <sub>1/2</sub> (mm)	λ <sub>max</sub> (nm)	Überlappungen (matches, M)
1	Alprazolam	27,7	1,3	219	
2	Amino-FNZ	42,7	1,5	239*, >330	M1
3	Bromazepam	45,3	1,7	234*, 325	M2, M3
4	Brotizolam	30,5	1,2	245*, 310	M4
5	Chlordiazepoxid	37,5	1,2	261*, 310	
6	Clobazam	51,5	1,6	228*, 291	M5, M6, M7
7	Clonazepam	51,3	1,5	258, 315*	M5, M8, M9
8	Clotiazepam	57,8	1,4	247*, 324	M10, M11
9	Diazepam	57,1	1,5	230*, 317	M10, M12
10	Dikaliumchlorazepat	53,9	1,5	228*, 318	M13, M14, M15
11	Flunitrazepam	53,1	1,4	258, 314*	M13, M16, M17, M18
12	Flurazepam	31,9	2,8	228*, 314	M4
13	Loprazolam	15,0	1,1	>330	
14	Lorazepam	44,4	2,7	225*, 322	M1, M2, M19
15	Lormetazepam	48,1	2,1	227*, 319	M20
16	Medazepam	58,3	1,5	249	M11, M12, M21
17	Midazolam	36,1	1,3	229	
18	Nitrazepam	52,2	1,4	267, 313*	M6, M8, M16, M22
19	Nordazepam	53,8	1,7	227*, 318	M14, M17, M23
20	Nor-Flunitrazepam	52,5	1,5	257, 314*	M7, M9, M15, M18, M22, M23
21	Oxazepam	44,2	2,5	228*, 317	M3, M19
22	Prazepam	61,3	1,7	232*, 315	
23	Temazepam	49,1	2,0	229*, 317	M20
24	Tetrazepam	59,6	1,4	228*, 310	M21
25	Triazolam	25,8	1,3	218	

▲ Laufstrecke Y, Halbwertsbreite B<sub>1/2</sub> und Maxima der UV-Spektren λ<sub>max</sub> von 25 Benzodiazepinen, getrennt mit oben genanntem AMD-Gradienten (grün markiert: unterscheidbar; rosa markiert: nicht unterscheidbar)

Als Kriterium für eine Überlappung und damit eine gegenseitige Störung des Nachweises wurden neben der Laufstrecke die Halbwertsbreiten herangezogen. Ist der Abstand zweier Peakmaxima grösser als die Hälfte der Summe der zugehörigen Halbwertsbreiten ( $\Delta Y_{1-2} > (B^1_{1/2} + B^2_{1/2})/2$ ) gilt ein Peak als getrennt. Insgesamt traten bei Anwendung dieses Kriteriums 23 Überlappungen («matches» M1–M23) auf, so dass sich für die Trennung dieser 25 Benzodiazepine (N = 25) eine »discriminating power« DP von 0,923 ergibt.

Anschliessend wurden die den matches zugrundeliegenden Substanzpaare zusammen (jedes »match« auf einen Startpunkt) und im gleichen Gradienten getrennt. Mit Hilfe der Laufstrecken und der UV-Spektren konnten von den 23 matches 11 getrennt, d.h. die Substanzen eindeutig unterschieden werden, so dass sich die DP auf 0,96 erhöhte.

Bei der einstufigen isokratischen Entwicklung der verbleibenden 12 matches mit Dichlormethan – Methanol 9:1 blieben nur noch zwei Überlappungen übrig, i.e. Nitrazepam und Nor-Flunitrazepam sowie Lorazepam und Oxazepam. Bei anderen isokratischen

Fliessmitteln traten mehr matches auf, Lorazepam und Oxazepam liessen sich in keinem der untersuchten Fliessmittel eindeutig trennen.

Bei der oben aufgeführten Kombination zweier Trennsysteme, z. B. als zweidimensionale Entwicklung, würde sich die discriminating power somit auf 0,993 erhöhen.

Match	Wirkstoff A	Wirkstoff B	Laufstrecke A (mm)	Laufstrecke B (mm)
M4	Brotizolam	Flurazepam	28,0	22,0
M5	Clobazam	Clonazepam	53,3	46,7
M8	Clonazepam	Nitrazepam	46,7	52,3
M9	Clonazepam	Nor-Flunitrazepam	46,7	52,9
M11	Clotiazepam	Medazepam	50,0	55,6
M13	Dikaliumchlorazepat	Flunitrazepam	46,3	56,9
M14	Dikaliumchlorazepat	Nordazepam	46,3	51,0
M16	Flunitrazepam	Nitrazepam	56,9	52,3
M17	Flunitrazepam	Nordazepam	56,9	51,0
M18	Flunitrazepam	Nor-Flunitrazepam	56,9	52,9
M19	Lorazepam	Oxazepam	39,2 ( $B_{1/2}=2,3$ )	41,9 ( $B_{1/2}=3,1$ )
M22	Nitrazepam	Nor-Flunitrazepam	52,3	52,9

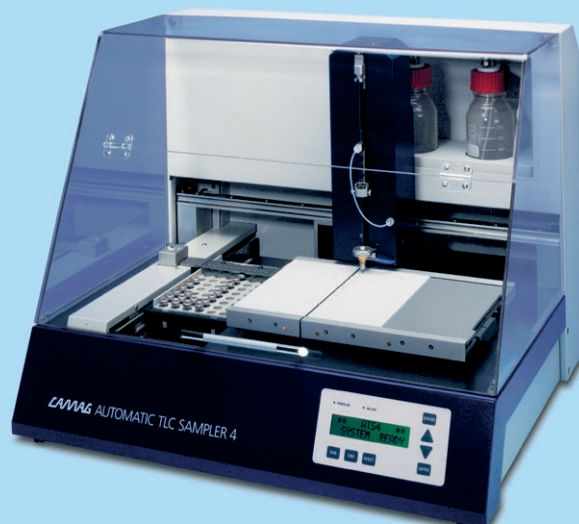
▲ Laufstrecken der einstufigen isokratischen Entwicklung der verbleibenden 12 matches mit Dichlormethan – Methanol 9:1 (grün markiert: unterscheidbar; rosa markiert: nicht unterscheidbar)

In der HPLC-Spektrenbibliothek von Pragst et al. [1] sind 23 Benzodiazepine enthalten (es fehlen Nr. 10 und 20). Folgt man den Angaben zu den relativen Retentionszeiten, so würden sich bei einer durchschnittlichen Peakbreite von 0,25 min 5 matches (DP = 0,98) ergeben.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch den Einsatz der AMD-Technik die Trennung von Benzodiazepinen verbessert werden kann – sogar im Vergleich mit dem für die isokratische Entwicklung dieser Wirkstoffe am besten geeigneten Fliessmittel Dichlormethan – Methanol 9:1.

Weitere Informationen sind bei den Autoren (Ulrich.Demme@med.uni-jena.de) auf Anfrage erhältlich.

[1] F. Pragst, M. Herzler, S. Herre, B.-T. Erxleben, M. Rothe: UV Spectra of Toxic Compounds, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, Germany, 2001.



### CAMAG DC-Probenautomat 4 (ATS 4)

In diversen Beiträgen dieser CBS-Ausgabe wird der ATS 4 zum vollautomatischen Auftragen von Substanzen auf die Platte eingesetzt (siehe Seite 3, 12 und 14). Der ATS 4 trägt Substanzen vor Umwelteinflüssen geschützt mit höchstmöglichem Bedienkomfort auf. Proben können in Form schmaler Striche oder – bei grösseren Volumina – in Rechteckform aufgesprüht werden, kleinere Volumina auch punktförmig durch Kontaktauftragung.



### Jetzt gibt es den ATS4 auch mit beheizbarer Sprühdüse

Vor allem im Bereich der Spurenanalytik ist der Einsatz des ATS4 mit beheizbarer Sprühdüse eine grosse Erleichterung, denn hier müssen meist grössere Volumina aufgetragen werden, um die Nachweisempfindlichkeit zu erreichen. Zudem muss bei wässrigen Extrakten wegen des geringen Dampfdrucks und der hohen Elutionskraft auf Kieselgelschichten eine geringe Auftragegeschwindigkeit gewählt werden. So kann die Auftragung von 50 µL eines wässrigen Extraktes mit dem normalen ATS4 15 min dauern, mit der auf 60° C beheizten Sprühdüse nur ca. 7 min. Die Düsentemperatur ist zwischen 30 und 60° C wählbar.

## CEO-Wechsel CAMAG seit Januar 2003 unter neuer Führung



▲ Hans Reichenbach, CEO 1994 bis 2002

Herr Reichenbach hat sich nach 38 Jahren beherztem Engagement für CAMAG Ende Juli 2003 aus der Geschäftsleitung zurückgezogen. Trotz seines Rücktritts aus der Geschäftsleitung wird Herr Reichenbach CAMAG weiterhin als Berater zur Verfügung stehen. Auch sein Verwaltungsratsmandat wird er weiterführen, und im Jahre 2004 wird er sich erneut für weitere drei Jahre zur Wahl stellen.



▲ Peter Jänchen, CEO

Seine Führungsposition als CEO (Vorsitzender der Geschäftsleitung) hat Herr Peter Jänchen bereits am 1. Januar 2003 übernommen. Herr Jänchen wird als neuer CEO die erfolgreiche Firmenpolitik weiterführen. CAMAG wird die Planar-Chromatographie auch in Zukunft als moderne analytische Methode mit technisch und qualitativ hochwertigen Produkten im Markt profilieren.

Viele von Ihnen kennen Peter Jänchen bereits persönlich durch seine Tätigkeit als Bereichsleiter Forschung und Entwicklung, welche er 10 Jahre innehatte. Er war auch als solcher schon im CBS 71 vorgestellt worden. Zusammen mit seinem Entwicklungsteam hat er der instrumentellen Planar-Chromatographie ein innovatives Image gegeben.

Ihnen allen danken wir für Ihr Vertrauen zu CAMAG und wir freuen uns, dass Sie der Planar-Chromatographie, einer besonders kreativen und bildgebenden chromatographischen Methode, weiterhin die Treue halten. Es lohnt sich!



## Parameter der Planar-Chromatographie

Die Beiträge dieser Reihe widmen sich in zwangloser Folge den wesentlichen Arbeitsschritten der Planar-Chromatographie und ihren Parametern, die Einfluss auf das chromatographische Ergebnis haben. Es werden Hinweise zur Optimierung gegeben, um einen effizienten Einsatz der Methode zu gewährleisten.

**Das Sammeln dieser Blätter wird empfohlen.**

## Handhabung von DC-Platten

Die Planar-Chromatographie verwendet das Off-line Prinzip und obwohl es moderne Instrumente für die einzelnen Schritte gibt, ist eine durchgängige Automatisierung nicht vorhanden. Dies macht einen manuellen Transport der Platte zwischen den Schritten notwendig. Obwohl sie nicht unbedingt Teil des DC-Prozesses ist, kann auch die Vorbereitung der Platte für den Gebrauch manuelle Operationen erfordern. Die chromatographische Platte ist ein sehr empfindliches Objekt und kann leicht verunreinigt werden. Daher muss sie mit besonderer Sorgfalt behandelt werden. In diesem Kapitel sollen praktische Tipps zur Verbesserung der Plattenleistung und zum Vermeiden von häufigen Problemen gegeben werden.

### 1. Lagerung, Vorwaschen

Verunreinigungen auf der Platte sammeln sich nicht nur aus der Laboratmosphäre an, sondern können auch aus dem Verpackungsmaterial wie z.B. Schrumpffolien stammen. Werden Platten in der originalen Styroporverpackung gelagert, sollte die oberste Platte mit der Schicht nach unten liegen. Während für die meisten qualitativen Analysen die Platten direkt und ohne Vorbehandlung verwendet werden können, ist es empfehlenswert eine standardisierte Reinigung zu erwägen, wenn das analytische Verfahren validiert werden muss (Stabilitätstest, Quantifizierung) und reproduzierbare Ergebnisse gefordert sind. Um Verunreinigungen der Schicht zu entfernen, kann die Platte entweder »vorgewaschen« oder »vorentwickelt« werden. Beim Vorwaschen wird die Platte für einige Minuten in ein grosses Volumen Isopropanol getaucht. In dieser Zeit diffundieren Verunreinigungen in die Waschflüssigkeit. Nachdem die Platte in einem Reinraum (Clean bench) unter Stickstoff getrocknet wurde, kann die Prozedur mit frischem Lösungsmittel wiederholt werden. Vorentwickeln ist technisch viel einfacher. Die Platte wird mit einem »starken« Fließmittel bis zum oberen Rand entwickelt. Für Kieselgelplatten wird meist Methanol empfohlen. In einigen Fällen, in denen die Verunreinigungen sehr unpolar sind, ist Methanol allerdings nicht das beste Reinigungsmittel. Abbildung 1 zeigt den Effekt des Vorwaschens einer Platte, die mit Verunreinigungen aus der Verpackung kontaminiert ist. Es ist nicht sinnvoll, die Platte mit einem Teil des später verwendeten Fließmittels vorzuentwickeln. In diesem Fall kommt es oft zur Ausbildung sekundärer Fronten, in welchen sich Verunreinigungen ansammeln. Diese Fronten lassen sich während der eigentlichen Entwicklung nur selten entfernen.

Die gereinigte Platte wird meist im Ofen bei 120° C für 20 bis 30 min getrocknet (und aktiviert). In einer von Staub und Chemikaliendämpfen freien Umgebung (z.B. grosser leerer Exsikkator, Clean bench) wird die aktivierte Platte auf Raumtemperatur gekühlt und mit der relativen Feuchte der Laboratmosphäre equilibriert.

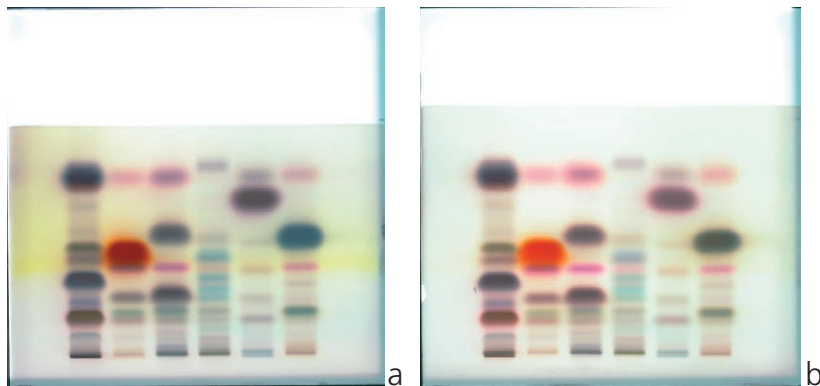


Abbildung 1: Einfluss des Vorreinigens auf den Plattenhintergrund (a) kein Vorreinigen, (b) Vorentwickeln mit Methanol

Mobile Phase: Toluol – Ethylacetat 95:5, Derivatisierung durch Tauchen in Anisaldehyd-Reagens mit nachfolgendem Erhitzen für 3 min bei 100°C.

Von links nach rechts: Kamillen-, Thymian-, Lavendel-, Bitterorangen-, Anis-, Fichtennadelöl.

## 2. Aktivierung

Während der Lagerung und beim Benutzen stehen Kieselgelplatten immer in Wechselwirkung mit der Laboratmosphäre und können dabei Wasser adsorbieren. Dies beeinflusst die Aktivität der Schicht. Die Aktivität ist dabei umgekehrt proportional zur relativen Luftfeuchtigkeit und zum  $R_F$  Wert des Analyten. Allerdings kann man diese Aussage nicht generalisieren, da auf der Oberfläche adsorbiertes Wasser auch die Selektivität der Trennung beeinflussen kann. Wie man in Abbildung 2 sieht, ist es möglich, dass Änderungen der relativen Feuchtigkeit/Aktivität verschiedene Substanzen in unterschiedlichem Masse beeinflussen. Während die Position von  $\beta$ -Sitosterol (rote gepunktete Linie) unverändert bleibt, haben die Zonen darüber und darunter (Alkylamide) niedrigere  $R_F$  Werte, wenn die Feuchtigkeit sinkt.

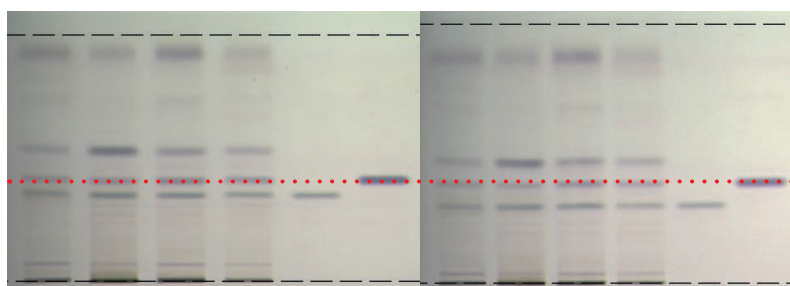


Abbildung 2: Einfluss der relativen Feuchte auf den Fingerprint (Alkylamide) von *Echinacea purpurea*. Mobile Phase: Toluol – Ethylacetat – Cyclohexan – Ameisensäure 24:6:3:0.9, Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz. Links: 45% rel. F., rechts: 32% rel. F.

Bahnen 1–4: Proben, Bahn 5: Dodecatetraesäureisobutylamid, Bahn 6:  $\beta$ -Sitosterol

Das Erwärmen der Platte auf 120° C im Ofen erhöht ihre Aktivität. Bei dieser Temperatur wird das auf der Oberfläche adsorbierte Wasser vollständig entfernt. Hohe Aktivität ist aber nicht unbedingt erwünscht, weil sie Tailing und sogar chemische Reaktionen zur Folge haben kann. Technisch ist es recht schwierig, die Aktivität der Kieselgelschicht für die Chromatographie einzustellen. Während des Transports und beim Probenauftragen befindet sich die stationäre Phase immer im Kontakt mit der relativen Feuchte der Umgebung. Der Versuch, durch Abdecken der Platte während des Probenauftragens, diesen Kontakt zu unterbinden, ist keine reproduzierbare Lösung. Es ist eher anzuraten, die aktivierte Platte in staub- und chemikalienfreier Umgebung auf Raumtemperatur zu kühlen und mit der Umgebungsfeuchte ins Gleichgewicht zu bringen. In jedem Fall sollte während der Chromatogrammentwicklung die aktuelle Temperatur und Feuchte im Labor notiert werden. Um die Aktivität der Schicht gezielt zu verändern, kann die Platte vor der Chromatographie über Schwefelsäure oder gesättigten Salzlösungen für längere Zeit konditioniert werden (Tabelle). Ein in diesem Zusammenhang wesentlicher Nachteil gesättigter Salzlösungen ist ihr Vermögen zu »kriechen«.

Gew. % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	% rel. Feuchte	Gesättigte Salzlösung	% rel. Feuchte
10	96	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	98
20	88	KBr	84
30	75	NaNO <sub>2</sub>	66
40	56	NaHSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	52
50	35	KF	31
60	16	HCOOK	21
70	3	ZnCl <sub>2</sub> · 1.5 H <sub>2</sub> O	10

Tabelle: Lösungen zum Einstellen der relativen Feuchte

### 3. Beschriften

Vor Beginn der Chromatographie sollte die DC Platte beschriftet werden (siehe auch Einlage im CBS 89). Zur Beschriftung gemäss Abbildung 3 verwendet man einen weichen Bleistift. Dabei darf die aktive Schicht im für die Chromatographie vorgesehenen Bereich nicht berührt werden. Eine bequeme Alternative bieten GLP-kodierte Platten.

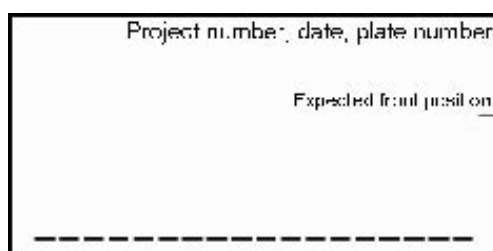


Abbildung 3 Beschriftung einer HPTLC-Platte

### 4. Imprägnieren

Das chromatographische Verhalten einer DC-Platte kann durch Imprägnieren signifikant verändert werden. Imprägnieren erfolgt meist durch Tauchen in eine 5–10% Lösung des nicht flüchtigen Imprägnierungsreagenzes in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel. Durch 30 min Trocknen der Platte bei 100–120° C wird das Lösungsmittel entfernt. Die Tabelle auf der nächsten Seite gibt einen Überblick. Abbildung 4 zeigt den Einfluss des Imprägnierens am Beispiel der Trennung von Ginkgoliden.

## Komplexbildung

Imprägnierung mit	Konzentration der Imprägnierlösung	Anwendungsgebiete
EDTA	10%	Cephalosporine, Tetracycline, Metallionen, Phospholipide, Phenole
Borsäure oder Borate	5%	Ascorbinsäure-Derivate, Zucker, Phosphatidylinositole, Urethan-Derivate, Mono-/Di-/Triglyceride, Stearinsäure, Lipide
Übergangsmetallsalze	5–20%	Aminosäuren, aromatische Amine, Sulfonamide, Aniline, Chinoline, Phenol-Derivate
Eisen(III)salze	5–20%	Phenolische Säuren
Silbernitrat	3–20%	Wechselwirkung von Ag <sup>+</sup> mit $\pi$ -Elektronen von Doppel-/Dreifachbindungen. Fettsäuren, Diglyceride/Triglyceride, Phospholipide, Glycolipide, Steroide

## Bildung von Charge-Transferkomplexen

Koffein	4%	Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)
---------	----	--

## Ionenpaarbildung

Quaternäre Ammoniumsalze	0.05M	Sulfa-Drogen, Penicilline
--------------------------	-------	---------------------------

## Einstellen des pH-Wertes

Anorganische Säuren	0.1–0.5N	Phenole, Säuren, aromatische Amine
Kalium-/Natriumhydroxid	0.1–0.5N	Alkaloide, Amine, basische Substanzen
Puffersalze		Curcumin-Derivate, Zucker, Schwermetalle, Phloroglucinole

## Veränderung der Löslichkeit des Analyten in der »flüssigen« stationären Phase (Verteilungschromatographie), Modifizierung des Verteilungskoeffizienten

Formamid		Lokalanästhetika, Alkaloide, Digitalisglycoside, Nitrophenole
Ammoniumsulfat		Lipide, Phospholipide
Natriumnitrit		Phenole
Natriumbisulfite-Citrat-Puffer		Zucker
Natriumsulfat	0.1M	Zucker
Natriumacetate	4–10%	Terpenlactone
Lithium-/Natrium-/Kaliumsalze		Metallionen, aromatische Amine
Ammoniumthiocyanat		Metallionen
Butylamin		Metallionen

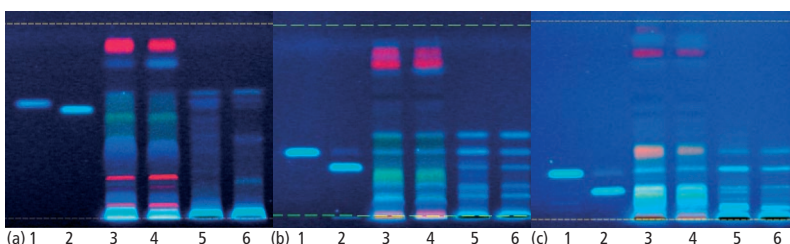


Abbildung 4: Einfluss der Imprägnierung auf die Trennung von Terpenlactonen aus *Ginkgo biloba* (a) Keine Imprägnierung, (b) Imprägnierung mit 4% Natriumacetatlösung für 2 s, (c) Imprägnierung mit 10% Natriumacetatlösung für 20 s. Mobile Phase: Toluol – Ethylacetat – Aceton – Methanol 20:10:10:1.2, Derivatisierung mit Acetanhydrid-Reagenz. Bahn 1: Ginkgolid A, Bahn 2: Ginkgolid B, Bahnen 3, 4: Ginkgo-Blätter, Bahnen 5, 6: Extrakte.



CAMAG · Sonnenmattstrasse 11 · CH-4132 Muttenz 1 (Schweiz)  
Tel. +41-61 4673434 · Fax +41-61 4610702 · info@camag.com

CAMAG · Bismarckstrasse 27–29 · DE-12169 Berlin (Deutschland)  
Tel. +49-30 79570 81 · Fax +49 -30 7957073 · info@camag-berlin.de

CAMAG Scientific Inc. · 515 Cornelius Harnett Drive · Wilmington, NC 28401 (USA)  
Tel. +1-910 343 1830 · Fax +1-910 343 1834 · tlc@camagusa.com

[www.camag.com](http://www.camag.com)



## Identifizierung von echtem Safran



▲ Teilnehmerinnen des HPTLC-Workshops am Institut für Didaktik der Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg: Frau Elke Hahn-Deinstrop (links), Leiterin der Arbeitsgruppe Dr. Kathrin Sommer (rechts), 3 Teilnehmerinnen

Das »Jahr der Chemie« soll der breiten Öffentlichkeit den abstrakten, belasteten Begriff »Chemie« nahe bringen, den Mitbürger informieren und sein Interesse wecken. Frau Hahn-Deinstrop\*, die Sie als Buchautorin (Dünnschicht-Chromatographie, Praktische Durchführung und Fehlervermeidung, ISBN 3-527-28873-2) vielleicht schon kennen, arbeitet bei Heumann Pharma GmbH in Feucht. Sie hat nachfolgenden Versuch mit dem Chemie-Leistungskurs eines Gymnasiums sowie am Institut für Didaktik der Chemie mit Junglehrern durchgeführt und dabei den Schülern und angehenden Lehrern sehr eindrucksvoll das Prinzip der Chromatographie verdeutlicht.

**Hier zeigt sich die Stärke der Planar-Chromatographie – es ist ein sehr anschauliches Verfahren, um Chromatographie an sich begreiflich zu machen.**

Die Methode wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Angelika Koch, Frohme-Apotheke Hamburg, entwickelt. Man kann diesen Versuch sehr leicht nachmachen, da Safran über den Lebensmittelhandel oder die Apotheke erhältlich ist.

### Einleitung

In einem Urlaubshotel am Roten Meer wurde den Gästen zum Abschied eine Erinnerungskarte auf das Zimmer gelegt, an die ein Tütchen mit ca. 10 g »Safran« nebst einem Rezept für ein Hühnergericht angeklammert war. Diese Freigiebigkeit liess Misstrauen aufkommen, denn bekanntermassen ist Safran das teuerste Gewürz der Welt. So kosteten im März dieses Jahres 100 mg ganzer bzw. gemahlener Safran 1,95 Euro. Für die geschenkte Gewürzmenge würde das immerhin 195 Euro bedeuten! Es galt also, eine schnelle und kostengünstige Methode für die Identifizierung von pulverisiertem Safran zu finden. Im Deutschen Arzneimittelkodex (DAC) 1999, im Homöopathischen Arzneibuch (HAB) 2000 und nun wieder neu im Europäischen Arzneibuch (EuAB) 4 ist Safran mit einer eigenen Monographie vertreten. Die Planar-Chromatographie ist als eine Möglichkeit zur Identifizierung vorgegeben.

**Die in dem EuAB unter der Bezeichnung »Crocus für homöopathische Zubereitungen« beschriebene DC-Methode wurde nachfolgend auf HPTLC-Platten umgestellt. Die Chromatographiezeit wurde dadurch um 50% verkürzt. Zudem konnte 75% des Fließmittelvolumens eingespart werden. Für den Schulversuch sind sogar das Plattenformat 5 x 5 cm, 1 mL Fließmittel und eine Laufzeit von nur 8 min für 5 Proben gut geeignet.**

Safran besteht aus den meistens durch ein kurzes Griffelstück zusammengehaltenen, getrockneten Narben von *Crocus sativus* L. (*Iridaceae*) und besitzt einen charakteristischen, an Jodoform erinnernden Geruch. Die Hauptinhaltsstoffe sind wasserlösliche Farbstoffe (Crocine), Bitterstoffe (Picrocrocine) und ätherisches Öl (Safranal, das sich durch thermische Spaltung aus Picrocrocine bildet). Nachfolgend wurden Proben aus Ägypten, Deutschland, Spanien, Iran und Dänemark untersucht. Als Vergleich diente das über den Apothekenhandel bezogene »Safran 1. Klasse in Fäden« und die als »Wilder Safran« bezeichneten Färberdistelblüten (*Flores Carthami*).



▲ Blühender Safran, *Crocus sativus* L. (*Iridaceae*)



▲ Safranfäden 1. Klasse und zwei Verfälschungen



# ... Planar-Chromatographie in der Praxis

## Probenvorbereitung

100 mg Droge zerstoßen und mit 0,2 mL Wasser benetzen, nach 3 min 5 mL Methanol zusetzen, dann 20 min unter Lichtausschluss einwirken lassen und durch Glaswolle abfiltrieren. Das klare Filtrat wird zur Chromatographie verwendet.

Als Referenzlösung nach EuAB (dient nur zur  $hR_f$ -Wert-Beschreibung der Hauptinhaltsstoffe) 5 mg Naphtholgelb in 5 mL Methanol und 5 mg Sudanrot G in 5 mL Dichlormethan lösen, beide Lösungen 1:1 mischen.

## Schicht

Statt der in der EuAB beschriebenen DC-Platte Kieselgel 60  $F_{254}$  wurden verschiedene HPTLC-Platten (Kieselgel 60  $F_{254}$ , LiChrospher® Kieselgel 60  $F_{254}$ , RP-18  $F_{254}$  und DIOL  $F_{254}$ ) eingesetzt. Die HPTLC-Platte Kieselgel 60  $F_{254}$  eignete sich am besten. Die Platten wurden in 2-Propanol vorgewaschen und 15 min bei 100° C aktiviert.

## Probenauftragung

Probenlösung 2  $\mu$ L und Standardlösung 1  $\mu$ L, 15 Bahnen, Bandlänge 8 mm, unterer Randabstand 8 mm, seitlicher Randabstand 10 mm, Bahnabstand 12 mm

## Chromatographie

In der CAMAG Horizontal-Entwicklungskammer 20 x 10 cm mit Ethylacetat- 2-Propanol – Wasser 13:5:2 mit Kammersättigung, Laufstrecke 6.5 cm, Laufzeit 24 min. Alternativ kann auch die CAMAG-Doppeltröckammer eingesetzt werden.

## Postchromatographische Derivatisierung

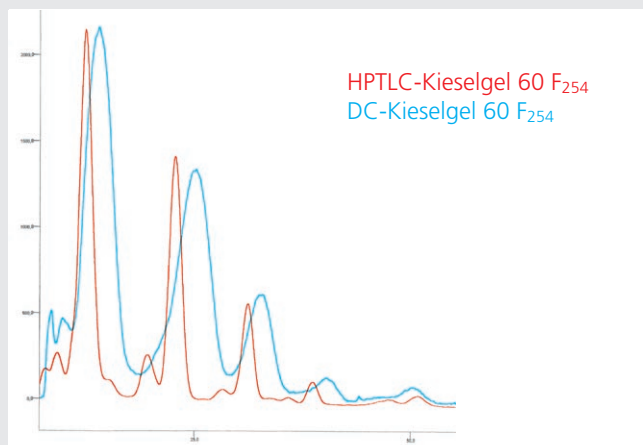
Die Platte wird mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz besprüht und anschließend 5 bis 10 min bei 110° C erhitzt.

## Visuelle Auswertung

Im Tageslicht (Durchlicht vor der Derivatisierung, Auflicht nach der Derivatisierung) und bei UV 254 nm

## Ergebnisse und Diskussion

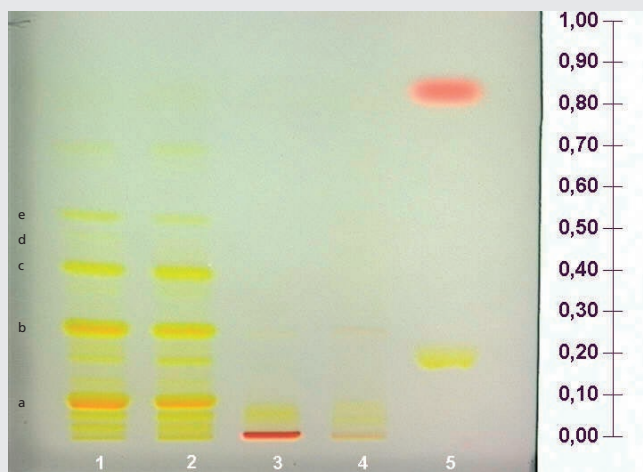
Um die unterschiedlichen Trennleistungen der eingesetzten Fertigplatten zu belegen, wurde jeweils eine Bahn der Platten bei 430 nm gescannt und durch Überlagerung miteinander verglichen, nachfolgend der Vergleich zwischen DC- und HPTLC-Sorbens. Die Zonenausprägung ist auf HPTLC-Kieselgel 60  $F_{254}$  Platten differenzierter.



14

▲ Vergleich der Trennleistungen von DC- und HPTLC-Platten

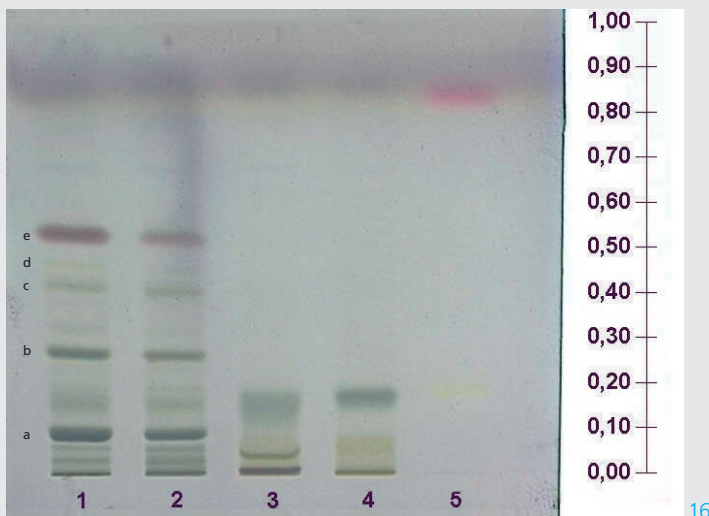
Im Tageslicht (Durchlicht) sind vor der Derivatisierung bis zu 8 gelbe Zonen erkennbar, von denen 3 eine deutlich höhere Konzentration aufweisen (Zonen a–c).



15

▲ Tageslicht-Aufnahme (Durchlicht) vor der Derivatisierung: Bahn 1: Safran 1. Klasse (Referenz), Bahn 2: in Deutschland gekaufter Safran, Bahn 3: Safran spezial, Bazar Hurghada, Bahn 4: Färberdistelblüten (Wilder Safran), Bahn 5: Referenzlösung (Naphtholgelb S und Sudanrot G)

Laut Literatur [1] soll die untere stark gelbe Zone (Crocin,  $hR_f$ -Wert 7–9) die höchste Intensität zeigen. Im UV-Licht von 254 nm ist zusätzlich bei  $hR_f$  48–50 eine fluoreszenzmindernde Zone erkennbar (Zone e). Nach der Derivatisierung mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz färben sich die Zonen a–d grau-blau, Zone e wechselt relativ schnell von bordeauxrot nach rot-grau.



▲ Tageslicht-Aufnahme (Auflicht) nach der Derivatisierung: Bahnbelegung wie Bild zuvor

Anhand der vorliegenden Referenz-Chromatogramme konnte die Echtheit der aus Ägypten mitgebrachten Safran-Proben eindeutig widerlegt werden. Es liegt vielmehr die Vermutung nahe, dass die »Hotelprobe« aus Färberdistelblüten besteht. Man hat aus der volkstümlichen Bezeichnung »Wilder Safran« für diese Droge einfach das »Wilder« weggelassen. Die in Deutschland, Dänemark und Spanien erworbene Handelsware entspricht der Referenzdroge.

Zur Zeit sind Safranzwiebeln in Eigenkultur genommen worden. Nach Ernte der Narben im Herbst kann dann anhand dieses frischen Musters überprüft werden, ob die auf allen Chromatogrammen jetzt gefundenen gelben Zusatzzonen (vor allem im Bereich zwischen Start und Crocin) bereits Zersetzungsprodukte der hier verwendeten Handelsware sind.

Weitere Details sind bei den Autoren (elke.hahn\_deinstrop@arcor.de, Koch@Frohme-Apotheke.de) auf Anfrage erhältlich.

\* Elke Hahn-Deinstrop, Kleingeschaidter Str. 23, D-90542 Eckental und Dr. Angelika Koch, Frohme-Apotheke, Frohme Str. 14, D-22457 Hamburg

[1] Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, 5. Auflage, Folgeband 2, Drogen A–K, S. 442, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 1998



17

## Horizontal-Entwicklungskammer

Die Horizontal-Entwicklungskammer (HDC, Horizontal Developing Chamber) wird nicht nur in dieser Anwendung eingesetzt, sondern auch bei der schnellen Analytik von Vinca-Alkaloiden (siehe Seite 2–4). Bei der Alkaloid-Trennung erweist sie sich als sehr zeitsparend. Sie erlaubt es, die Platte von beiden gegenüberliegenden Seiten zur Mitte zu entwickeln und damit die Probenzahl pro Platte gegenüber herkömmlichen Entwicklungstechniken zu verdoppeln. Es werden 60 Proben zeitgleich in 5 min entwickelt!

Für die eigentliche Entwicklung werden nur 5 mL Fließmittel pro Seite benötigt. Somit ist die HDC auch hier im Vergleich zu anderen Kammertypen am sparsamsten, z. B. benötigt die HDC im Vergleich zu einer Flachbodenkammer 75% weniger Fließmittel.

Ihre einfache Handhabung beim Konditionieren in der Tank-Konfiguration oder bei der Entwicklung in der Sandwich-Konfiguration machen sie sehr flexibel. Die HDC ist unübertroffen ökonomisch, vielseitig und gut reproduzierbar im Routinebetrieb, insbesondere bei der Massanalytik. Testen Sie sie!

## Stabilitätsprüfung von *Vitex agnus castus* (Mönchspfeffer) Extrakten



◀ Franziska Wahli

18

Frau Franziska Wahli hat ihre Diplomarbeit im CAMAG Labor gemacht in Kooperation mit der Universität Basel im Fach Pharmazeutische Biologie, betreut von Prof. Beat Meier und Prof. Willy Schaffner.

Die Planar-Chromatographie (DC/HPTLC) wird in der Arzneipflanzenanalytik primär für Identitätsprüfungen eingesetzt. Die resultierenden Fingerprints liefern zudem Informationen über die Qualität der Droge. Nachfolgend wird dargestellt, dass HPTLC Fingerprints geeignet sind, in Extrakten bewusst herbeigeführte Veränderungen, in sogenannten Stresstests, zu detektieren. Die Methode ist hinreichend selektiv, um solche Veränderungen nachzuweisen.

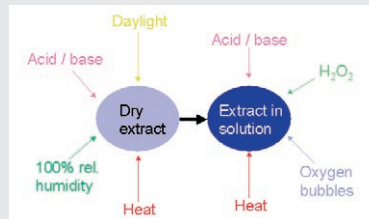
**Die Planar-Chromatographie erlaubt, die Stabilität von Pflanzenextrakten zuverlässig zu beurteilen. Anhand der Ergebnisse können Haltbarkeitsfristen und Lagerungsbedingungen für das jeweilige Produkt festgelegt werden.**

### Probenvorbereitung

1 g Mönchspfefferextrakt in 10 mL Methanol lösen, 5 min mit Ultraschall behandeln und filtrieren. Standards in Methanol lösen (0.1 mg/mL).

### Stresstests

Der Extrakt wurde trocken und gelöst verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt.



19

◀ Eingesetzte Stressbedingungen

### Schicht

HPTLC-Platten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck), 20 × 10 cm

### Probenauftragung

Bandförmig mit DC-Probenautomat 4, 12 Bahnen, Bandlänge 8 mm, Auftragevolumen 2 µL, unterer Randabstand 8 mm, seitlicher Randabstand 20 mm, Bahnabstand automatisch

### Chromatographie

In der Horizontal-Entwicklungskammer, Laufstrecke 52 mm (60 mm vom unteren Rand)

- Flavonoide mit 5 mL Tetrahydrofuran – Toluol – Ameisensäure – Wasser 16:8:2:1
- Diterpene mit 5 mL Toluol – Ethylacetat 9:2
- Iridoide mit 5 mL Ethylacetat – Methanol – Wasser 77:15:8, mit Kammersättigung

### Derivatisierung

Mit der Chromatogramm-Tauchvorrichtung

- Flavonoide: Tauchen der erwärmten Platten in Naturstoffreagenz (0.5% in Ethylacetat) und anschliessend in Polyethylenglycol 400-Lösung (5% in Dichlormethan).
- Diterpene: Tauchen in 10%ige methanolische Schwefelsäure, erwärmen auf 105° C.
- Iridoide: Tauchen in 4-Dimethylaminobenzaldehyd-Reagenz (1% in 1N methanolischer HCl).



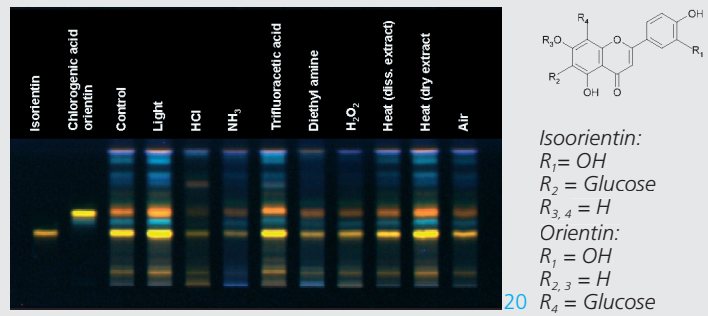
## Dokumentation und densitometrische Auswertung

Mit Video-Dokumentationssystem (Video-Store) unter UV 366 nm (Flavonoide), Weisslicht (lipophile Komponenten) und Weisslicht mit Kantenfilter 560 nm (Iridoide). Auswertung der Bilder durch Video-Densitometrie (VideoScan).

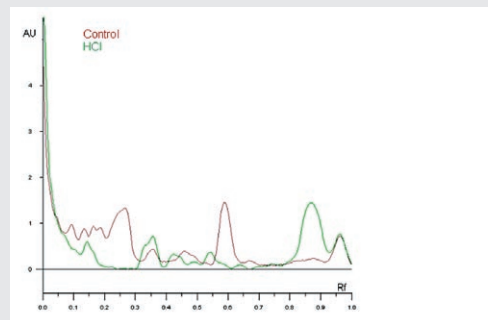
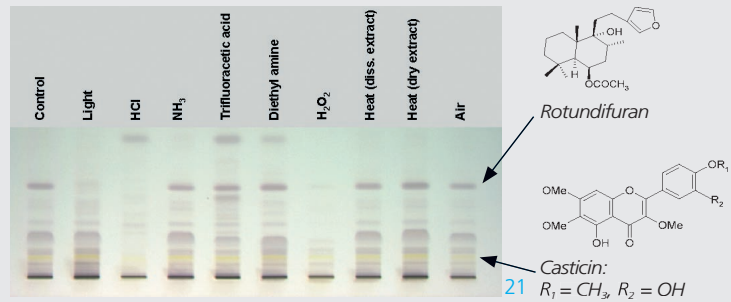
## Ergebnisse und Diskussion

Es wurden drastische Stressbedingungen gewählt, um mit Sicherheit Veränderungen im Extrakt herbeizuführen. Die Stabilität der verschiedenen untersuchten Stoffklassen ist sehr unterschiedlich. Die Stresstests ergaben wichtige Anhaltspunkte zu Lagerungsbedingungen und Haltbarkeit. Diterpene sind labiler, Flavonoide und Iridoide eher stabil. Das die Wirksamkeit mitbestimmende Diterpen Rotundifuran ist sehr lichtempfindlich und wird innerhalb weniger Tage abgebaut. Die Substanz ist auch empfindlich gegenüber Säure und Wasserstoffperoxid. Konzentrierte Salzsäure und Wasserstoffperoxid verändern alle Inhaltsstoffe der drei untersuchten Gruppen. Nur das lipophile Flavonoid Casticin ist in allen Stresstests stabil.

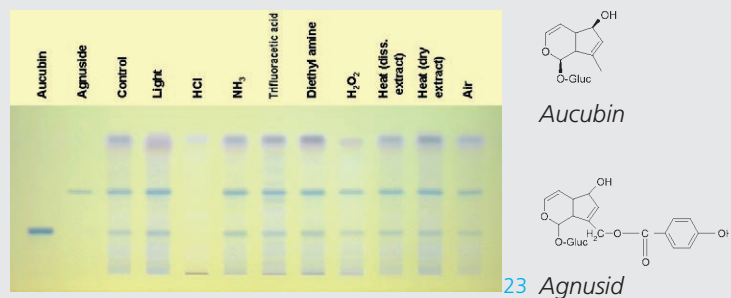
Mehr zu dieser Applikation erfahren Sie bei CAMAG (labnet@camag.com)



▲ Ergebnisse der Stresstests bei Flavonoiden unter UV 366 nm



▲ Ergebnisse der Stresstests bei Diterpenen: Chromatogramm unter Weisslicht und Densitogramm der überlagerten Bahnen 1 (Kontrollprobe) und 3 (Einwirkung von HCl)



▲ Ergebnisse der Stresstests bei Iridoiden unter Weisslicht mit Kantenfilter 560 nm

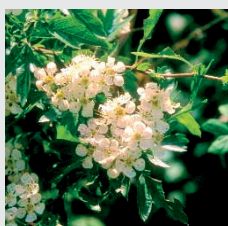
## Analytik von Flavonglykosiden in Weissdorn und Passionsblumenkraut



◀ Valeria Widmer

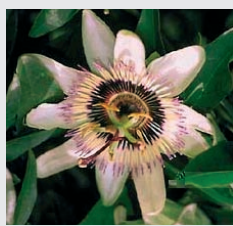
24

Frau Valeria Widmer hat ihre Diplomarbeit im CAMAG Labor gemacht in Kooperation mit der Universität Basel im Fach Pharmazeutische Biologie, betreut von Prof. Beat Meier und Prof. Willy Schaffner.



25

▲ Weissdorn



26

▲ Passionsblume

Extrakte von Weissdorn (*Crataegus monogyna* Jacq. und *Crataegus laevigata* Poiret) und Passionsblume (*Passiflora incarnata* L.) sind in vielen Fertigarzneimitteln enthalten. Die Gewährleistung der Qualität von Droge, Extrakt und Handelsprodukt ist eine wichtige Voraussetzung. Die planar-chromatographische Fingerprintanalyse wird in der Europäischen Pharmakopöe zur Identitätsprüfung der beiden Drogen eingesetzt. Die Beschreibung der Chromatogramme ist jedoch zu wenig spezifisch, um die Drogen sicher identifizieren zu können.

Als Teil der Arbeit wurden Trennsysteme auf HPTLC-Schichten entwickelt bzw. optimiert, die reproduzierbare Resultate liefern. Neben der sicheren Identifizierung kann auch die Qualität der Droge

bestimmt werden. Alle Flavonoide weisen ein ähnliches Grundgerüst auf, unterscheiden sich aber in Art und Anzahl der Substituenten und glykosidischen Bindungen. So kommen in Passionsblumenkraut ausschliesslich an einem C-Atom glykosylierte Flavonoide vor (Flavon-C-Glykoside), während in Weissdorn neben Flavon-C-Glykosiden auch O-Glykoside identifiziert wurden.

**Die zwei nachfolgend dargestellten, unabhängigen und reproduzierbaren Methoden sind der einheitlichen Methode zur Identifizierung beider Pflanzen gemäss Europäischer Pharmakopöe vorzuziehen. Die Detektion von Chrysin, eines umstrittenen Inhaltsstoffs von Passiflora ist planar-chromatographisch möglich.**

### Probenvorbereitung

Unterschiedliche Drogenmengen mit Methanol (ca. 1 g/10 mL) bei 65° C oder im Ultraschallbad bei Raumtemperatur extrahieren. Standards in Methanol lösen (ca. 0.1–0.6 mg/mL).

### Schicht

HPTLC-Platten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck) 10 × 10 cm und 20 × 10 cm (für Weissdorn und Passionsblume)

HPTLC-Platten Kieselgel RP-18 W, 10 × 10 cm (für Chrysin)

### Probenauftragung

Bandförmig mit DC-Probenautomat 4, Bandlänge 8 mm, 8 (10 × 10 cm Platte) oder 15 Bahnen (20 × 10 cm Platte), Auftragevolumen 2 µL, unterer Randabstand 8 mm, seitlicher Randabstand 20 mm, Bahnabstand automatisch

### Chromatographie

In der gesättigten Doppeltrogkammer, Laufstrecke 52 mm (60 mm vom unteren Rand)

- Weissdornextrakt (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) mit Ethylacetat – Methanol – Wasser – Ameisensäure 50:2:3:6
- Passionsblumenextrakt (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) mit Tetrahydrofuran – Toluol – Ameisensäure – Wasser 16:8:2:1
- Chrysin (RP-18 W) mit Tetrahydrofuran – Methanol – Wasser – Ameisensäure 4:6:14:1

## Derivatisierung

Erwärmte Platte mit der Chromatogramm-Tauchvorrichtung in Naturstoffreagenz (0.5% in Ethylacetat) tauchen. Nach dem Trocknen die Platte zur Stabilisierung in eine Polyethylenglycol 400-Lösung (5% in Dichlormethan) tauchen.

## Dokumentation

Mit Video Dokumentationssystem (VideoStore) unter UV 366 nm

## Ergebnisse und Diskussion

Im Vergleich zur Methode im Europäischen Arzneibuch liefern die optimierten bzw. neu entwickelten Methoden bessere Trennungen und eine signifikant höhere Reproduzierbarkeit von Platte zu Platte im Hinblick auf Sequenz, Intensität und Farbe der Zonen. Durch Aufstockungsexperimente wurde belegt, dass auf HPTLC-Platten RP-18 W Chrysin mit der vorgeschlagenen Methode eindeutig detektiert werden kann. Jedoch enthielt keine der geprüften Drogen Chrysin. Die grosse Flexibilität der Planar-Chromatographie in Bezug auf Kombinationsmöglichkeiten von stationärer und mobiler Phase kam den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen besonders zugute.

	Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>O-Glykoside</b>	Hyperosid	O-gal	H	H	OH	OH
	Rutin	O-rut	H	H	OH	OH
<b>C-Glykoside</b>	Vitexin	H	H	glc	H	OH
	Isovitexin	H	glc	H	H	OH
	Vitexin-2''-O-rhamnosid	H	H	glc-rha	H	OH
	Isovitexin-2''-O-glucosid	H	soph	H	H	OH
	Orientin	H	H	glc	OH	OH
	Isoorientin	H	glc	H	OH	OH
	Isoorientin-2''-O-glucosid	H	soph	H	OH	OH
<b>Aglyka</b>	Chrysin	H	H	H	H	OH

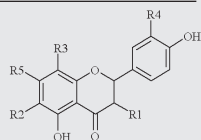
glc = β-D-glucosyl

rut = rutinose (α-rhamnosyl-1-6-β-D-glucosyl)

gal = β-D-galactosyl

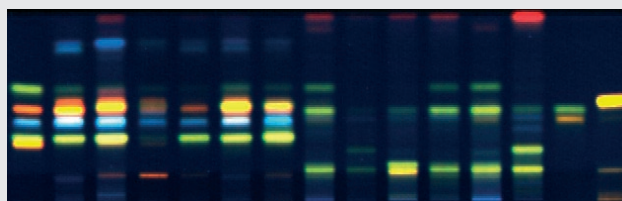
soph = 2-(β-D-Glucopyranosyl)-D-glucopyranose

rha = α-L-rhamnosyl



▲ Strukturen der Flavonoide in Weissdorn und Passionsblumenkraut

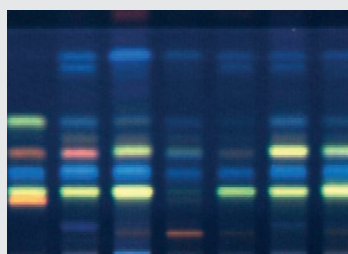
Mehr zu dieser Applikation erfahren Sie bei CAMAG (labnet@camag.com)



27

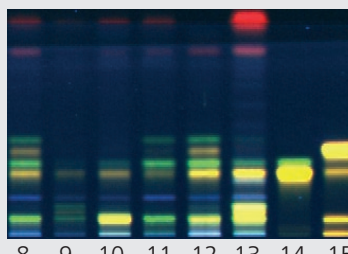
▲ Methode der Ph. Eur. 3 für Weissdorn und Passionsblumenkraut, mobile Phase: Ethylacetat – Ethylmethylketon – Ameisensäure – Wasser 5:3:1:1

Bahn 1: Rutin, Vitexinrhamnosid, Chlorogensäure, Hyperosid und Vitexin (von unten nach oben); Bahnen 2–7: Drogen *C. monogyna*, *C. monogyna*, *C. laevigata*, *C. laevigata*, *C. herba*, *C. Trockenextrakt*; Bahnen 8–13: Drogen *P. incarnata*, *P. incarnata*, *P. incarnata*, *P. incarnata*, *P. incarnata*, *P. caerulea*; Bahn 14: Isoorientin und Isovitexin; Bahn 15: Isoorientinglucosid, Isoorientin und Orientin



28

▲ Optimierte Methode für Weissdorn  
Bahn 1–7 analog Bild zuvor



29

▲ Optimierte Methode für Passionsblumenkraut  
Bahnen 8–15 analog Bild oben



30

← Chrysin

▲ Nachweis (Aufstockung) von Chrysin in Passionsblumenkraut  
Bahn 1: Rutin, Hyperosid, Vitexinrhamnosid, Vitexin, Chlorogensäure; Bahn 2: Chrysin, Orientin; Bahn 3: Isovitexin, Isoorientin; Bahn 4: *P. caerulea*; Bahn 5: *P. caerulea* aufgestockt mit Chrysin; Bahn 6: *P. caerulea*; Bahn 7: *P. caerulea* aufgestockt mit Standard Chrysin



# Neues von

# winCATS

Planar Chromatography Manager

## Eine universelle Software-Plattform für die Planar-Chromatographie

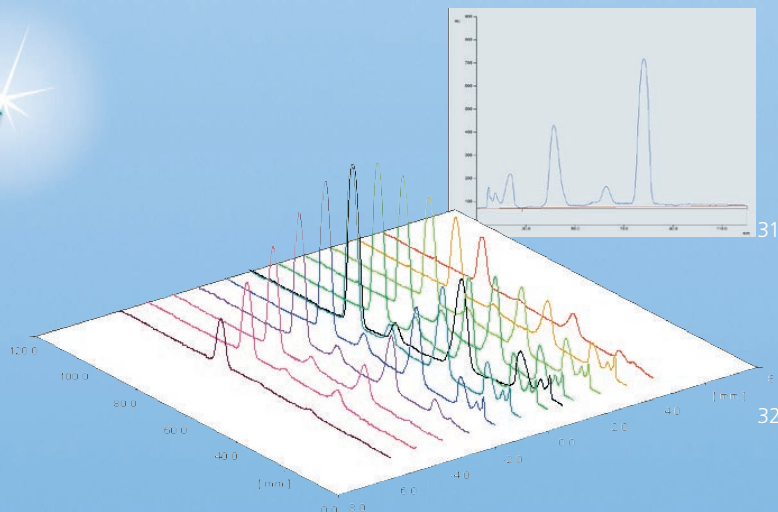
Mit winCATS – Planar Chromatography Manager organisieren Sie mittels einer einzigen Software den gesamten Ablauf Ihrer Methode. Sie steuern die entsprechenden CAMAG Geräte und überwachen und protokollieren den gesamten Ablauf. winCATS bietet Ihnen eine angenehme, leicht erlernbare Bedienungsweise über ein und dieselbe Plattform für folgende Geräte:

- Probenauftragegeräte Linomat 5, DC-Probenautomat III und DC-Probenautomat 4
- NEU: Automatisierte Mehrfachentwicklung (AMD2)
- TLC-Scanner 3
- Dokumentationssystem mit Digitalkamera
- NEU: Dokumentationssystem mit Videokamera

winCATS übertrifft inzwischen den Funktionsumfang der Vorgängersoftware CATS bei weitem. Es sind zur Basissoftware folgende winCATS Optionen erhältlich:

- Quantitative Auswertung
- Zweiwellenlängen-Scan
- Mehrwellenlängen-Scan
- Spektren-Bibliothek
- NEU: Bahnoptimierung
- NEU: ATS4 FreeMode
- Scanner Qualifizierung

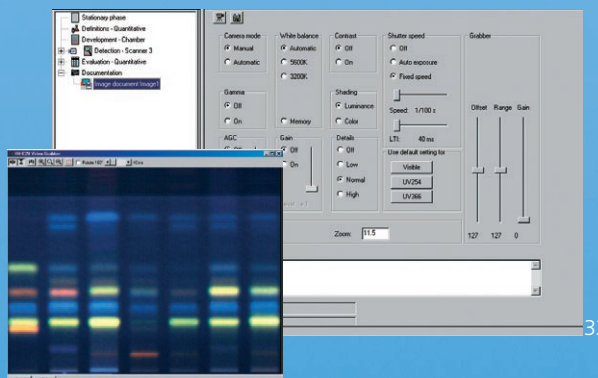
In Bezug auf Gerätesteuerung, Datenerfassung, Auswertung und Dokumentation bleiben kaum noch Wünsche offen.



▲ Messkurven der Bahnoptimierung, Bild unten in 3D-Ansicht

### winCATS – angepasst an Kundenbedürfnisse

Das CAMAG Entwicklungsteam implementiert laufend neue, von unseren Kunden geforderte Features in winCATS. Zum Beispiel können mit der neuesten Version nun auch AMD2 und die Videokamera Hitachi HV-C20 kontrolliert werden. Die quantitative Auswertung wurde um die Michaelis-Menten Regression und weitere Berechnungsroutinen ergänzt. An der Option 21 CFR Part 11 »compliance ready« wird intensiv gearbeitet; sie wird noch im Jahre 2003 erhältlich sein.



▲ Videokamera: Livebild und Parametermaske

### Einfaches Updaten

Die neueste Version von winCATS können Sie über [www.camag.com](http://www.camag.com) downloaden. Die winCATS Lizenz berechtigt Sie zum kostenlosen Update-Service für die Dauer eines Jahres. Falls Sie noch mit DOS-CATS arbeiten, erscheint es nun an der Zeit, auf winCATS umzusteigen. Verlangen Sie von CAMAG ein Angebot.

Für weitere Informationen können Sie die neue Produktinformation über TLC-Scanner 3 – winCATS von unserer Homepage [www.camag.com](http://www.camag.com) herunterladen.