

## Oszillographisches und chromatographisches Verfolgen der gestörten Stabilität des Lobelins

V. PARRÁK, E. RADEJOVÁ, F. MACHOVIČOVÁ

*Staatliches Institut für Arzneimittelprüfung,  
Bratislava*

Die gewonnenen experimentellen Resultate sprechen dafür, daß die oszillographische Methode und die Dünnschichtchromatographie zum Verfolgen der gestörten Stabilität des Lobelins herangezogen werden kann. Die Methoden ermöglichten:

1. qualitativ die konstituell nahen Stoffe — Lobelin, Lobelanin und Lobelanidin — zu unterscheiden,

2. den Verlauf der sich abspielenden Reaktion zu verfolgen, — Entstehung des Azetophenons und anderer Degradationsprodukte und zugleich auch den Elektrodenvorgang nachzuweisen,

3. praktische Anwendung der oszillographischen Polarographie beim Differenzieren des Degradationsproduktes — Azetophenons — neben Lobelin im Konzentrationsbereich 0,2—0,3 % und der Dünnschichtchromatographie zur Differenzierung des Azetophenons und anderer Degradationsprodukte.

Die Kenntnisse über die Haltbarkeit der Arzneimittel und Arzneizubereitungen sind noch ungenügend. Deshalb muß gefordert werden, daß schon bei der wissenschaftlichen Entwicklung neuer Arzneisubstanzen, aber insbesondere bei Industrie-Präparaten dieser Angelegenheit eine viel größere Bedeutung beigemessen werden soll.

Die oszillographische Polarographie kann — wie es die experimentellen Ergebnisse bestätigten — zum Verfolgen der Zersetzungsvorgänge zum Beispiel in verschiedenen Arzneiformen in Abhängigkeit von verschiedenen negativ wirkenden Faktoren wie: *a)* Luftsauerstoff, *b)* Einfluß des Lichtes, *c)* Veränderung der Temperatur, *d)* pH des Milieus, verwendet werden.

Mit dem Studium der Zersetzung verschiedener Stoffe auf dem Wege der oszillographischen Polarographie befaßten sich J. Heyrovský [1, 2], M. Heyrovský [3], R. Kalvoda [4—6], F. Šantavý [7, 8], L. Molnár [9—11], G. Dušinský [12—14], M. Maturová [15, 16], H. Berg [17, 18] und andere.

Die von uns schon durchgeführten Untersuchungen [19—23] wiesen darauf hin, daß die oszillographische Polarographie z. B. zum Verfolgen der Hydrolyse allein und event. darauffolgender Oxydation, der Nitrierung und auch zur Konstitutionsaufklärung herangezogen werden kann.

Mit der chromatographischen Trennung der Lobelia-Alkaloide befaßten sich mehrere Autoren [24—28], aber sie verfolgten nicht die Beschädigung der Stabilität des Lobelins in verschiedenen Arzneiformen.

In der Gegenwart wird das Lobelin nicht aus Pflanzen isoliert, sondern

es wird ausschließlich nur synthetisch hergestellt. Interessant ist, daß auch bei der Synthese, also nicht nur bei der Isolierung aus *Lobelia inflata* ein Gemisch der Basen Lobelin, Lobelanin und Lobelanidin gewonnen wird, wodurch nicht nur beim Extrahieren aus dem pflanzlichen Material, aber auch bei der Synthese die gegenseitige Trennung der drei genannten Basen das Hauptproblem ist [29, 30].

In dieser Arbeit verfolgten wir oszillopolarographisch und chromatographisch die gestörte Stabilität des auf einem Piperidinkern gebauten Alkaloids — Lobelin. Zugleich wurde dieses Verfahren zur Unterscheidung konstituell naher Stoffe herangezogen.

### Experimenteller Teil

Die polarographischen Untersuchungen wurden auf dem Polarograph Heyrovský Typ LP 60 durchgeführt, die oszillopolarographischen Messungen wurden auf dem Polaroskop P 576 vorgenommen. Die Konstanten wurden schon angeführt [22].

Zur Chromatographie wurden Kammern verwendet, in welche Filtrierpapier eingebettet wurde, um eine gründliche Sättigung zu erreichen. Es wurde auf Glasplatten in Format 10 × 15 cm gearbeitet. Als Adsorptionsmaterial wurde Kieselgel aus VÚPL\* Kerngröße 0,05—0,1 mm, maximale Wassersorption 85 % verwendet. Die Adsorptionsschicht wurde folgendermaßen hergestellt: 25 g Kieselgel + 5 g Gips + 80 bis 90 g Wasser. Der ziemlich dünnflüssige Brei wurde 1 Minute lang bearbeitet, dann mit Hilfe eines Streichgerätes auf Glasplatten aufgetragen und bei Laboratoriumtemperatur getrocknet. Nach dem Auftragen von 20—30 µg der Probe wurde in gesättigten Kammern entwickelt. Als Fließmittel wurde Chloroform—Benzen (1 : 1) mit Ammoniak gesättigt, verwendet, wobei noch eine Schale mit Ammoniak separat in die Kammer hineingestellt wurde. Nach Trocknen der Platten detegierten wir mit Dragendorff-Reagens.

Zur Unterscheidung des Azetophenons neben Lobelin arbeiteten wir mit Aluminiumoxid als Sorptionsmittel. Das alkalische Aluminiumoxid (Lachema) hatte eine Kerngröße von 0,06 mm und Aktivität IV nach Brockmann.

Die Adsorptionsschicht wurde ohne Bindemittel durch ein einfaches Aufstreuen und Glätten mit einem Glasstäbchen vorbereitet. Als Fließmittel wurde Benzen verwendet. Zur Entwicklung wurde Dragendorff-Reagens, wie auch 2,4-Dinitrophenylhydrazin nach K. Macek verwendet. Lobelin reagierte mit Dragendorff-Reagens und Azetophenon gab mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin intensive gelb-orange Flecke.

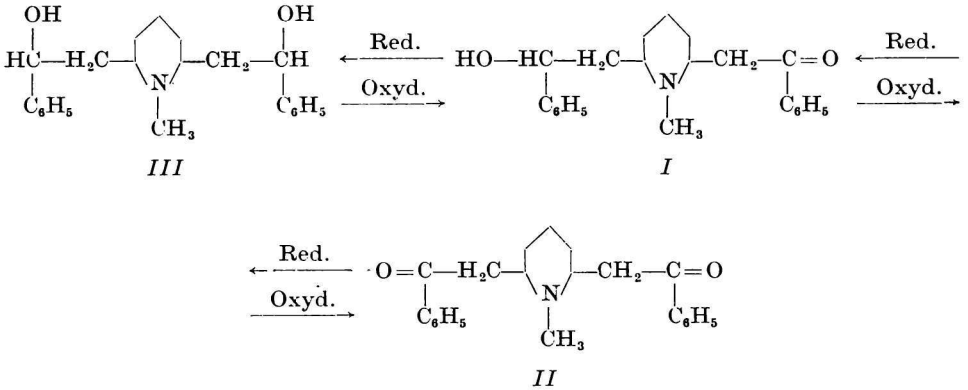
Die Adsorptionskurven wurden mit dem Universal-Spektrophotometer Carl Zeiss, Jena, gemessen. Es wurden Quarzküvetten von  $\varnothing$  1 cm verwendet.

### Ergebnisse

Lobelin (*I*) und Lobelanidin (*III*) sind Reduktionsprodukte des Lobelanins (*II*): (Schema 1). Wird Lobelin oxydiert, so bildet sich das Diketon Lobelanin, durch Reduktion ein Dialkohol — Lobelanidin. Lobelin mit Lobelanin und Lobelanidin bilden den Hauptteil des Alkaloidgehaltes der Pflanze *Lobelia inflata*. Die oszillopolarographischen Unter-

\* VÚPL, Prag von Ing. J. Pitra, C. Sc.

Schema 1



suchungen wurden in 1 M-LiOH vorgenommen (Abb. 1). Lobelin hatte  $Q$ -Werte: 0,68; 0,77; 0,90 kathod. und 0,23; 0,50 (0,60) anod. Lobelanin: 0,64; 0,85 kathod. und 0,25; 0,50 anod. Lobelanidin: (0,43); 0,72 kathod. und 0,50 anod.

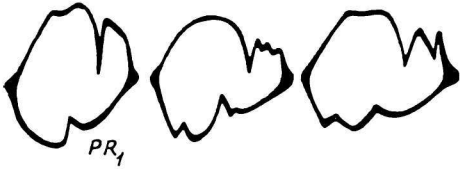


Abb. 1.  $dE/dt = f(E)$  Kurven des Lobelins (I), Lobelanins (II) und Lobelanidins (III) in 1 M-LiOH.

Die Konzentration aller drei Alkaloide war  $1 \cdot 10^{-3}$  M.

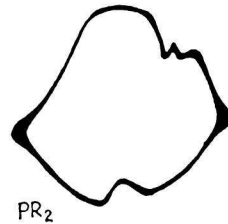


Abb. 2.  $dE/dt = f(E)$  Kurve des Lobelins in 1 M-LiCl.

Konzentration des Lobelins  $10^{-4}$  M.

Bei steigender Konzentration des Lobelins von  $5 \cdot 10^{-4}$  M auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^{-3}$  M in 1 M-LiOH vertieft sich markant der kathodische Einschnitt  $Q$  0,68 und es bildet sich ein weiterer kathodischer Einschnitt  $Q$  0,90 und ein weniger entwickelter Einschnitt mit  $Q$  0,77, sowie zwei anodische Einschnitte mit  $Q$  0,23 und 0,50. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß dieses alkalische Milieu beim oszillpolarographischen Studium verwendet werden kann, da nicht einmal nach 20 Minuten Veränderungen zum Vorschein kamen.

Auch das neutrale Milieu (Abb. 2) kann zur Unterscheidung des konstituell nahen Stoffes herangezogen werden, besonders das 1 N-LiCl, in welchem sich das Lobelin am interessantesten verhält. Auf der kathodischen Seite der Kurve bilden sich zwei gut sichtbare Einschnitte mit  $Q$  0,72; 0,83 und auf der anodischen Seite eine Vertiefung. Die Form und Größe der Einschnitte veränderte sich in diesem Milieu nicht einmal nach 50 Minuten.

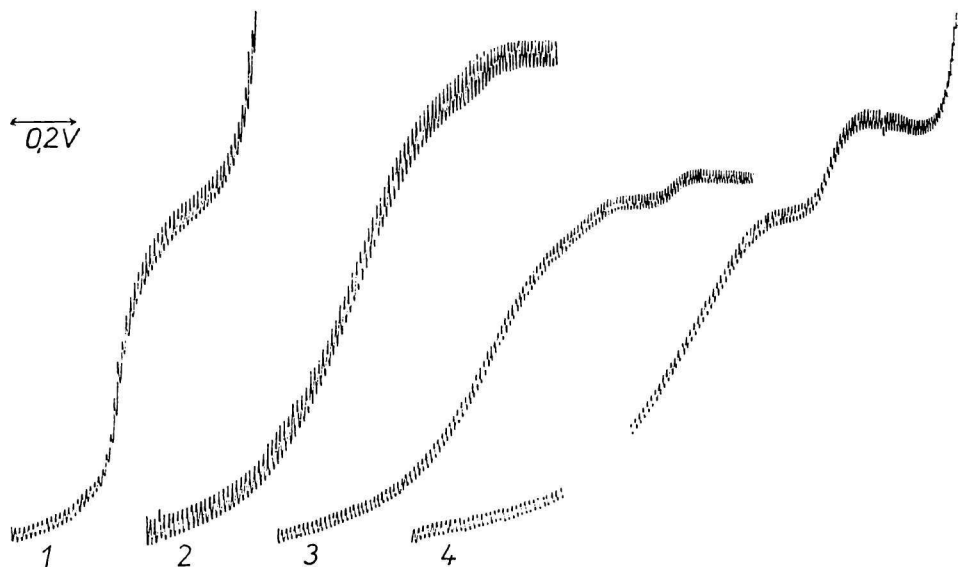


Abb. 3. Polarographische Kurven des  $5 \cdot 10^{-4}$  M Lobelins in Britton—Robinson Puffer.

1. pH 2,8; 2. pH 10 nach 2 Stunden bei normaler Temperatur; 3. pH 10 nach 24 Stunden bei normaler Temperatur; 4. pH 10 nach 15 Minuten langem Erhitzen bei 90 °C.

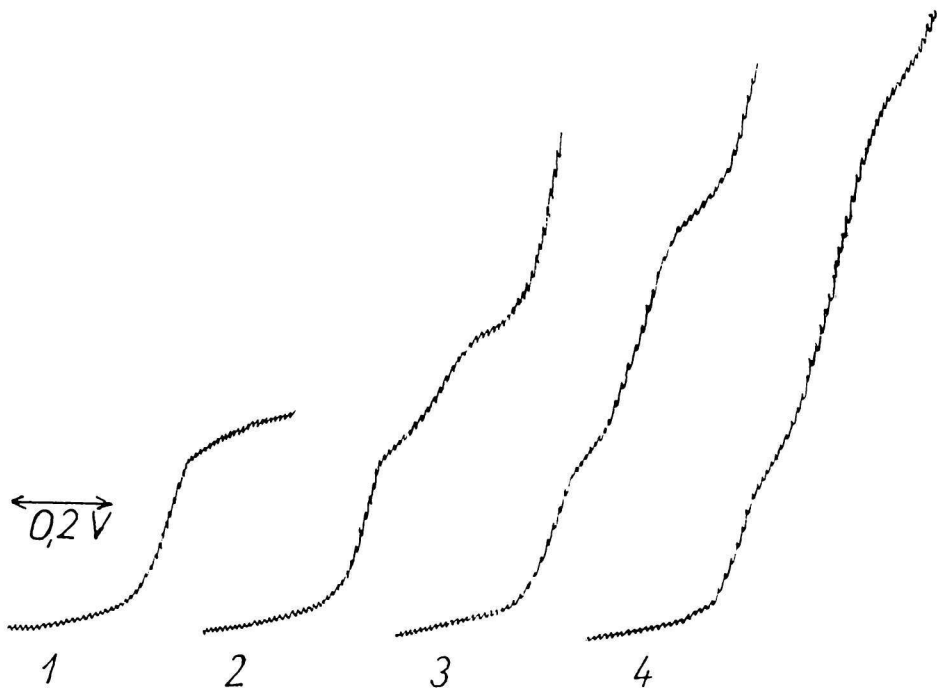


Abb. 4. Polarographische Kurven des Lobelins und seines Zersetzungsproduktes: Azetophenon in Britton—Robinson Puffer, pH 6,8.

1.  $10^{-4}$  M Lobelin; 2.  $5 \cdot 10^{-4}$  M Lobelin; 3.  $2 \cdot 10^{-6}$  M Azetophenon; 4.  $5 \cdot 10^{-4}$  M Lobelin; 5.  $10^{-6}$  M Azetophenon; 6.  $5 \cdot 10^{-4}$  M Lobelin.

Auf der Abbildung 3 und 4 ist das polarographische Verfolgen der Bildung des Degradationsproduktes — Azetophenon — dargestellt. Aus gewonnenen Ergebnissen geht hervor, daß sich beim Übergang ins alkalische Milieu und bei steigender Temperatur Azetophenon besonders schnell bildet.

Auf der Abbildung 5 ist das oszillographische Verhalten des Azetophenons neben Lobelin in Britton—Robinson Puffer (pH 6,5) veranschaulicht. Bei erhöhter Konzentration des Azetophenons erhalten wir einen Einschnitt vom  $Q$  0,75. Dieser nähert sich sichtbar zur Verbindungslinie beider Endpunkte der oszillographischen Kurve.

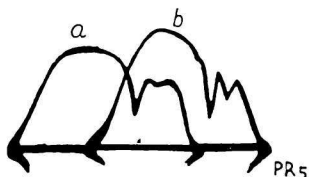


Abb. 5.  $dE/dt = f(E)$  Kurven des Azetophenons neben Lobelin in Britton—Robinson Puffer, pH 6,5. Konzentration des Lobelins  $5 \cdot 10^{-4}$  M, des Azetophenons: a)  $2 \cdot 10^{-6}$  M; b)  $2 \cdot 10^{-5}$  M.

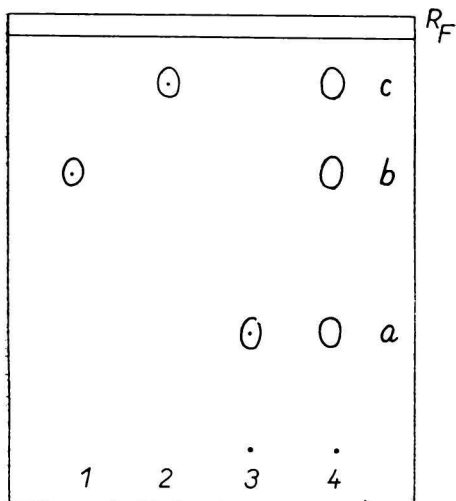


Abb. 6. Kieselgel + 20 % Gips, System: Chloroform—Benzen (1 : 1) mit Ammoniak (25 %) gesättigt, Detektion: Dragendorff-Reagens. Bemerkung: Azetophenon hat den  $R_F$ -Wert 0,95.

a) 0,34 Lobelanidin; b) 0,65 Lobelin; c) 0,84 Lobelanin.

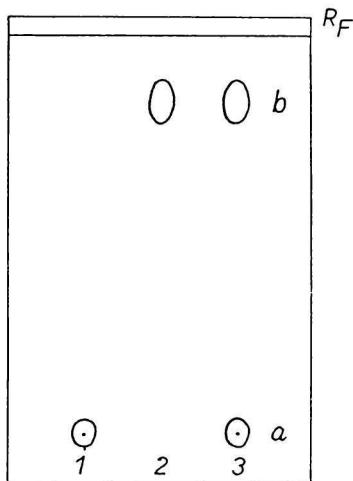


Abb. 7. Alkalisches Aluminiumoxid — Aktivität IV nach Brockmann—Schodder, System: Benzen, Detektion: Dragendorff-Reagens, 2,4-Dinitrophenylhydrazin. a) 0,00 Lobelin HCl; b) 0,80 Azetophenon.

Die Kieselgel-Dünnschichtchromatographie erwies sich (Abb. 6) zur Trennung der drei Lobelia-Alkaloide als besonders vorteilhaft. Lobelin hatte einen  $R_F$ -Wert 0,65, Lobelanin 0,84 und Lobelanidin 0,34. Diese drei Alkaloide wurden als Basen oder Salze aufgetragen und es zeigte sich kein wesentlicher Einfluß auf die Form und  $R_F$ -Werte der Flecke.

Die Methode der Dünnschichtchromatographie bewährte sich gut (Abb. 7) auch zur Trennung und Unterscheidung des Azetophenons neben Lobelin. Im gegebenen Falle arbeiteten wir mit Aluminiumoxid als Sorptionsmittel, Benzen als Fließmittel wurde mit Dragendorff-Reagens und 2,4-Dinitrophenylhydrazin (nach K. Macek) detegiert. Die  $R_F$ -Werte von Lobelin waren 0,00 und Azetophenon 0,80.

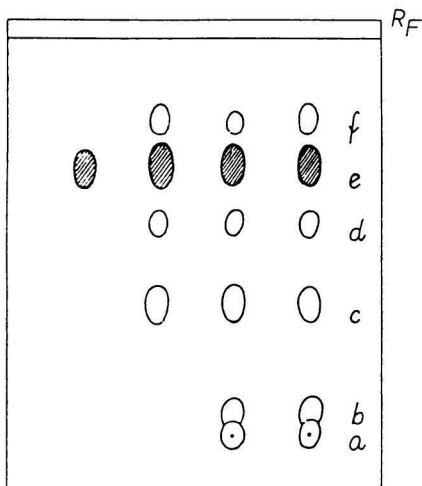
Beim qualitativen Untersuchen gelb verfärbter Injektionslösungen erhielten (Abb. 8) neben Lobelin noch weitere 5 Flecke in folgender Reihe:  $x_1 - R_F$  0,00;  $x_2 - R_F$  0,05;  $x_3 - R_F$  0,34;  $x_4 - R_F$  0,55;  $x_5 - R_F$  0,84.

Abb. 8. 1. Lobelin HCl — farblose Injektionslösung; 2. Lobelin HCl — alte Injektionslösung (8-jährige)-farblose; 3. Lobelin HCl — alte Injektionslösung (8-jährige)-gelb verfärbt; 4. Modell-Zersetzung: 6 % Lobelin HCl in methanolischer Lösung, bei 100 °C 15' erhitzt, dann 24 Stunden lang stehen gelassen bis zur Färbung; Kieselgel + 20 % Gips, System: Benzen—Chloroform (1 : 1) mit Ammoniak (25 %) gesättigt, Detektion: Dragendorff-Reagens. Bemerkung: Azetophenon hat den  $R_F$ -Wert 0,95,

Detektion mit

2,4-Dinitrophenylhydrazin.

a) 0,00  $x_1$ ; b) 0,05  $x_2$ ; c) 0,34  $x_3$ ; d) 0,55  $x_4$ ;  
e) 0,65 Lobelin; f) 0,84  $x_5$ .



Beim Vergleich der Ergebnisse ist ersichtlich, daß der  $R_F$ -Wert des  $x_3$ -Stoffes dem  $R_F$ -Wert des Lobelanidins und des  $x_5$ -Stoffes dem  $R_F$ -Wert des Lobelanins ähnelt. Die restlichen drei Stoffe gelang es nicht chromatographisch zu identifizieren.

Die UV-Absorptionskurven der Eluate gaben Maxima bei 243 nm; sie stimmen also mit Lobelin überein (Abb. 9), wobei sie durch einen hypochromen Effekt nicht charakte-

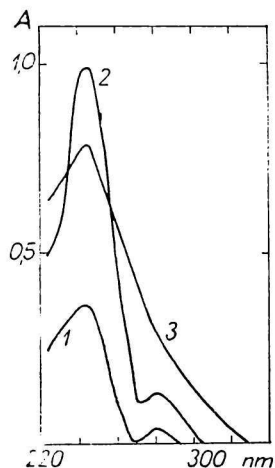


Abb. 9. Kurven des UV-Spektrums der äthanolischen Eluate durch chromatographische Dünnschichttrennung erhaltener Stoffe.

1. Kurve des Eluates von 4 unterhalb des Lobelins stationierten Flecken ( $R_F$  0,0; 0,05; 0,34; 0,55) in 1 M-LiCl-Lösung; 2. Kurve des eluierten Lobelins ( $R_F$  0,65); 3. Kurve des eluierten Fleckes oberhalb des Lobelins ( $R_F$  0,84).

risiert waren. Da die einzelnen aus der Dünnschicht eluierten Flecke keine markanten Maxima zeigten, haben wir spektrophotometrische Messungen in UV-Gebiet eines Gemisches der Eluate von vieren — unterhalb des Lobelins stationierten Flecken (mit  $R_F$ -Werten 0,00; 0,05; 0,34; 0,55), und des eluierten Fleckes oberhalb des Lobelins ( $R_F$  0,84) wie auch des Lobelins allein ( $R_F$  0,65) vorgenommen. Eluiert wurde mit Äthanol. Diese Arbeitsweise wählten wir deshalb, da wir auch beim Auftragen von 100  $\mu\text{g}$  Stoffes die für das Messen benötigte Menge der Zersetzungsprodukte nicht gewinnen konnten.

Nach dem Abdampfen der zubereiteten Eluate und wiederholter Kristallisation im Äthanol gewannen wir nadelförmige Kristalle, welche bei 180—185 °C schmelzten.

Auf der Abbildung 10 sind die Oszillogramme der äthanolischen Eluate dargestellt. Um Ungenauigkeiten vorzubeugen wurde auch ein Oszillogramm vom äthanolischen Eluat einer solchen Menge des Kieselgels, welche der Menge des Kieselgels mit den Flecken des Degradationsproduktes entsprach, aufgenommen (Oszillogramm *a*). Schließlich wurde die oszillographische Kurve eines Gemisches der Eluate von oberhalb des Lobelins stationierten Flecken (mit  $R_F$ -Werten 0,0; 0,05; 0,34; 0,55) in 1 M-LiCl ermittelt. Der Einschnitt auf der kathodischen Seite hat einen  $Q$ -Wert 0,72.

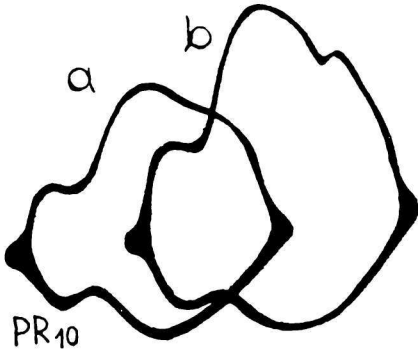


Abb. 10.  $dE/dt = f(E)$  Kurve.

a) Eluat der Kieselgelschichte als Vergleichslösung; b) Eluat von 4 unterhalb des Lobelins stationierten Flecken ( $R_F$  0,0; 0,05; 0,34; 0,55) in 1 M-LiCl.

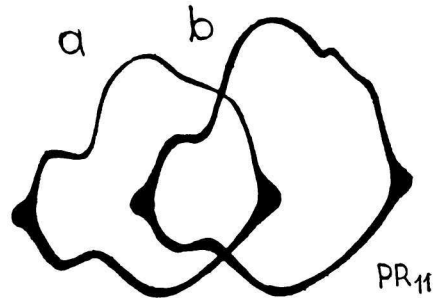


Abb. 11.  $dE/dt = f(E)$  Kurven.

a) Eluat der Kieselgelschichte als Vergleichslösung; b) Eluat des Fleckes oberhalb des Lobelins ( $R_F$  0,65) in 1 M-LiCl.

Auf der Abbildung 11 sind die Ergebnisse des Eluates vom oberhalb des Lobelins stationierten Fleckes mit  $R_F$  0,84 veranschaulicht. Der kathodische Einschnitt hat einen  $Q$ -Wert 0,72, so wie auf dem Oszillogramm des Lobelins im LiCl-Milieu.

## Diskussion

An Hand der verschiedenen  $Q$ -Werte wie auch des Charakters der Einschnitte ist es möglich oszillographisch Lobelin, Lobelanin und Lobelanidin separat zu verfolgen.

Bei unserer Arbeit stellten wir fest, daß das Degradationsprodukt in Injektionslösungen oder Tabletten in einer Konzentration von 0,2—3 % erscheinen

kann und seine Bildung von der Temperatur, Zeit, gegebenenfalls auch vom Lichte abhängig ist.

Die klassische Polarographie ermöglichte in Britton—Robinson Puffer (pH 6,8) die Bildung des Degradationsproduktes — Azetophenon — in einem Konzentrationsbereich von  $2 \cdot 10^{-6}$  M bis  $6 \cdot 10^{-6}$  M zu verfolgen, wobei die Ausscheidung beim Halbstufenpotential von  $-1,3$  V erfolgt.

Die Untersuchung des Azetophenons allein in 1 M-LiOH auf einer Zeitbase von 10—60 Minuten zeigte, daß es keinen wesentlichen Veränderungen unterliegt. In Britton—Robinson Puffer (pH 5, 6, 7) gibt dieses Degradationsprodukt keine so typischen Einschnitte wie in 1 M-LiOH. Die beste Möglichkeit einer oszillographischen wie auch polarographischen Unterscheidung des Degradationsproduktes — Azetophenon — neben Lobelin bietet sich in Britton—Robinson Puffer bei einem pH von 6,8.

Die Kieselgel-Dünnschichtchromatographie erwies sich zur Trennung der drei Lobelia-Alkaloide als besonders vorteilhaft. Lobelin hatte einen  $R_F$ -Wert 0,65, Lobelanin 0,87 und Lobelanidin 0,28. Diese drei Alkaloide wurden als Basen oder Salze aufgetragen und es zeigte sich kein wesentlicher Einfluß auf die Form und auf den  $R_F$ -Wert der Flecke.

#### OSCILOPOLAROGRAFICKÉ A CHROMATOGRAFICKÉ SLEDOVANIE PORUŠENIA STABILITY LOBELÍNU

V. Parrák, E. Radějová, F. Machovičová

Štátny ústav pre kontrolu liečiv,  
Bratislava

Oscilopolarograficky a chromatograficky sa skúmal lobelín a jemu štruktúrne chemicky blízke látky, ako je lobelanín a lobelanidín. Opisuje sa dynamické štiepenie skúmaných látok a identifikácia štiepených produktov vo farmaceutických preparátoch.

#### ОСЦИЛОПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАРУШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЛОБЕЛИНА

В. Паррак, Е. Радейова, Ф. Маховичова

Государственный институт для контроля лекарств,  
Братислава

Лобелин и близкие ему по строению вещества лобеланин и лобеланидин исследовались осциллополярографически в комбинации с хроматографией. Далее, произведено динамическое изучение степени нарушенной устойчивости лобелина в разных лекарственных формах.

Preložil I. Smoleř



## LITERATUR

1. Heyrovský J., *Čs. farm.* **2**, 403 (1953).
2. Heyrovský J., *Collection Czech. Chem. Commun.* **18**, 749 (1953).
3. Heyrovský M., *Chem. zvesti* **16**, 338 (1962).
4. Kalvoda R., *Čs. farm.* **3**, 124 (1954).
5. Kalvoda R., *Pharmazie* **11**, 101 (1956).
6. Kalvoda R., Budnikov G., *Collection Czech. Chem. Commun.* **28**, 838 (1963).
7. Šantavý F., *Čas. čs. lékař. wissenschaftl. Beilage* **57**, 109 (1944).
8. Šantavý F., *Čas. čs. lékař. wissenschaftl. Beilage* **56**, 1 (1943).
9. Molnár L., Bauer Š., *Chem. zvesti* **7**, 289 (1953).
10. Molnár L., Molnárová K., Benická E., *Chem. zvesti* **14**, 783 (1960).
11. Molnár L., Molnárová K., *Pharmazie* **14**, 575 (1959).
12. Dušínský G., *Čs. farm.* **4**, 400 (1955).
13. Dušínský G., *Chem. zvesti* **9**, 556 (1955).
14. Dušínský G., *Chem. zvesti* **14**, 764 (1960).
15. Maturová M., Tschu Schun, Čtvrtník J., Šantavý F., *Collection Czech. Chem. Commun.* **25**, 3321 (1960).
16. Maturová M., *Chem. zvesti* **16**, 375 (1962).
17. Berg H., König K. H., *Krebsforsch.* **62**, 495 (1958).
18. Berg H., *Chem. zvesti* **16**, 375 (1962).
19. Parrák V., *Pharmazie* **11**, 591 (1956).
20. Parrák V., Janíková E., *Farmácia* **29**, 277 (1960).
21. Parrák V., Mohelská O., Machovičová F., *Pharm. Zentralhalle* **100**, 504 (1961).
22. Parrák V., Radějová E., *Chem. zvesti* **16**, 380 (1962).
23. Parrák V., Horák F., Radějová E., *Farm. obzor* **31**, 426 (1962).
24. Fučík K., Tichý R., *Chem. listy* **47**, 1527 (1953).
25. Steinegger E., Ochsner F., *Pharm. Acta Helv.* **31**, 65 (1956).
26. Heřmánek S., Schwarz V., Čekan Z., *Pharmazie* **16**, 566 (1956).
27. Teichert K., Mutschler E., Rochelmayer H., *Dtsch. Apotheker-Ztg* **100**, 283 (1960).
28. Stamm H. H., Tauber E., *Arch. Pharm.* **294**, 66, 794 (1961).
29. Staněk J., *Alkaloidy*, 81. Nakladatelství ČSAV, Praha 1957.
30. Boit H. G., *Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 1960*. Akademie-Verlag, Berlin 1961.

Eingegangen am 18. September 1963