

CHROM. 8448

## Note

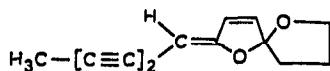
### Einfache und schnelle Bestimmung der *cis*- und *trans*-Spiroäther in *Matricaria chamomilla* mit der Flüssigchromatographie

HEINRICH GLASL

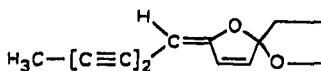
Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, Karlstr. 29, D 8000 München 2 (B.R.D.)

(Eingegangen am 26. Mai 1975)

Von den beiden in der Kamille (*Matricaria chamomilla* L.) enthaltenen isomeren *cis*- und *trans*-Spiroäthern (*cis*- und *trans*-En-in-dicycloäther)<sup>1</sup> scheint nur die *cis*-Form spasmolytische und antiphlogistische Wirkung zu besitzen<sup>2</sup>. Obwohl die *trans*-Form in den meisten Drogen nur in geringerer Konzentration vorhanden ist<sup>2</sup>, ist für eine Wertbestimmung der Kamillendroge und ihrer Zubereitungen eine quantitative Bestimmung sowohl des *cis*-Spiroäthers als auch des *trans*-Spiroäthers erforderlich.



*cis*-Spiroäther



*trans*-Spiroäther

Diese Möglichkeit war bisher nur über eine dünnschichtchromatographische Auftrennung und anschließende photometrische Bestimmung<sup>3</sup> gegeben, da sich diese beiden Verbindungen bis jetzt nicht gaschromatographisch trennen lassen<sup>4</sup>. Da diese Methode jedoch sehr viel Zeit in Anspruch nimmt, haben wir versucht, mit Hilfe der Flüssigchromatographie mit Fertigsäulen Merck eine einfachere und schnellere Methode zu finden, diese isomeren Spiroäther zu trennen und gleichzeitig mit einem UV-Detektor das quantitative Mengenverhältnis dieser beiden Verbindungen zu bestimmen. Zusammen mit einem von uns in jüngster Zeit neu vorgeschlagenen gaschromatographischen Analysenverfahren<sup>4</sup>, bei dem der Gesamtgehalt dieser Verbindungen ermittelt wird, lässt sich dann der Gehalt der einzelnen Spiroäther berechnen.

#### EXPERIMENTELLES

##### Apparatur

Säule: Fertigsäule Merck Gr. A, Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt, B.R.D.); Elutionsmittel: *n*-Hexan p.a.–Chloroform p.a. (6:4); Vordruck: 1.7 atü; Durchfluss: 65 ml/h; Detektion: UV 254 nm (Model 151, Altex Scientific, Berkeley, Calif., U.S.A.); Range: 2.56, 1.28, 0.64; Eingespritzte Menge: Entsprechend ca. 1–6 µg Spiroäthergemisch.

Der Flüssigkeitsdruck wurde durch ein direktes Drucksystem erzeugt<sup>5</sup>, wobei wir als inertes Gas nachgereinigten Stickstoff und als Druckbehälter direkt eine Lösungsmittelflasche Merck verwendeten. Der Aufbau dieses leicht selbst anzufertigenden einfachen Systems ist in Fig. 1 gezeigt.

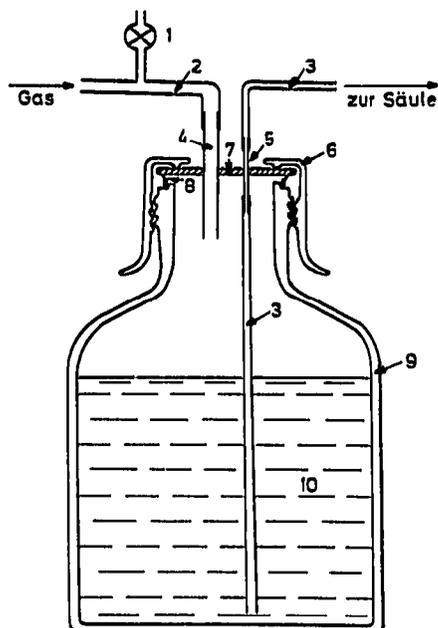


Fig. 1. Direktes Drucksystem mit Originalflasche Merck. 1 = Ventil (auf/zu) zum Druckausgleich nach der Chromatographie; 2 = Druckschlauch; 3 = PTFE Schlauch; 4 und 5 = Metallrohre, hart verlötet mit Metallplatte (7); 6 = Originalverschlusskappe Merck, passend für die Metallrohre durchbohrt; 7 = Metallscheibe; 8 = Dichtungsring Originalflasche Merck; 9 = Originalflasche Merck; 10 = Eluierflüssigkeit.

Diese Anordnung ist für die Fertigsäulen Merck nach unseren bisherigen Erfahrungen universell anwendbar und hat den grossen Vorteil, dass ein Lösungsmittelwechsel sehr leicht möglich ist, da die Kappe nur auf einen anderen Originallösungsmittelbehälter aufgeschraubt zu werden braucht.

Der Gasvordruck an der Stickstoffflasche wird durch ein Feinregulierventil konstant bei 1.5 bis 2 atü gehalten und die Durchflussgeschwindigkeit dadurch reguliert, dass der vom Detektor zum Auffanggefäss führende Teflonschlauch mit einer Klemme mehr oder minder zusammengedrückt wird. Durch dieses Zusammendrücken des Schlauches nach dem Detektor ist ausserdem die bei diesem Drucksystem mögliche Störung beseitigt, dass eventuell in der Elutionsflüssigkeit gelöstes Gas beim Druckabfall nach der Säule ausperlt und zu Störungen im Detektor führt.

#### Untersuchungslösungen

*Ätherisches Öl.* Als Beispiel für die flüssigchromatographische Bestimmung der Spiroäther in einem ätherischen Kamillenöl wurde die Lösung eines für unsere gas-

chromatographischen Untersuchungen<sup>4</sup> gewonnenen ätherischen Kamillenöls (Destillation aus pH 5,5) in 2 ml Cyclohexan p.a. gewählt. In dieser Lösung waren nach der gaschromatographischen Bestimmung 6.05 mg *cis-trans*-Spiroäther = 3 mg/ml enthalten.

*Extrakte.* Als Beispiele für die Bestimmung in Extrakten wurden die für unsere gaschromatographischen Untersuchungen<sup>4</sup> hergestellten Äthanol-extrakte (96, 72, 48, 24 Vol.-% Äthanol) verwendet. Diese Extrakte wurden ohne Ausschüttelung direkt auf die Säule gegeben.

Gehalt an Spiroäthern (GC): Extrakt 96%: 61.8 mg/100 ml = 0.62 mg/ml; Extrakt 72%: 55.4 mg/100 ml = 0.56 mg/ml; Extrakt 48%: 41.4 mg/100 ml = 0.41 mg/ml; Extrakt 24%: 6.0 mg/100 ml = 0.06 mg/ml.

#### *Identifizierung der Peaks des Chromatogramms*

Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch separates Auffangen jedes Peaks, darauffolgende Aufnahme der UV-Spektren und Dünnschichtchromatographie. Dabei konnte das Chamazulen des ätherischen Öles als 1. Peak (siehe Fig. 2) bereits an der charakteristischen blauen Farbe der eingeeengten Lösung sowie am  $R_F$ -Wert bei der Dünnschichtchromatographie identifiziert werden. Der zweite und auch der dritte Peak (Fig. 2) lieferten je ein UV-Spektrum, das mit dem von Breinlich<sup>3</sup> für En-indicycloäther gezeigten UV-Spektrum identisch war. Einen weiteren Beweis lieferte die dünnschichtchromatographische Überprüfung. Dabei zeigte sich, dass die DC-Identifizierung des *cis*-Spiroäthers sehr rasch geschehen musste, da sich bereits bei kurzem Stehen ein Teil dieser *cis*-Verbindung zur *trans*-Verbindung isomerisiert hatte (siehe auch unten).

#### ERGEBNISSE

In Fig. 2A ist das Chromatogramm der flüssigchromatographischen Bestimmung der Spiroäther im ätherischen Öl gezeigt. Da die Peaks der beiden Verbindungen *cis*-Spiroäther und *trans*-Spiroäther nahe beieinander liegen und die Peakbreiten sich dadurch ähneln, kann für die Berechnung des Mengenverhältnisses die einfache Methode der Peakhöhenmessung verwendet werden, ohne dass dabei mit zu grossen Fehlern gerechnet werden muss. Aus den Peakhöhen ergibt sich im ätherischen Öl folgende prozentuale Verteilung: *cis*-Spiroäther, 67%; *trans*-Spiroäther, 33%. Von den insgesamt 3 mg *cis-trans*-Spiroäther in 1 ml der Analysenlösung (siehe oben) entfallen demnach 2 mg auf das *cis*-Isomere und 1 mg auf das *trans*-Isomere.

Bemerkenswert erscheint uns die Beobachtung, dass gleichzeitig mit der bekannten "Vergrünung" des Chamazulens an der Luft<sup>3</sup> und in ungeeigneten Lösungsmitteln auch eine Isomerisierung des *cis*-Spiroäthers zur *trans*-Form auftritt. Die blaue Lösung eines Anteils dieses ätherischen Öles in Chloroform p.a. war nach 6-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur grün gefärbt und auch die prozentuale Verteilung der Spiroäther hatte sich zu 44% *cis*-Isomeres und 56% *trans*-Isomeres geändert. Bei dem heteroatomfreien Lösungsmittel Cyclohexan konnte dagegen auch nach längerer Zeit weder eine Umwandlung des Chamazulens noch eine Isomerisierung des *cis*-Spiroäthers beobachtet werden.

Fig. 2B zeigt als Beispiel die Spiroätherbestimmung im 96%igen Äthanol-

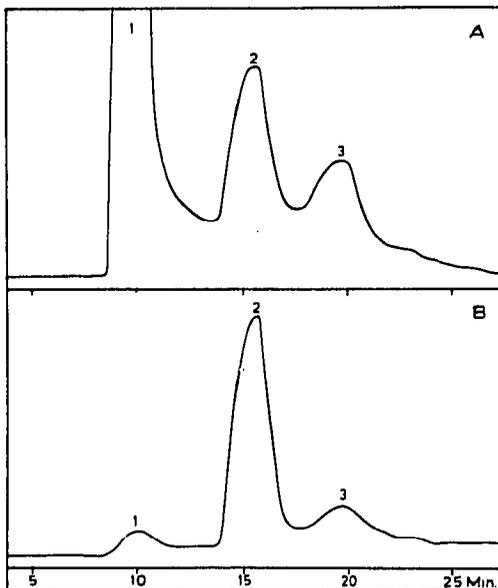


Fig. 2. Chromatogramme der *cis*- und *trans*-Spiroäther-Trennung. (A) Ätherisches Öl; (B) Alkohol-extrakt. 1 = Chamazulen; 2 = *cis*-Spiroäther; 3 = *trans*-Spiroäther.

extrakt. In Tabelle I sind die Ergebnisse der Extraktuntersuchungen zusammengestellt.

Das Chamazulen, das auch bei der Extraktion in sehr geringem Masse aus dem Prochamazulen gebildet wird<sup>6</sup>, konnten wir in Spuren nur im 96%igen Äthanol-extrakt auffinden (siehe Fig. 2).

TABELLE I

SPIROÄTHERBESTIMMUNG IN ÄTHANOLEXTRAKTEN

|                          | 96%<br>Äthanol |       | 72%<br>Äthanol |       | 48%<br>Äthanol |       | 24%<br>Äthanol |       |
|--------------------------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|
|                          | %              | mg/ml | %              | mg/ml | %              | mg/ml | %              | mg/ml |
| <i>cis</i> -Spiroäther   | 85             | 0.53  | 86             | 0.48  | 80             | 0.33  | 75             | 0.045 |
| <i>trans</i> -Spiroäther | 15             | 0.09  | 14             | 0.08  | 20             | 0.08  | 25             | 0.015 |

Wie aus der Untersuchung des ätherischen Kamillenöls und den Kamillen-extrakten hervorgeht, tritt schon bei der Wasserdampfdestillation in gewissem Ausmass eine Umwandlung der *cis*-Form der Spiroäther in die *trans*-Form auf. Auch bei den Extrakten scheint der Alkoholgehalt eine Rolle zu spielen. Diese Fragen der Isomerisierung der Spiroäther bedürfen jedoch weiterer, eingehenderer Untersuchungen.

## LITERATUR

- 1 F. Bohlmann, P. Herbst, Ch. Arndt, U. Schönowsky und H. Gleinig, *Chem. Ber.*, 94 (1961) 3193.
- 2 O. Isaac, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 114 (1974) 255.
- 3 J. Breinlich, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 107 (1967) 1795.
- 4 H. Glasl und H. Wagner, *Deut. Apoth.-Ztg.*, im Druck.
- 5 *Basic liquid chromatography*, Varian Aerograph, Walnut Creek, Calif., 1971, S. 10-4.
- 6 O. Isaac, *APV-Informationsdienst*, 14 (1969) 156.