

CHROM. 10,291

HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON VALEPOTRIATEN AUS VALERIANA-DROGEN UND ZUBEREITUNGEN

G. TITTEL und H. WAGNER

Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, München (B.R.D.)

(Eingegangen am 10. Juni 1977)

SUMMARY

High-performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of valepotriates in Valeriana drugs and preparations

It is possible directly to separate and analyse, quantitatively and qualitatively, the valepotriates from Valeriana crude extracts or from commercial Valeriana preparations by high-performance liquid chromatography.

The separations are achieved on 4 or 8 mm I.D. columns packed with silica gel (particle size 10 μm) with *n*-hexane-ethyl acetate mixtures as eluent. A refractive index detection system is necessary for determining all of the valepotriates. If the concentration differences between didrovaltratum and valtratum are very great, an ultraviolet (UV) detector must be used and the determination must be conducted in two steps. For valtratum drugs UV detection alone will suffice.

As internal standards *p*-dimethylaminobenzaldehyde should be used for extracts and preparations from valtratum races, and benzaldehyde in the presence of didrovaltratum races.

This determination is superior to the combined thin-layer chromatographic-hydroxamic acid method used hitherto with respect to time consumption, precision, and sensitivity.

EINFÜHRUNG

Zur Standardisierung von Valerianaextrakten und Zubereitungen werden neben den ätherischen Ölen die Valepotriate (Valeriana-epoxydtrieste)¹ herangezogen. Sie sind nach van Eickstedt und Rahman² zu etwa zwei Drittel an der pharmakologischen Wirkung von Baldriangesamtextrakten beteiligt. Die bisher gebräuchlichen qualitativen und quantitativen Bestimmungsmethoden für Valepotriate beruhen auf den Arbeiten von Thies³, Stahl und Schild⁴, Poethke *et al.*⁵ sowie Wagner *et al.*⁶. Mit Ausnahme der Jodhydrin-Bestimmung handelt es sich um spektralphotometrische Direkt- oder Indirektbestimmungen nach Dünnschicht(DC)-Auftrennung.

Eine zeitsparende und leichter durchführbare Methode, die auch eine direkte

quantitative Bestimmung der Valepotriate aus Baldrian-Extrakten oder Präparaten erlaubt, bietet sich in der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) an. Über erste Trennversuche wurde bereits berichtet⁷.

Die wichtigsten Valepotriate (iridoide Cyclopentapyranester mit einer Epoxydgruppierung) lassen sich auf Grund ihres chromogenen Verhaltens in zwei Gruppen einteilen: Valtrat und Acevaltrat besitzen ein konjugiertes Doppelbindungssystem, während Didrovaltrat und Isovaleroxyhydroxydidrovaltrat (IVHD) (vergl. Fig. 1) nur eine isolierte Doppelbindung aufweisen. Dieser Unterschied muss bei der Detektion bei der HPLC berücksichtigt werden. Verwendet man einen UV-Photometer mit einer Messeinrichtung für 254 oder 280 nm, so können nur die Valepotriate mit dem konjugierten Doppelbindungssystem erfasst werden. Hierunter fallen auch die Hydrinformen des Valtrats⁸, die zum Teil genuin in der Droge vorkommen, zum Teil als Artefakte anzusehen sind.

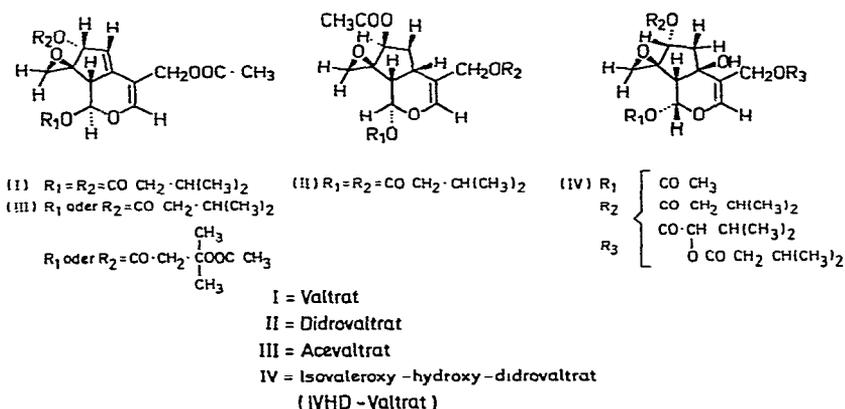


Fig. 1. Strukturen der Valepotriate.

Zur Detektion des in Fertigpräparaten oft überwiegenden Didrovaltrates ist ein Differentialrefraktometer notwendig. Mit diesem Gerät können in einem Durchlauf alle Valepotriate detektiert werden. Der Nachteil liegt hier allerdings in der geringeren Nachweisempfindlichkeit.

Damit stehen drei Möglichkeiten für die Bestimmung der Valepotriate zur Diskussion:

(1) Die Bestimmung aller Valepotriate in einem Arbeitsgang mit Hilfe des Refraktometers beim Vorliegen hoher Substanzkonzentrationen.

(2) Die Bestimmung durch einen UV-Photometer (280 nm), wenn geringe Substanzkonzentrationen oder Präparate der Valtratrasse vorliegen.

(3) Die Bestimmung mit einem Photometer und Refraktometer mit Doppelschreiber, wenn niedere Konzentrationen an UV-absorbierenden, und hohe Konzentrationen an nicht UV-absorbierenden Valepotriaten vorliegen (z.B. *Valeriana wallichii* und Didrovaltratrasse). Die Analyse ist hier vor allem bei quantitativen Bestimmungen in zwei Durchgängen mit verschiedenen Substanzkonzentrationen durchzuführen. Zur qualitativen Analyse kann auch ein einmaliges Einspritzen ausreichend sein

EXPERIMENTELLES

Probenvorbereitung

Bestimmung aus der Droge: 10 g fein pulv. Droge werden am Rückfluss 3 h mit 100 ml Dichlormethan erhitzt. Nach dem Abfiltrieren und Einengen zur Zähflüssigkeit wird der Standard (2–7 mg *p*-Dimethylaminobenzaldehyd) zugewogen. Das Extraktkonzentrat wird in 1 ml Dichlormethan aufgenommen.

Bestimmung aus einem konzentrierten Extrakt. Ca. 500 mg (genau gewogen) Extrakt werden mit dem Standard (2–5 mg) versetzt und in ca. 1 ml Dichlormethan gelöst.

Bestimmung aus Dragees. 10 Dragees werden grob gepulvert und in 50 ml Dichlormethan 3 h am Rückfluss erhitzt. Nach dem Abfiltrieren und Einengen zur Zähflüssigkeit wird der Standard zugewogen. Das Konzentrat wird in 1 ml Dichlormethan gelöst. Verwendet man Benzylalkohol (100–200 mg) als Standard (RI) so kann dieser direkt zugewogen werden. Von *p*-Dimethylaminobenzaldehyd oder Benzaldehyd stellt man eine Stammlösung her (ca. 400 mg pro 100 ml Dichlormethan) und wiegt davon die benötigte Menge dem Extrakt zu. Bei der Berechnung der tatsächlichen Menge Standard muss dann die Dichte von Dichlormethan(1.3) berücksichtigt werden.

Chromatographie der Konzentrate

Von den Lösungen werden ca. 2–10 μ l direkt in den Liquidchromatographen eingespritzt. Im ersten Durchlauf erfolgt Detektion mit dem UV-Photometer bei 280 oder 254 nm. Es werden Valtrat und Acevaltrat sowie die Hydrinformen erfasst.

Im zweiten Durchgang werden bei RI-Detektion von der gleichkonzentrierten Lösung ca. 20–25 μ l eingespritzt. Bei grossen Konzentrationsunterschieden zwischen Valtrat und Didrovaltrat kann es notwendig werden, die Untersuchungslösung weiter zu konzentrieren.

Es werden alle Valepotriate, insbesondere Didrovaltrat, erfasst.

Auswertung der Chromatogramme

Die aus den Chromatogrammen erhaltenen Werte für die Peakflächen oder Höhen werden für jede Substanz einzeln in folgende Formel eingesetzt (f_x = Standardkorrekturfaktor, siehe unten):

$$\text{mg X} = \frac{\text{Fläche X} \cdot \text{mg Standard}}{f_x \cdot \text{Fläche Standard}}$$

Der daraus ermittelte Wert für die gesuchte Substanz X ergibt nach Multiplikation mit 100 und Division durch die jeweilige Einwaage den prozentualen Gehalt.

HPLC-Anlage

Die Anlage war wie folgt zusammengesetzt. Pumpe, Waters Assoc. 6000 A; Injektionssystem, Waters Assoc. U6K; Detektoren, RI: Winopal Lamidur, UV: Altex 151; Säulen, MN-Nucleosil® 50 10 μ m (Stahl), 25 cm \times 4 mm I.D. und Lichrosorb® Si 100 10 μ m (Stahl), 35 cm \times 8 mm I.D.; Schreiber, Perkin-Elmer 56.

Testsubstanzen

Verwendet wurden: Valtrat, Fa. Kali Chemie (98.5% rein); Didrovaltrat,

Fa. Kali Chemie: Acevaltrat, Fa. Kali Chemie, und im Hause isoliert aus *V. tiliifolia*; Benzaldehyd, Merck Nr. 80 17 56; Anisaldehyd, Merck Nr. 1450; *p*-Dimethylaminobenzaldehyd, Merck Nr. 3058; Benzylalkohol, Merck Nr. 9626.

Drogen und Extrakte

V. officinalis Droge, Anbau Freising, Ernte Herbst 1976, gefriergetrocknet. *V. mexicana* Extr., 1 Jahr gelagert, industriell angereichert; *V. tiliifolia* Extr., Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre; *V. wallichii* Droge, Anbau Freising, 2 Jahre alt; *V. wallichii* Extr., von der Fa. Kali Chemie.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Trennung und qualitative Analyse

Bei der Auswahl des Eluentensystems musste die Durchlässigkeit im UV-Bereich berücksichtigt werden. Daher konnte nicht von erprobten DC-Laufmitteln, die zumeist Benzol oder Methyläthylketon enthalten, ausgegangen werden. Zur Trennung verwendeten wir eine Adsorptionssäule mit Kieselgel als stationärer, und verschiedene Dichlormethan- bzw. *n*-Hexan-Äthylacetat-Gemische als mobile Phase. Zur Durchführung der Bestimmung haben sich die folgenden Mischungsverhältnisse als optimal erwiesen: *n*-Hexan-Äthylacetat (20:3) (A) und Dichlormethan-Äthylacetat (20:1) (B).

Das System A ist zur quantitativen Bestimmung der Valepotriate in *V. officinalis*-Extrakten geeignet, da hier der zugesetzte Standard zwischen Valtrat und Didrovaltrat eluiert wird. Das System B eignet sich wegen seiner gegenüber A erhöhten Polarität und der damit erzielten schnelleren Trennung besonders zur qualitativen Beurteilung einer Baldrian-Droge.

Für die UV-Detektion verwendeten wir die Wellenlänge 280 nm. Diese Wellenlänge liegt zwar nicht im Zentrum des Absorptionsbereiches der Valepotriate; es werden aber Begleitsubstanzen weitgehend ausgeschaltet, die bei 254 nm bes. bei Pflanzenextrakten noch störend wirken können (λ_{\max} . Valtrat = 254 nm).

Als Trennsäule verwendeten wir (a) eine MN-Fertigsäule Nucleosil® 50 10 μ m (4 mm I.D. \times 25 cm) und (b) eine mit Kieselgel Lichrosorb® Si-100 10 μ m selbst gepackte semipräparative Stahlsäule (8 mm I.D. \times 35 cm). Bei Vergleichen zwischen den beiden Säulentypen fanden wir, dass nicht vorgereinigte Pflanzenrohextrakte auf der semipräparativen Säule annähernd grundliniengetrennt wurden, während dies für die kurz nacheinander eluierten Substanzen auf der analytischen Säule nicht erreichbar war.

Während auf der analytischen Säule Didrovaltrat und Acevaltrat so eng beieinander lagen, dass das im natürlichen Verhältnis mengenmäßig geringere Acevaltrat oft vom Tailing des Didrovaltrats überdeckt wurde, war die Trennung auf der semipräparativen Säule ausreichend, um einwandfreie quantitative Bestimmungen von Acevaltrat durchführen zu können. Die Elutionsreihenfolge lautet: Valtrat und Isovaltrat, Didrovaltrat, Acevaltrat.

Die Fig. 2 zeigt die Trennung der Reinsubstanzen auf der analytischen Säule. Die relative Retention (α), berechnet aus den k' -Werten, beträgt für die Säule a α 2.05, während für Säule b (8 mm I.D.) α 2.7 ist. Allerdings beträgt die Analysendauer bei gleicher Durchflussgeschwindigkeit ca. das 4-fache.

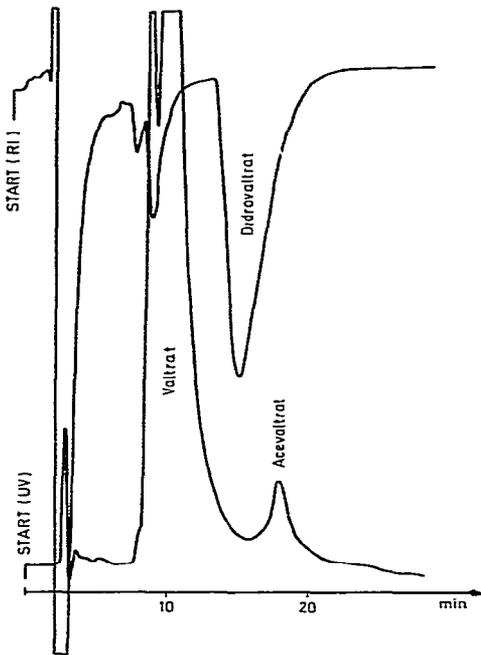


Fig. 2. Trennung der Testsubstanzen bei kombinierter UV-RI-Detektion. Säule, MN-Nucleosil 50-10 (4 mm I.D. \times 25 cm); Eluent, *n*-Hexan-Äthylacetat (20:3); Durchfluss, 1,0 ml/min; Detektion, UV 280 nm und RI.

Trennung der Valepotriate in *Valeriana*-Extrakten

Die HPLC-Untersuchung von *Valeriana*-Drogen wird mit Extraktkonzentraten durchgeführt. Hierzu extrahiert man die Droge mit Dichlormethan und engt den Extrakt nach Filtration zur Trockne ein. Der Rückstand wird je nach Valepotriatgehalt in 1–10 ml Methanol aufgenommen und dann zur Reinigung über eine Sephadex LH 20-Säule, bzw. zusätzlich über eine D5-Glasfritte gegeben. Wird auf die Vorreinigung verzichtet, so kann der konzentrierte Dichlormethanextrakt auch direkt verwendet werden.

Zur Identitäts- und Reinheitsprüfung der verschiedenen *Valeriana*extrakte wird mit einem Standard-Extrakt verglichen. Nach dem DAB 7 sowie nach DAB 7 "DDR" und Ph.E.III-75 gilt nur *V. officinalis* als offizinell. Unter Bezugnahme auf einen in Versuchsreihen festgelegten Fingerprint für die einzelnen Drogen sollte es auch möglich sein, zwischen den verschiedenen Rassen zu unterscheiden.

Bei fast allen Drogen ist bei UV-Detektion Valtrat im Gesamtvalepotriatgehalt der dominierende Peak.

Als Testdrogen standen zur Verfügung: *V. officinalis* (Fig. 4), *V. wallichii* (Fig. 3), *V. mexicana* und *V. tiliifolia*.

Bei allen Extrakten werden als erstes die ätherischen Öl-Bestandteile eluiert. Auf allen Chromatogrammen mit Ausnahme von *V. tiliifolia* war eine saubere Trennung von Valtrat und Isovaltrat erkennbar. Dann folgten Acevaltrat und eventuelle Hydrinformen sowie nicht näher bezeichnete mengenmässig geringe Begleitsubstanzen. Dies gilt für die UV-Detektion. Im Refraktometer wird der Unterschied zwischen Extrakten der Valtratrasse und der Didrovaltratrasse deutlich: *V. officinalis* zeigt schon

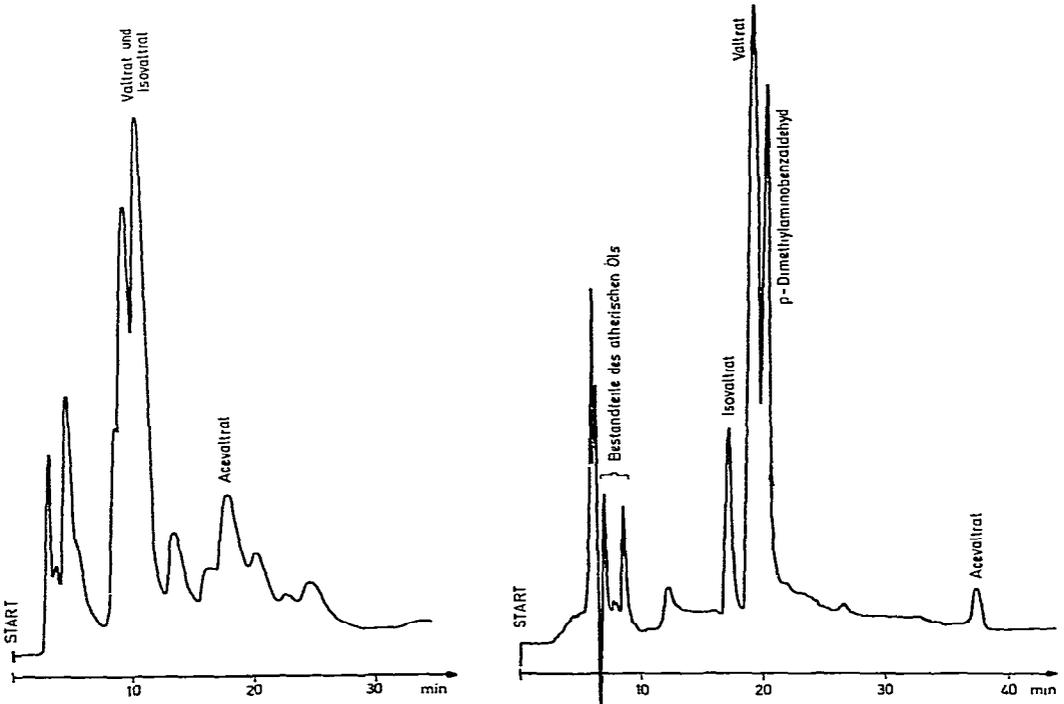


Fig. 3. *Valeriana-wallichii*-Extrakt bei UV-Detektion. Säule, MN-Nucleosil 50-10 (4 mm I.D. \times 25 cm); Eluent, *n*-Hexan-Äthylacetat (20:3); Durchfluss, 1.0 ml/min; Detektion, UV 280 nm.

Fig. 4. *Valeriana-officinalis*-Extrakt bei UV-Detektion auf semipräparativer Säule. Säule, Lichrosorb Si 100 (8 mm I.D. \times 35 cm); Eluent, *n*-Hexan-Äthylacetat (20:3); Durchfluss, 2.0 ml/min; Detektion, UV 280 nm.

bei geringerer Konzentration nur den Valtratpeak, während bei *V. wallichii* bei der gleichen Konzentration das weitaus stärkere Signal von Didrovaltrat hinzukommt. Bei *V. officinalis* und *V. mexicana* bleiben nach Valtrat Raum für die Einführung einer Standardsubstanz (*p*-Dimethylaminobenzaldehyd oder Benzylalkohol) während bei *V. wallichii* wegen einer unmittelbar darauffolgenden Substanz besser ein innerer Standard zwischen Lösungsmittelpeak und Isovaltrat eingeführt wird.

Untersuchung von Arzneispezialitäten

Für die Bestimmung der Valepotriate in Baldrianpräparaten des Handels haben wir vier willkürlich ausgewählt. Mit Ausnahme von Valmane[®], das ein Gemisch von Valepotriaten enthält und auf einen Gesamtvalepotriate-Gehalt von 50 mg pro Droge eingestellt ist, wurden alle anderen Spezialitäten laut Angabe der Herstellerfirmen mit Baldrian-trockenextrakten produziert, ohne dass Angaben über den Valepotriat-gehalt gemacht werden. Ein Vergleich zwischen den unter identischen Bedingungen aufgenommenen Chromatogrammen von Valmane[®] und einem selbst hergestellten Extrakt aus *Valeriana wallichii* zeigt einen nahezu identischen Fingerprint, während sich jener von *V. officinalis* deutlich davon unterscheidet. Es ist somit möglich, *Valeriana*-Extrakt-Zubereitung durch vergleichende HPLC einer bestimmten Droge zuzuordnen.

In einem Baldriankombinationspräparat konnte Valtrat an Hand der Retentionszeit und durch Überspritzen mit Valtrat-Reinsubstanz einwandfrei identifiziert werden. In den anderen getesteten Spezialitäten waren unter den gleichen Bedingungen zwar ätherische Öle, aber keine intakten Valepotriate mehr nachweisbar.

Quantitative Bestimmung der Valepotriate

Die quantitative Bestimmung ist am genauesten mit Hilfe eines inneren Standards durchführbar. Als geeignet erwiesen sich *p*-Dimethylaminobenzaldehyd, Benzaldehyd und Benzylalkohol. Diese sind sowohl für die UV- als auch für die RI-Detektion verwendbar. Benzylalkohol wird noch vor Isovaltrat eluiert und eignet sich besonders zur Bestimmung von *V. wallichii*-Extrakten und von Arzneifertigpräparaten mit ähnlicher Valepotriatzusammensetzung. *p*-Dimethylaminobenzaldehyd liegt in den beschriebenen Systemen zwischen Valtrat und Didrovaltrat. Benzylalkohol verwendeten wir im modifizierten Laufmittel: *n*-Hexan-Äthylacetat 20:6 bei RI-Detektion.

Valtrat hat unter den gegebenen Bedingungen ein dem Anisaldehyd analoges Retentionsverhalten und kann somit zum Auffinden des Valtratpeaks im Chromatogramm dienen. Als Referenzsubstanz für die Dünnschichtchromatographie wurde Anisaldehyd bereits von Stahl⁹ vorgeschlagen.

Der Einsatz von inneren Standards erfordert das Aufstellen von Korrekturfaktoren (Tabelle I), da die Detektoranzeige bei der LC substanz-spezifisch ist. Wir verwendeten für die Berechnung des Standardkorrekturfaktors f_x die Formel:

$$f_x = \frac{\text{Fläche X} \times \text{Einwaage Standard}}{\text{Fläche Standard} \times \text{Einwaage X}}$$

TABELLE I

STANDARDBERECHNUNGSFAKTOREN f_x Säule: Lichrosorb Si-100-5 μm (4 mm I.D. \times 25 cm)

<i>Valepotriat</i>	f_x	
	UV (280 nm)	RI
<i>Laufmittel A*</i>		
Valtrat/Isovaltrat	0.025	0.37
Didrovaltrat	—	0.12
Acevaltrat	0.03	0.26
<i>Laufmittel A**</i>		
Valtrat/Isovaltrat	0.09	0.23
Didrovaltrat	—	0.09
Acevaltrat	0.06	0.07

* Standard: Dimethylaminobenzaldehyd.

** Standard: Benzaldehyd.

Die Chromatogramme wurden manuell nach der von Uihlein¹⁰ als genau gekennzeichneten Peakhöhenberechnung ausgewertet. Zur Bestimmung wählten wir einen frisch hergestellten Extrakt aus einer *V. officinalis* Droge und einen gelagerten *V. mexicana* Extrakt.

Die bei der HPLC-Bestimmung ermittelten Werte für Valtrat haben wir mit

TABELLE II
QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER VALEPOTRIATE

<i>Probe</i>	<i>Gesamteinwaage</i>	<i>Standard</i>	<i>Gehalt</i>
<i>V. officinalis</i> Droge	10.0 g	6.5 mg <i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyd	1.3 % Valtrat 1.24 % Valtrat (Hydroxamsäuremethode)
<i>V. officinalis</i> Extr.	194.4 mg	2.2 mg <i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyd	1.79 % Valtrat
<i>V. mexicana</i> Extr. (angereichert)	307.2 mg	4.0 mg <i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyd	16.3 % Valtrat 0.6 % Didrovaltrat
<i>V. wallichii</i> Extr. (angereichert)	519.0 mg	190.6 mg Benzylalkohol	11.2 % Valtrat 73.4 % Didrovaltrat
Arzneispezialität	10 Drag. = 500 mg Valepotriate	146.3 mg Benzylalkohol	9.9 % Valtrat 9.1 % Valtrat (Hydroxamsäuremethode) 79.5 % Didrovaltrat + Acevaltrat

den Ergebnissen von Untersuchungen nach der von Wagner und Mitarbeitern beschriebenen Hydroxamsäuremethode⁶ verglichen (Tabelle II). Dabei treten Abweichungen von 1–2 % auf. Die HPLC-Methode liefert damit auf wesentlich schnellerem und unkomplizierterem Wege die gleichen Ergebnisse wie die Hydroxamsäuremethode.

Bei Verwendung der 8 mm-I.D.-Säule konnten alle Valepotriate einzeln erfasst werden. Bei der analytischen Säule konnte Acevaltrat allein nur im UV, nicht aber bei RI-Detektion bestimmt werden, da es von Didrovaltrat nicht ausreichend getrennt wurde.

Die Extrakte zur quantitativen Bestimmung wurden ohne Vorreinigung direkt eingespritzt. Bei Nachlassen der Trennleistung war eine Regenerierung der Säule durch Spülen mit Äthylacetat und *n*-Hexan (je 300 ml in der genannten Reihenfolge) möglich.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Einsatz der HPLC ist es möglich, aus konzentrierten Baldrian-Rohextrakten oder aus Baldrian-Fertigprodukten direkt die Valepotriate zu trennen und qualitativ sowie quantitativ zu bestimmen. Als Trennsystem wird eine analytisch 4 mm I.D., oder eine semipräparative 8 mm-I.D.-Säule mit Kieselgel (10 µm Korngrösse) und *n*-Hexan-Äthylacetat-Gemische als Elutionsmittel vorgeschlagen. Zur Erfassung aller Valepotriate ist eine RI-Detektion nötig. Bei zu grossen Konzentrationsunterschieden zwischen Didrovaltrat und Valtrat muss ein UV-Detektor zugeschaltet und die Untersuchung in zwei Durchgängen vorgenommen werden. Bei Drogen der Valtratrasse kann UV-Detektion allein ausreichend sein.

Als innere Standards eignen sich *p*-Dimethylaminobenzaldehyd für Extrakte und Zubereitung aus Drogen der Valtratrasse, und Benzaldehyd bei Vorliegen der Didrovaltratrasse. Die quantitative Bestimmung ist wegen des geringeren Zeitaufwandes bei gleicher bzw. höherer Genauigkeit und Empfindlichkeit der kombinierten DC-Hydroxamsäure-Methode überlegen.

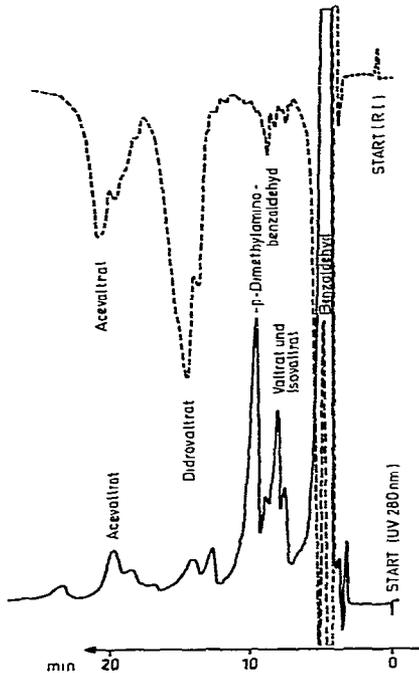


Fig. 5. Arzneifertigpräparat aus definierten Valepotriat-Reinsubstanzen (500 mg). Eluent: A, Säulen: Lichrosorb SI 100-5 μm (4 mm I.D. \times 25 cm); Durchfluss: 1.0 ml/min; UV/RI-Detektion: Einspritzmenge: 15 μl ; Standards: 20.0 mg Benzaldehyd/0.47 mg *p*-Dimethylaminobenzaldehyd.

ADDENDUM

(1) Durch Verwendung einer Säule mit 5 μm -Kieselgel konnte inzwischen die Trennung weiter verbessert werden (vgl. Fig. 5).

Bedingungen: Laufmittel, A; Säule, Lichrosorb Si-100-5 μm ; Durchflusgeschw., 1.0 ml/min.

(2) Es ist möglich, Didrovaltrat neben Valtrat und Acevaltrat in einem Durchlauf mit einem variablen UV-Detektor bei 220 nm zu erfassen. Dabei muss allerdings Äthylacetat im Laufmittel wegen seiner UV-Undurchlässigkeit bei der genannten Wellenlänge durch Methanol ersetzt werden, das seinerseits hier keine hohe Eigenabsorption aufweist. Haselhoff und Yellema (Laboratory for Pharmacognosy, State University of Groningen, Niederlande)¹¹ haben diese Variante an Reinsubstanzen und Valmane erprobt.

Problematisch erscheint allerdings die direkte Analyse von Drogenrohextrakten wegen der vielfältigen Störmöglichkeiten bei 220 nm im UV durch natürliche Extraktbegleitstoffe.

(3) Über die weitere Auftrennung von Valtrat in seine genuine Isomeren und Homologen Isovaltrat und Homovaltrat berichteten van Meer und Labadie¹².

DANK

Unser Dank gilt Herrn Dr. Thies (Fa. Kali Chemie) für die Überlassung von Testsubstanzen und Herrn Dr. Hölzl (Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre, München) für Diskussionsbeiträge zu dieser Arbeit. Bei Herrn Prof. Dr. Halasz bedanken wir uns für technische Hilfestellung bei der Säulenpräparierung.

LITERATUR

- 1 P. W. Thies und S. Funke, *Tetrahedron Lett.*, (1966) 1155.
- 2 K. W. von Eickstedt und S. Rahman, *Arzneim.-Forsch.*, 19 (1969) 316 und 19 (1969) 993.
- 3 P. W. Thies, *Tetrahedron Lett.*, (1968) 313.
- 4 E. Stahl und W. Schild, *Arzneim.-Forsch.*, 19 (1969) 314.
- 5 W. Poethke, H. Gerlach und W. Mannetstätter, *Pharm. Zentralh.*, 107 (1968) 261.
- 6 H. Wagner, L. Hörhammer, J. Hölzl und R. Schaette, *Arzneim.-Forsch.*, 20 (1970) 1149.
- 7 G. Tittel und H. Wagner, *International Congress for Research on Medicinal Plants, München, 6.-10. Sept. 1976, Dtsch. Apoth. Ztg.*, 40 (1976) 1480.
- 8 J. Hölzl, V. M. Chari und O. Seligmann, *Tetrahedron Lett.*, 15 (1966) 1171.
- 9 E. Stahl, *Chromatographische und mikroskopische Analyse von Drogen*, Fischer, Stuttgart, 1970, S. 161.
- 10 M. Uihlein, *Kritische Anmerkungen zur quantitativen HPLC*, Königsteiner Chromatographie-Tage, 1976.
- 11 B. Hazelhoff and Yellema, to be published.
- 12 L. H. van Meer, R. P. Labadie, *Planta Med.*, Vol. 32, A, No. 1 (1977) 51.