

CHROM. 12,700

## Note

### Einfache Methode zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Kawa-Laktone durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie\*

L. GRACZA und P. RUFF

Entwicklungsabteilung der Firma Müller/Göppingen, Postfach 869, 7320 Göppingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 22. Januar 1980)

Die biogenetisch von den Phenylpropanen abgeleiteten Kawa-Laktone<sup>1,2</sup> sind wegen ihrer wertvollen pharmakologischen Eigenschaften (sedativ, muskelrelaxierend, antikonvulsiv, analgetisch<sup>1-3</sup>) Bestandteile einiger Arzneipräparate [Bilicura<sup>®</sup>, (Müller/Göppingen, Göppingen, B.R.D.); Kavosporal<sup>®</sup> (Müller/Göppingen); *Tct. Piperis methystici* (Stauffen-Pharma, Göppingen, B.R.D.)]. Diese Präparate enthalten die Kawa-Laktone in Form von Gesamtextrakten, nachdem nachgewiesen wurde, dass die einzelnen Kawa-Laktone teils synergetisch wirken, teils ihre Wirksamkeit gegenseitig ergänzen<sup>4,5</sup>. Über die Bioverfügbarkeit der Kawa-Laktone-haltigen Arzneistoffe stehen nur *in vitro*-Untersuchungsergebnisse zur Verfügung<sup>6,7</sup>. *In vivo*-Untersuchungen sind im Gange, wobei die Frage der analytischen Kontrolle, bedingt durch eine exakte und empfindliche Bestimmungsmethode von entscheidender Bedeutung ist.

Zur Bestimmung der Kawa-Laktone wurden zahlreiche Methoden ausgearbeitet. Einige der Methoden beschränken sich auf die Erfassung des Gesamt-Gehaltes bzw. einiger Gruppen der Kawa-Laktone<sup>8,9</sup>. Nach anderen Methoden werden die einzelnen Wirkstoffe vor der Bestimmung getrennt, sind aber kompliziert und zeitraubend, so die kombinierten dünn-schichtchromatographisch-spektrophotometrischen Methoden<sup>10,11</sup> — die auch angesichts ihrer Genauigkeit weniger anspruchsvoll sind — bzw. die präparativ-gaschromatographische Methode<sup>12</sup>, die in Richtung quantitativer Bestimmung nicht weiterentwickelt wurde.

Nachstehend wird über eine Methode berichtet, die es erlaubt, Kawa-Laktone aus Arzneistoffen, Arzneipräparaten und biologischen Flüssigkeiten schnell und exakt zu bestimmen.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### Apparaturen

Verwendet wurden: Pumpe, Altex Modell 110 A, Injektor, Rheodyne Modell 7120; Säule (200 × 4 mm I.D.), M&N Nucleosil 100-5; Detektor, Kontron Modell Uvikon 725; Schreiber und Integriator, Hewlett-Packard Modell 5840 A.

\* 3. Mitteilung zur Bioverfügbarkeit Kawa-Laktone-haltiger Präparate (1. und 2. Mitteilung Lit. 6 und 7).

*Mobile Phase*

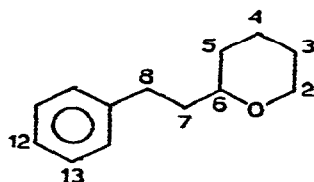
Verwendet wurde das binäre System *n*-Hexan-Dioxan (85:15).

*Reagenzien*

Kawain (1) und Yangonin (5) wurden von Csupor aus *Rhizoma Kawa-Kawa* isoliert<sup>11</sup>. Dihydromethystizin (4), Dihydrokawain (2) und Methystizin (3) wurden von Herrn Prof. Hänsel zur Verfügung gestellt (Tabelle I).

TABELLE I ·

## DIE UNTERSUCHTEN KAWA-LAKTONE



Kawa-Laktone	13	12	8	7	6	5	4	3	2
1				=			-OCH <sub>3</sub>	=	=0
2							-OCH <sub>3</sub>	=	=0
3		-O-CH <sub>2</sub> -O-		=			-OCH <sub>3</sub>	=	=0
4		-O-CH <sub>2</sub> -O-					-OCH <sub>3</sub>	=	=0
5		-OCH <sub>3</sub>		=	=		-OCH <sub>3</sub>	=	=0

*Untersuchungsmaterialien*

*Rhizoma Kawa-Kawa* und Extractum *Kawa-Kawa* sicc. wurden von der Firma Finzelbergs Nachfolger (Andernach, B.R.D.) bezogen.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

*Versuche mit Referenzsubstanzen*

Fig. 1 zeigt ein typisches Chromatogramm eines Gemisches der fünf Referenzsubstanzen (1-5). Eingegeben wurden 20  $\mu$ l aus einer *n*-Hexan-Dioxan-Lösung, die pro ml je 100  $\mu$ g von den Referenzsubstanzen enthält. Wie ersichtlich, erlaubt die gewählte Säule und das Fließmittel eine Basislinientrennung. Um die Linearität des Trennsystems zu überprüfen, wurden Eichgeraden von Reagenzien 1-5 aufgestellt (Fig. 2). Die auf Grund der Gleichung  $Y = C \cdot x + N$  (wobei  $Y$  = Peakfläche,  $C$  = Steigung der Eichgerade,  $x$  = eingegebene Menge Referenzsubstanz in  $\mu$ g,  $N$  = Achsenabschnitt) berechneten Regressionsgeraden verlaufen linear. Die Korrelationskoeffizienten für die Eichgeraden liegen nahe zum Wert 1: bei Kawain (1) z.B.  $x = 0.8 \mu$ g : 1.038;  $x = 1.2 \mu$ g : 1.009;  $x = 1.6 \mu$ g : 1.016;  $x = 2.0 \mu$ g : 1.004. Die Reproduzierbarkeit der Bestimmungsmethode ist gut. Der Variationskoeffizient beträgt z.B. bei Kawain (1) :  $\pm 0.49\%$ .

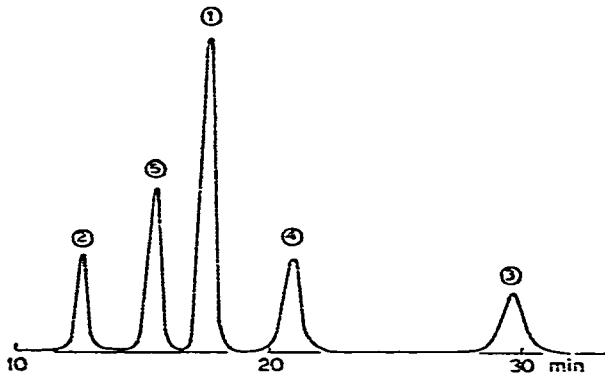


Fig. 1. Trennung von Kawa-Laktonen durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (Fluss: 1.5 ml/min; Verst.: 0.2 Extinktion "full scale"; Detektion: 240 nm; Schreiber: 0.5 cm/min; Attenuation: 5; Slope sens.: 0.04).

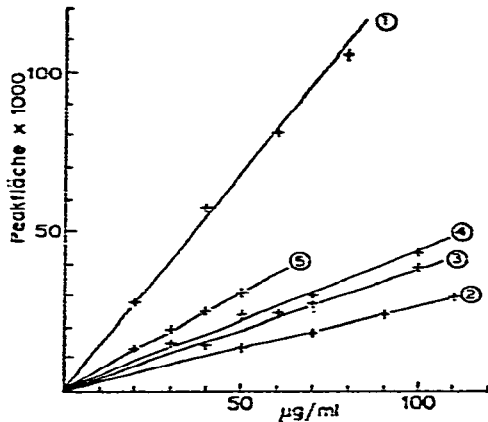


Fig. 2. Eichgeraden der Referenzsubstanzen (Detektion bei 240 nm).

#### Versuche mit Arzneistoffen und Arzneipräparaten

**Rhizoma und Extractum Kawa-Kawa sicc.** Rhizom (Lieferung 23.06.78) und Trockenextrakt (Kenn.-Nr. 79/215-3) wurden homogenisiert, mit Dichlormethan 1:100 im heißen Wasserbad 30 min unter Rückflusskühlung extrahiert, abgekühlt und filtriert. Filter und Rückstand wurden mit Dichlormethan nachgewaschen und das Filtrat mit der Waschflüssigkeit zur Trockene gebracht. Der Trockenrückstand wurde mit 50.0 ml Fließmittel (*n*-Hexan-Dioxan, 85:15) aufgenommen, 1:10 verdünnt und mit 2.0 ml der Standardsubstanz-Lösung (1.0 mg Zimtalkohol in 10.0 ml Fließmittel) versetzt. Aus der erhaltenen Analysenlösung wurden 20 µl auf die Säule gegeben und chromatographiert. Die Analysenergebnisse sind in der Tabelle II zusammengestellt.

**Bilicura und Kavosporal.** Je 10 Dragees von Bilicura (Charge-Nr. 79/32) und Kavosporal (Charge-Nr. 79/41) wurden verrieben, homogenisiert, mit 100 ml Dichlormethan im heißen Wasserbad 30 min lang unter Rückflusskühlung extrahiert, ab-

TABELLE II

## KAWA-LAKTONEN-GEHALT VERSCHIEDENER ARZNEISTOFFE UND ARZNEIPRÄPARATE

Kawa-Laktone	Rhizom (%)	Extrakt (%)	Tinktur (%)	Bilicura (mg/Dragee)	Kavosporal (mg/Dragee)
1	0.93	1.41	0.070	0.363	0.345
2	1.05	2.10	0.090	0.490	0.459
3	1.34	1.60	0.092	0.489	0.462
4	0.85	1.18	0.057	0.316	0.311
5	0.68	0.97	0.048	0.229	0.224
1-5	4.85	7.26	0.357	1.887	1.801

gekühlt und filtriert. Filter und Rückstand wurden mit Dichlormethan nachgewaschen und das Filtrat mit der Waschflüssigkeit zur Trockene gebracht. Der Trockenrückstand wurde mit 2.0 ml der Standardsubstanz-Lösung versetzt und mit dem Fliessmittel auf 25.0 ml aufgefüllt. Von der erhaltenen Analysenlösung wurden 20  $\mu$ l auf die Säule gegeben und chromatographiert. Die Analysenergebnisse sind in der Tabelle II zusammengestellt.

*Tct. Piperis methystici.* 1.0 ml Tinktur (Herst.-Datum 11. Dezember 1979) wurde mit 9.0 ml Wasser versetzt und 5 mal mit je 10 ml Diäthyläther extrahiert. Die vereinigten Äther-Lösungen wurden am Rotationsverdampfer auf etwa 5 ml eingedampft, mit *n*-Hexan aufgenommen und auf 10.0 ml aufgefüllt. Von der *n*-Hexan-Lösung wurden 5.0 ml mit 2.0 ml Standard-Lösung versetzt und auf 10.0 ml aufgefüllt. Von der erhaltenen Analysenlösung wurden 20  $\mu$ l auf die Säule gegeben und chromatographiert. Die Analysenergebnisse sind in der Tabelle II zusammengestellt.

Um unsere Analysenergebnisse zu kontrollieren, wurde Extractum Kawa-Kawa sicc. (Kenn.-Nr. 79/252-1) mit anderen Methoden auf seinen Kawa-Laktone-Gehalt geprüft. Die erhaltenen Werte sind aus der Tabelle III zu entnehmen.

TABELLE III

## VERGLEICH VERSCHIEDENER BESTIMMUNGSMETHODEN

Methode	Gehalt an Kawa-Laktonen (%)					
	1	2	3	4	5	1-5
Lit. 8	—	—	—	—	—	7.0
Lit. 9	—	—	—	—	—	9.87
Lit. 14	1.40	1.75	1.95	—	—	5.10
Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie	1.20	1.74	1.66	1.06	0.95	6.61

*Modellversuche mit Blutserum und Blutplasma*

*Blutserum.* Frisches Schweineblut wurde in Zentrifugengläsern so lange stehen gelassen, bis die Gerinnung eintrat. Dann wurde der Blutkuchen vom oberen Rand gelöst und 15 min lang bei 3500 rpm zentrifugiert und das Blutserum mit einer Pipette vorsichtig ausgehoben. Je 2.0 mg Kawain (1) und Yangonin (5) bzw. 100 mg Extr. Kawa-Kawa sicc. wurden in 20.0 ml Serum gelöst, 15 min lang bei Zimmertemperatur gerührt und filtriert. 10.0 ml Filtrat wurden mit 90 ml Wasser versetzt

und 5 mal mit je 20 ml Diäthyläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherlösungen wurden auf etwa 3 ml eingengt, mit 1.0 ml Standardsubstanzlösung versetzt und auf 5.0 ml aufgefüllt. Von der erhaltenen Analysenlösung wurden 20  $\mu$ l auf die Säule gegeben und chromatographiert. Die Analyseergebnisse sind in der Tabelle IV aufgeführt.

TABELLE IV

## LÖSLICHKEIT VON KAWA-LAKTONEN IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN

A = Reinsubstanz; B = Extrakt.

Kawa-Laktone	Blutserum		Blutplasma	
	A (%)	B (%)	A (%)	B (%)
1	30.0	78.5	33.4	80.0
2	—	77.5	—	79.4
3	—	52.0	—	53.7
4	—	62.4	—	67.8
5	17.5	44.8	18.2	54.0
1-5	—	64.7	—	67.9

*Blutplasma.* Frisches Schweineblut wurde pro ml mit 10 mg Natriumcitrat versetzt, 5 min lang bei 1000 rpm zentrifugiert und das überstehende Blutplasma abpipettiert. Das Auflösen der Kawastoffe und die Herstellung der Analysenlösung erfolgte wie beim Blutserum. Die Analyseergebnisse sind in der Tabelle IV aufgeführt. Es ist auffallend, dass sich die Kawa-Laktone in Extraktform sowohl in Blutserum wie auch in Blutplasma wesentlich besser lösen als in isolierter Form. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse der Löslichkeitsversuche in anderen, künstlich hergestellten biologischen Flüssigkeiten<sup>6</sup>.

## DANKSAGUNG

Dem Bundesministerium für Jugend, Familie und Gesundheit danken wir für die finanzielle Förderung der Untersuchungen, und Professor Hänsel für die Überlassung von Referenzsubstanzen.

## LITERATUR

- 1 R. Hänsel und H.-U. Beiersdorff, *Arzneim.-Forsch.*, 9 (1959) 581.
- 2 R. Hänsel, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 114 (1974) 1057.
- 3 L. Csupor, *Phys. Med. Rehab.*, 11 (1970) 85.
- 4 M. W. Klohs, F. Keller, R. E. Williams, M. I. Toekes und G. E. Cronheim, *J. Med. Pharm. Chem.*, 1 (1959) 95.
- 5 R. Hänsel, *Mitt. Dtsch. Pharm. Ges.*, 39 (1969) 18.
- 6 L. Csupor und W. Spaich, *Pharm. Ind.*, 33 (1971) 15.
- 7 L. Csupor und W. Spaich, *Pharm. Ind.*, 33 (1971) 900.
- 8 L. Coclers, J. Mottet, J. B. T. Stobbel und J. Parmentier, *J. Pharm. Belg.*, (1969) 415.
- 9 M. Koch, M. Piat, H. Mehri, J.-P. Saillant und H. Kornowski, *Ann. Pharm. Fr.*, 31 (1973) 133.
- 10 R. L. Young, J. W. Hylin, L. Plucknett, Y. Kawano und T. Nakayama, *Phytochemistry*, 5 (1966) 795.
- 11 L. Csupor, *Arch. Pharm.*, 303 (1970) 193.
- 12 H. Achenbach, W. Karl und SH. Smith, *Chem. Ber.*, 104 (1971) 2688.
- 13 P. Jössgang und D. Molho, *J. Chromatogr.*, 31 (1967) 375.
- 14 Fa. Finzelberg's Nachf., Andernach, Persönliche Mitteilung.