

CHROM. 15,754

QUANTITATIVE BESTIMMUNG EINER MISCHUNG AUS EXTRAKTEN ÄTHERISCHER ÖLDROGEN MITTELS HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITS- CHROMATOGRAPHIE

KARL-ARTUR KOVAR* und EBERHARD BOCK*

Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 8, D-7400 Tübingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 21. Januar 1983; geänderte Fassung eingegangen am 7. Februar 1983)

SUMMARY

Quantitative determination of a mixture of extracts of drugs from volatile oils by high-performance liquid chromatography

A mixture of fluid extracts of anis, fennel, caraway, lovage and juniper and of inspissated melissa extract was quantitated by high-performance liquid chromatography after separation of the terpenes by steam distillation and after investigation by thin-layer chromatography (two-fold development). The mixing ratio was determined via characteristic terpenes. The results are satisfactory, and the recoveries were between 94 and 105%.

EINLEITUNG

Terpenhaltige Pflanzenextrakte werden oft als Bestandteile von pharmazeutischen Zubereitungen angetroffen. Für die Qualitätsbeurteilung von Einzelextrakten und deren Mischungen in Arzneimitteln ist eine schnelle Identifizierung und Charakterisierung notwendig. Während man zahlreiche gaschromatographische Bestimmungen von Terpenen in Extrakten, Tinkturen, Lösungen¹ oder in Arzneibuchdrogen²⁻⁵ findet, ist die Literatur über hochdruckflüssigkeitschromatographische (HPLC) Untersuchungen spärlicher. So wurden Kamillen-Fluidextrakte⁶ oder Baldrian-Zubereitungen⁷ mittels HPLC charakterisiert. Die Bestimmung der Zusammensetzung einer Mischung aus Extrakten ätherischer Öldrogen wurde u.E. bisher nicht beschrieben. Dazu wurden folgende Fluid- und Spissumextrakte ausgewählt: Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt sowie Melissen-Spissumextrakt. Diese Mischung ist analytisch insofern interessant, da sie sauerstoffhaltige als auch sauerstofffreie Terpene enthält. Die Bestimmung der Zusammensetzung soll nach dünnenschichtchromatographischer (TLC) Voruntersuchung und Trennung der Terpene von störenden Begleitstoffen über charakteristische Leiterterpene erfolgen.

* Aus der Dissertation von E. Bock, Tübingen, 1983.

TABELLE I
 QUANTITATIVE HPLC-BESTIMMUNG DER EINZELEXTRAKTE IM GEMISCH ANHAND CHARAKTERISTISCHER LEITERPENE

Fluid/Spissum- extrakt	Einwaage (g)	gef. \bar{x} Mittelwert (g) (n = 5)	S.D. (g)	R.S.D. (%)	Wieder- findungsrate (%)	Bestimmt über (vgl. Tabelle II)	Theor. Gehalt (mg) Mischung	Gefunden (mg)
Anis	15.0	15.17	0.11	0.73	101.1	Anethol	1.635	1.65 ± 0.012
Fenchel	15.0	15.32	0.43	2.81	102.1	Fenchon	1.0185	1.04 ± 0.03
Kümmel	15.0	14.98	0.02	0.13	99.9	Carvon	0.459	0.458 ± 0.001
Liebstöckel	15.0	15.04	2.02	13.43	100.3	Umbelliferon	3.225 · 10 ⁻³	3.233 ± 0.4 · 10 ⁻³
Wacholder	15.0	15.80	0.32	2.03	105.3	α -Pinen	1.980	2.085 ± 0.045
Meissen	7.5	7.05	0.11	1.56	94.0	Citral	0.026	0.025 ± 0.001

EXPERIMENTELLER TEIL

Geräte

Die Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme erfolgte in N-Kammern bei Kammersättigung (20 min). Für die HPLC stand ein Flüssigkeitschromatograph 9208 der Fa. Kipp & Zonen zur Verfügung. Die Detektion erfolgte mit einem Schoeffel Zweistrahl-UV-Detektor mit variabler Wellenlänge, Spektroflow SF 770. Die Integration der Peakflächen wurde mit dem Integrator HP 3390 A durchgeführt, der direkt mit dem Detektor verbunden war.

Herstellung der Extrakte

Die Fluidextrakte wurden durch Perkolation so hergestellt, dass aus 1 Teil Droge 2 Teile Fluidextrakte gewonnen wurden⁸. Als Extraktionsmittel wurde 70% Ethanol verwendet. Zur Herstellung des Melissen-Spissumextraktes wurde zuerst ein Fluidextrakt angefertigt und daraus durch Einengen am Rotationsverdampfer die Konzentration 1:4 eingestellt.

Probenvorbereitung

Eine Extraktmischung aus je 15.0 g Fluidextrakt (Anis, Fenchel, Kümmel, Liebstöckel und Wacholder) und 7.5 g Spissumextrakt (Melissen) wurde nach Zusatz von 200 ml einer 1% Natriumchlorid-Lösung einer 90-min Wasserdampfdestillation in der Apparatur zur Bestimmung des ätherischen Ölgehaltes in Drogen nach Ph.Eur. III⁹ unterworfen. Die Destillationsgeschwindigkeit betrug 2–3 ml/min. Das übergehende Destillat wurde in 1.00 ml *n*-Heptan aufgefangen. Davon wurden zur TLC 50 µl bandförmig (15 × 6 mm) aufgetragen und zur HPLC 20 µl auf die Säule gegeben.

TLC

Sorbens: DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254, Merck, Art. Nr. 5715.

Fließmittel: (1) Dichlormethan, (2) Toluol–Ethylacetat (9:1). Zweifachentwicklung über je 10 cm mit 15 min Zwischentrocknungszeit.

Sprühreagenzien: (1) Anisaldehyd–Schwefelsäure-Reagenz: 0.5 ml Anisaldehyd werden mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konz. Schwefelsäure gemischt. (2) Molybdätdi-phosphorsäure-Reagenz: 10.0 g/100 ml Ethanol (96%).

HPLC

Hibar Fertigsäule LiChrosorb RP-18 (7 µm), 250 × 4 mm, Merck, Art. Nr. 50394.

Mobile Phase: Acetonitril–Wasser (6:4). Durchflussrate: 1.4 ml/min. UV-Detektion bei 230 nm.

Quantitative Bestimmung

Die Gehalte wurden nach Kaiser¹⁰ berechnet. Indirekte Bestimmung des Anis-Fluidextraktes (vgl. Tabelle I): Der Anetholgehalt errechnete sich nach: $x = y \cdot a/b$; a = theoretischer Gesamt-Anetholgehalt aus Anis- und Fenchel-Fluidextrakt; b = bestimmter Anetholgehalt des Anis-Fluidextraktes; y = gefundener Gesamt-Anetholgehalt in der Mischung.

Zumischmethode: Zu je 15 g Fluidextrakt bzw. 7.5 g Spissumextrakt wurden ca. 10 mg des entsprechenden Terpens (Tabelle II) vor der Wasserdampfdestillation zugemischt und die Wiederfindungsraten bestimmt.

TABELLE II

QUANTITATIVE HPLC-BESTIMMUNGEN CHARAKTERISTISCHER LEITTERPENE IN DEN EINZELEXTRAKTEN

Fluid/Spissum- extrakt	Terpen	Gehalt (%) $\times 10^{-4}$ ($n = 5$)	R.S.D. (%)	Empfind- lichkeit ($\mu\text{g/g}$)	Nachweis- grenze ($\mu\text{g/g}$)
Anis	Anethol	109 ± 1	0.9	0.454	0.0098
	Anisaldehyd	3.1 ± 0.7	12.9	1.42	0.013
Fenchel	Anethol	66 ± 0.2	0.3	0.454	0.0098
	Anisaldehyd	0.3 ± 0.01	3.3	1.42	0.013
	Fenchon	67.9 ± 1	1.5	1.218	8.288
Kümmel	Carvon	30.6 ± 0.1	0.3	1.189	0.004
Liebstöckel	Umbelliferon	0.215 ± 0.02	9.1	0.621	0.0117
Wacholder	α -Pinen	132 ± 8	6.1	2.409	1.438
Melissen	Citral	3.5 ± 0.09	2.6	0.966	0.0027

Die Empfindlichkeiten, definiert als reziproke Empfindlichkeiten (1 % Absorption) nach Welz¹¹, wurden bei einer Extinktion von 0.0044 bestimmt. Die Festlegung der Nachweisgrenzen erfolgte nach Kaiser¹².

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Terpene kommen in Fluidextrakten von ätherischen Öldrogen nur in geringen Mengen vor, da 2 Teile Extrakt 1 Teil Droge entsprechen, folglich muss man diese konzentrieren. Ein Einengen der Extrakte ist wegen der Flüchtigkeit der Terpene nicht möglich. Ebenso ist ein Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln ungeeignet, da unspezifische und störende Begleitstoffe miterfasst werden, welche die TLC-Chromatogramme überlagern oder die HPLC-Säulen verschmutzen. Aus diesem Grunde wurde zur Probenvorbereitung eine Wasserdampfdestillation durchgeführt, wie sie zur Bestimmung der ätherischen Öle in Salben verwendet worden war¹³. Als Destillierflüssigkeit wurde eine 1 % Natriumchlorid-Lösung gewählt, um die Löslichkeit der Terpene im Wasser zu senken und durch Heraufsetzung der Siedetemperatur eine etwas grössere Ausbeute zu erzielen¹⁴. Da das nach Ph.Eur. III⁹ zum Auffangen des Destillate vorgeschriebene Xylol die UV-Detektion bei 230 nm stört und während der Destillationszeit im graduierten Messrohr nach unten wanderte, wurde statt dessen *n*-Heptan verwendet. Diese Heptanlösung wurde ohne Verdünnung für die chromatographischen Untersuchungen eingesetzt.

Zur TLC Voruntersuchung wurde auf die Methode der Zweifachentwicklung zurückgegriffen, bei der man zuerst mit Dichlormethan und nach einer Trocknungszeit mit Toluol-Ethylacetat entwickelt (Fig. 1). Mit Molybdätosphorsäure werden Fenchon, Carvon, α -Pinen und Anethol mit blauer Farbe auf gelben Grund gut detektiert, Anisaldehyd erscheint als orangener Fleck auf gelben Grund. Mit Anisaldehyd/Schwefelsäure sind Citral (braungrau) und α -Pinen (grau) gut zu erkennen. Zusätzlich lassen sich Fenchon blau und Carvon hellrot anfärben. Umbelliferon wird an der hellblauen Fluoreszenz unter UV (365 nm) erkannt.

Zur HPLC-Trennung wurden mehrere "reversed-phase"-Materialien mit unterschiedlichen Fließmittelgemischen getestet. Eine gute Trennung und Identifizie-

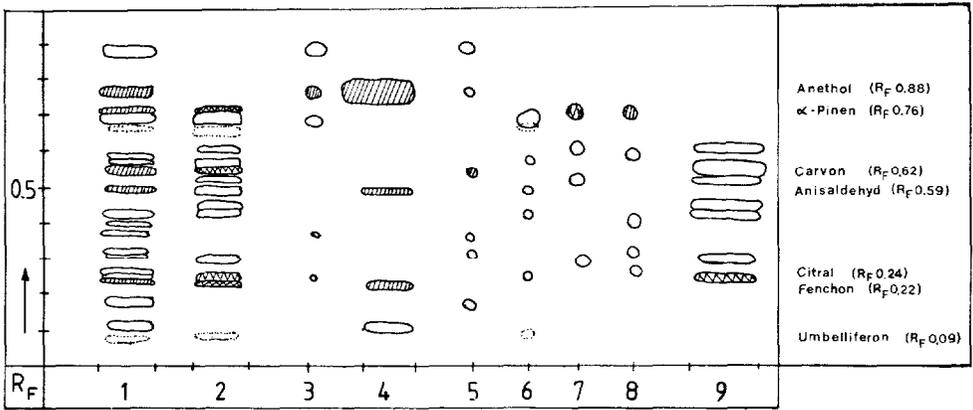


Fig. 1. TLC einer Extraktmischung; 1 und 2 = Extraktmischung 50 μ l aus 3-7 und 9; 3 = Anis-Fluidextrakt 30 μ l; 4 = Fenchel-Fluidextrakt 50 μ l; 5 = Kümmel-Fluidextrakt 30 μ l; 6 = Liebstöckel-Fluidextrakt 30 μ l; 7 und 8 = Wacholder-Fluidextrakt 30 μ l; 9 = Melissen-Spissumextrakt 50 μ l. Detektion: 1, 3-5 und 8 mit Molybdätophosphorsäure; 2, 7 und 9 mit Anisaldehyd/Schwefelsäure; 6 mit UV 254 (—) und 365 (.....).

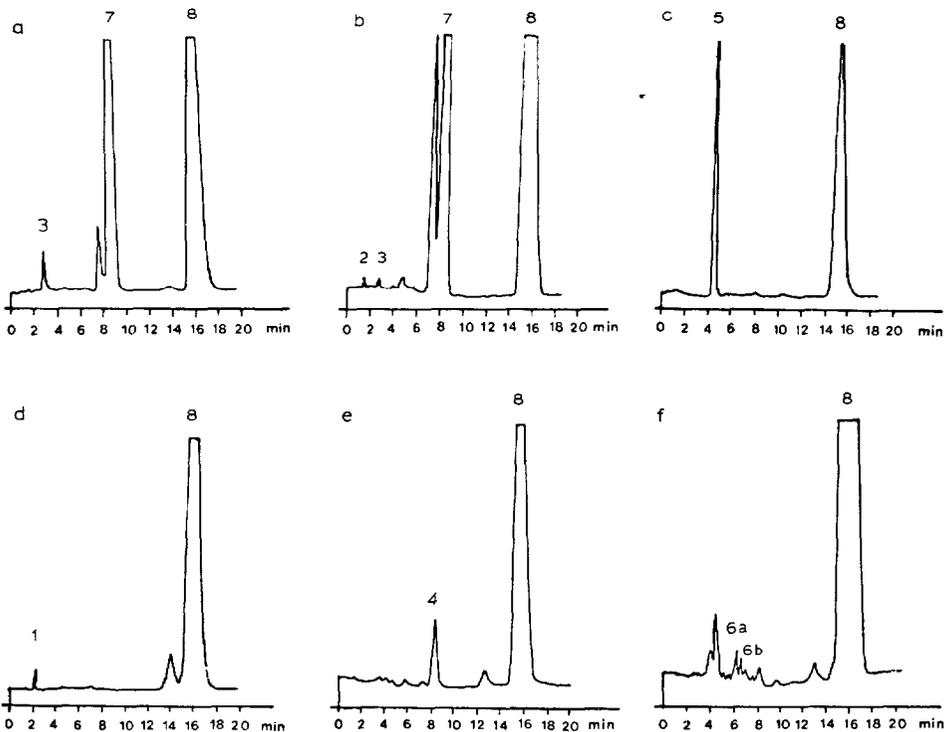


Fig. 2. HPLC von Einzelextrakten; (a) Anis-, (b) Fenchel-, (c) Kümmel-, (d) Liebstöckel-, (e) Wacholder-Fluidextrakt, (f) Melissen-Spissumextrakt. 1 = Umbelliferon; 2 = Fenchon; 3 = Anisaldehyd; 4 = α -Pinen; 5 = Carvon; 6a = Geranial; 6b = Neral; 6a + 6b = Citral; 7 = Anethol; 8 = Phthalsäure-dibutylester.

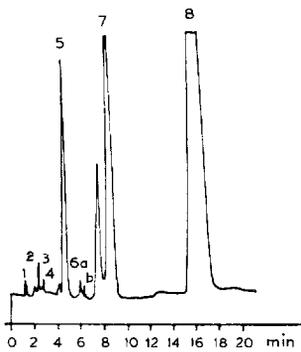


Fig. 3. HPLC einer Extraktmischung aus (a)–(f). (a)–(f) und 1–8 s. Fig. 2.

rung der eingesetzten Extrakte gelang auf RP 18 mit Acetonitril–Wasser (Fig. 2). Es wurde ausschliesslich die UV-Detektion angewendet, auch wenn man damit manche Terpen-Inhaltsstoffe wegen deren Konstitution nicht erfassen konnte. Für jeden Extrakt liess sich trotzdem ein entsprechendes “Fingerprint”-Chromatogramm erstellen. Die quantitative Auswertung des Extraktgemisches (Fig. 3) erfolgte anhand ausgewählter Terpene der Einzelextrakte, deren Gehalte zuerst einzeln bestimmt wurden (Tab. II). Als interner Standard wurde Phthalsäuredibutylester verwendet, der an einer freien Stelle im Chromatogramm erscheint und bei der Wasserdampfdestillation quantitativ (>99.9%) übergeht. Die Zuverlässigkeit der Bestimmungsmethode wurde über die Linearität des UV-Detektors und durch die Bestimmung der Wiederfindungsrate (>99.9%) mit Hilfe der Zumischmethode überprüft. Die Empfindlichkeiten lagen zwischen 0.45 und 2.4 $\mu\text{g/g}$ und die Nachweisgrenzen zwischen 2.7 ng/g und 8.2 $\mu\text{g/g}$. Die Ergebnisse zeigen, dass das gewählte Verfahren recht gut zur Bestimmung der Leiterterpene in den einzelnen Extrakten geeignet ist, obwohl relative Standardabweichungen (R.S.D.) bis zu 12% (Anisaldehyd) zu verzeichnen sind. Auf Anisaldehyd als Leitsubstanz kann verzichtet werden, nicht jedoch auf Umbelliferon (R.S.D. = 9.1%) und α -Pinen (R.S.D. = 6.1%). Leider kommt Umbelliferon in der Liebstöckelwurzel (*Levisticum radice*) nur in sehr geringer Menge vor, ist aber wegen seines Retentionsverhaltens besser als die Hauptinhaltsstoffe (Phthalide > 65%) geeignet (Fig. 2d). Ähnliches gilt für α -Pinen zur quantitativen Erfassung von Wacholder-Fluidextrakt (Fig. 2e). Die Einzelextrakte in der Mischung wurden über dieselben Leiterterpene bestimmt (Tabelle I). Der Anis-Fluidextrakt musste indirekt erfasst werden, da Anethol auch Bestandteil des Fenchel-Fluidextraktes ist. Die Ergebnisse können als zufriedenstellend, mit Wiederfindungsraten zwischen 94% (Melissen-Spissumextrakt) und 105% (Wacholder-Fluidextrakt), bezeichnet werden. Die Variationskoeffizienten (R.S.D.-Werte) lagen zwischen 0.13% (Kümmel-Fluidextrakt) und 2.81% (Fenchel-Fluidextrakt). Nur beim Liebstöckel-Fluidextrakt trat ein relativ grosser R.S.D.-Wert (13%) auf. Die Gründe für die etwas grösseren Abweichungen sowohl der Wiederfindungsraten als auch des Variationskoeffizienten dürften bei der gewählten Detektorwellenlänge von 230 nm im ungünstigen Flächen-Konzentrations-Verhältnis (α -Pinen) und im zu geringen Mengenverhältnis des Leiterterpenes zum Extrakt (Umbelliferon, Citral) liegen. Bei der Bestimmung von Umbelliferon gelangt man zudem in die Nähe des Empfindlichkeitsbereiches.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Mischung aus Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakten und Melissen-Spissumextrakt wurde nach Trennung der Terpene über eine Wasserdampfdestillation und nach dünn-schichtchromatographischer Charakterisierung (Zweifachentwicklung) hochdruckflüssigkeitschromatographisch in ihrer Zusammensetzung untersucht. Das Mischungsverhältnis wurde über charakteristische Terpene bestimmt. Die Ergebnisse können als zufriedenstellend, mit Wiederfindungsraten zwischen 94 und 105 %, bezeichnet werden.

LITERATUR

- 1 H. Glasl, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 115 (1975) 501.
- 2 H. Glasl und H. Wagner, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 114 (1974) 146.
- 3 H. Glasl und H. Wagner, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 114 (1974) 363.
- 4 H. Glasl und H. Wagner, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 116 (1976) 45.
- 5 H. Glasl und H. Wagner, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 120 (1980) 64.
- 6 R. Herrmann, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 122 (1982) 1797.
- 7 G. Tittel und H. Wagner, *J. Chromatogr.*, 148 (1978) 459.
- 8 *Deutsches Arzneibuch*, 8. Ausgabe, Wissenschaftl. Verlagsges. mbH, Stuttgart, und Govi-Verlag, Frankfurt, 1978, S. 229.
- 9 *Pharmacopoea Europea*, Vol. III, Maisonneuve S.A., 57 Saint-Ruffine, France, 1975, S. 68.
- 10 R. Kaiser, *Chromatographie in der Gasphase*, Bd. IV, Bibliographisches Institut, Mannheim, 1965.
- 11 B. Welz, *Atomabsorptionsspektroskopie*, Verlag Chemie, Weinheim, 2. Auf., 1976.
- 12 H. Kaiser, *Z. Anal. Chem.*, 209 (1965) 1.
- 13 K.-A. Kovar und A. Sakmann, *J. Chromatogr.*, 247 (1982) 356.
- 14 E. Mechler und K.-A. Kovar, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 117 (1977) 1019.