

CHROM. 16,500

## Note

### Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographische Trennung und quantitative Bestimmung von pflanzlichen Stilbenderivaten

L. GRACZA\* und P. RUFF

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

(Eingegangen am 17. November 1983)

Pflanzliche Stilbenderivate sind wegen ihrer antimikrobiellen<sup>1</sup> und mild östrogenen<sup>2,3</sup> Wirkung von phytotherapeutischem Interesse. Die quantitative Bestimmung von Stilbenderivaten erfolgte bisher auf photometrischem Wege nach Dünnschichtchromatographische Trennung<sup>4</sup>. Bei der routinemässigen Kontrolle der Stilbenderivate enthaltenden Droge *Rhei rhapontici* radix und des daraus hergestellten Arzneipräparates *Tct. Rhei rhapontici* wurde nun beobachtet, dass die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode<sup>4</sup>, bedingt durch die Lichtempfindlichkeit der Stilbenderivate (Fig. 1), nicht ausreichend ist. Eine in jeder Hinsicht zufriedenstellende Methode haben wir in einem Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)-Verfahren gefunden.

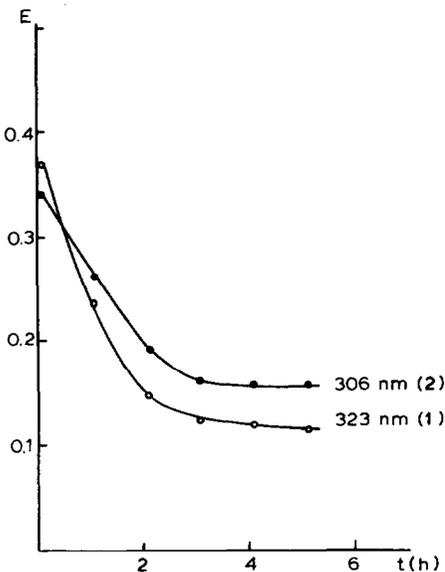


Fig. 1. Abnahme des Stilbengehaltes in einer ethanologischen Analysenlösung bei Tageslicht.

## EXPERIMENTELLER TEIL

*Apparaturen*

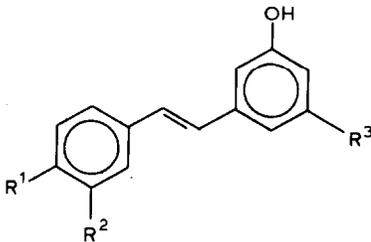
Verwendet wurden: Pumpen, Altex 110 A und Kontron LC 414; Mischkammer, Kontron; Programmer, Kontron 200; Injektor, Rheodyne 7120; Säule (250 × 4 mm I.D.), M&N Nucleosil 10- $\mu$ m RP 18, Vorsäule 40 × 4 mm; Detektor, Kontron Uvikon 725; Schreiber und Integrator, Hewlett-Packard 5840 A<sup>5</sup>.

*Mobile Phase*

Verwendet wurde ein Acetonitril-Wasser-Gradient, von 15% Acetonitril nach 1 min linear in 6 min auf 60%, nach 7 min linear in 1 min auf 80%, nach 8 min, linear auf 15% Acetonitril. Durchfluss: 2.0 ml/min; Detektion: bei 315 nm.

*Reagenzien*

Rhaponticin (1), Desoxyrhaponticin (2), Rhapontigenin (3), Desoxyrhapontigenin (4) und Tetrahydroxystilben-3-glucosid (5) (s. Formel) wurden aus *Tct. Rhei rhapontici* mit der Trockensäulenchromatographie grob getrennt und dickschichtchromatographisch isoliert. Sämtliche Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.



R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
1 OCH <sub>3</sub>	OH	O-Glu
2 OCH <sub>3</sub>	H	O-Glu
3 OCH <sub>3</sub>	OH	OH
4 OCH <sub>3</sub>	H	OH
5 OH	OH	O-Glu

*Untersuchungsmaterialien*

*Rhei rhapontici* radix wurde von der Fa. Galke bezogen, *Tct. Rhei rhapontici* von der Firma Staufen-Pharma/Göppingen hergestellt.

*Chromatographie*

*Trockensäulenchromatographie.* s. Lit. 6 und 7.

*Dickschichtchromatographie.* Sorbens: Kieselgel GF<sub>254</sub> (Merck); Schichtdicke: 1 mm; Fließmittel: Chloroform-Ethanol (70:30).

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fig. 2A zeigt ein typisches Chromatogramm eines Gemisches der fünf isolierten

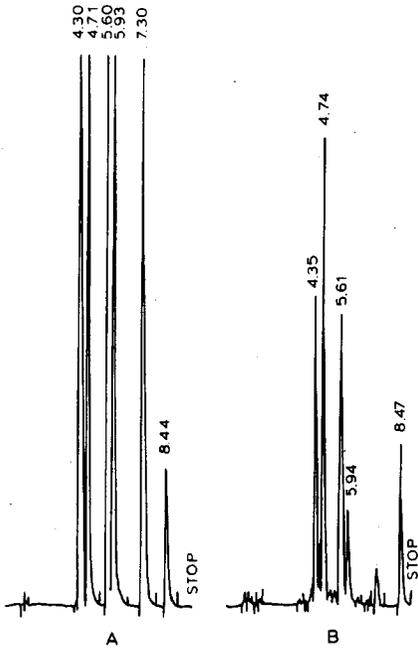


Fig. 2. Trennung der Stilbenderivate durch HPLC. (A) Referenzsubstanzen; (B) Tinktur.

Stilbenderivate (1–5). Auf die Säule wurden 20  $\mu\text{l}$  aus einer Methanol-Lösung gegeben, die pro ml 87.0  $\mu\text{g}$  1 [Retentionszeit ( $t_R$ ) 4.71 min], 61.0  $\mu\text{g}$  2 ( $t_R$  5.60 min), 44.0  $\mu\text{g}$  3 ( $t_R$  5.93 min), 35.0  $\mu\text{g}$  4 ( $t_R$  7.30 min) und 80.0  $\mu\text{g}$  5 ( $t_R$  4.30 min) enthielt. Als innere Standardsubstanz wurde 685.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zimtsäuremethylester ( $t_R$  8.44 min) verwendet.

In einer Drogenprobe von der Fa. Galke (1983) wurden über 10% Stilbenderivate gefunden. Dieser Wert liegt weit über den in der Literatur bis jetzt beschriebenen. In der Tinktur (Fig. 2B) findet man etwa ein Zehntel des Gehaltes in der Droge (Tabelle I). Neben den bisher beschriebenen Stilbenderivaten wurde aus der Droge ein neues Glykosid isoliert, das wir als 3,5,3',4'-Tetrahydroxystilben-3-D-glucosid identifizieren<sup>7</sup>.

Die Reproduzierbarkeit der Methode ist zufriedenstellend [ $V = \pm 0.66\%$  (1), 1.69% (2) und 1.51% (5)]. Die Richtigkeit des HPLC-Verfahrens wurde auch mit der Standard-Zumischmethode<sup>8</sup> (Fig. 3) kontrolliert, wobei die zugemischten Mengen quantitativ wiedergefunden werden konnten.

TABELLE I

GEHALT AN STILBENDERIVATEN IN DER DROGE UND TINKTUR

Droge/Präparat	Stilbenderivate (%)				
	1	2	3	4	5
<i>Rhei rhapontici radix</i>	4.66	2.72	0.67	0.22	2.43
<i>Tct. Rhei rhapontici</i>	0.44	0.27	0.064	0.018	0.22

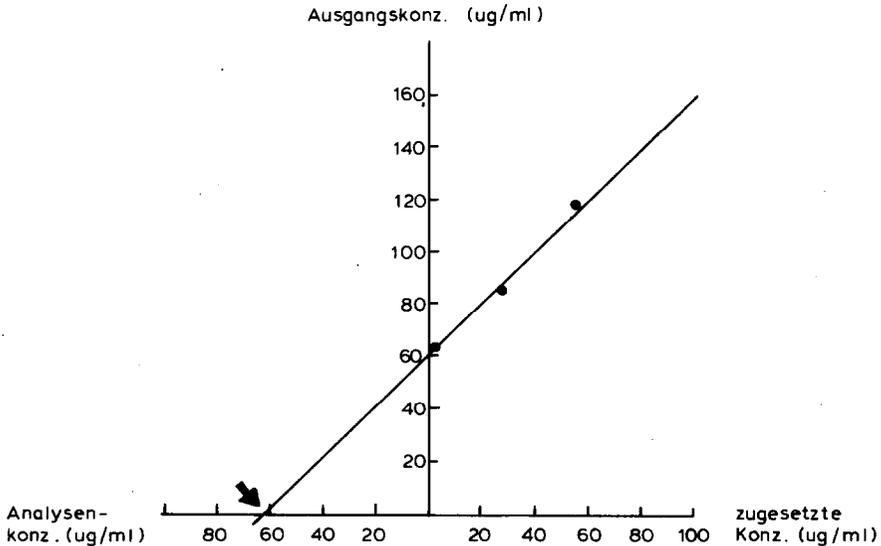


Fig. 3. Auswertung der Messergebnisse mit der Standard-Zumischmethode. ● = Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

Mit Hilfe der HPLC-Methode ist es nun möglich, die Droge und die daraus hergestellten Präparationen zu standardisieren.

#### LITERATUR

- 1 E. Rennerfeldt, *Acta Chem. Scand.*, 3 (1949) 1343.
- 2 B. Siegfried, *Pharm. Acta Helv.*, 18 (1943) 531.
- 3 K. Knörr, H. Lehr und V. Probst, *Medizinische*, (1956) 195; *C.A.*, 50 (1956) 6657.
- 4 L. Csupor, *Arch. Pharm.*, 304 (1971) 32.
- 5 L. Gracza und P. Ruff, *J. Chromatogr.*, 193 (1980) 486.
- 6 L. Csupor, *Arch. Pharm.*, 303 (1970) 681.
- 7 L. Gracza und F. Bohlmann, in Vorbereitung.
- 8 H. Böhme und K. Hartke, *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch*, Wissenschaftliche Verlags-GmbH, Stuttgart und Govi-Verlag, Frankfurt, 1978, Bd. I und II, S. 79-81.