



Doctoral Thesis

Analytical investigation of *Crataegus* species and *Passiflora incarnata* L. by high performance liquid chromatography

Author(s):

Rehwald, Anne

Publication Date:

1995

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001425759> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**Analytical investigation of *Crataegus* species
and *Passiflora incarnata* L. by
high performance liquid chromatography**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

ANNE REHWALD

Eidg. Dipl. Apothekerin
born January 3, 1965
Wettingen (AG)

Accepted on recommendation of

Prof. Dr. O. Sticher, examiner
Prof. Dr. B. Meier, co-examiner

Zürich 1995

Summary

In the last years the interest in herbal remedies increased permanently and involved a rise of the requirements concerning the quality of the products. The observance of the legal regulations calls for a serious quality control by means of appropriate, validated analytical methods.

In the presented work, hawthorn (*Crataegus spec.*) and passion flower (*Passiflora incarnata*) were investigated in detail. Since previous, mainly spectrophotometric analytical procedures for both plants are unsatisfactory due to lack of selectivity and accuracy, the aim of this work was to develop and validate modern analytical methods (HPLC) for identity and purity control as well as for the quantitative determination of flavonoids as lead compounds.

In the introduction (part I) the two medicinal plants are presented, and the difficulties of their analysis are discussed. Part II comprises three publications that arose in the course of this work, whereas in the appendix (part III) additional experiments, validation data and completing remarks and discussions can be found.

For the analysis of *Crataegus*, a HPLC fingerprint method was developed which allows the separation of the main flavonoids and enables a rapid and reliable statement concerning identity and purity. The quantitative determination of flavonoids in *Crataegus* was performed by HPLC after acid hydrolysis of a methanolic extract. The hydrolysis allows the reduction of the flavonoid pattern to the compounds vitexin and quercetin, which can be quantified by means of calibration curves. Since quercetin derivatives (flavonol-O-glycosides) and vitexin derivatives (flavone-C-glycosides) require different hydrolysis conditions, their sample preparation and HPLC determination were carried out separately. The developed hydrolysis method was validated and applied to various investigations (control of uniformity of commercial samples, seasonal variations of *C. monogyna*, comparison of herbal drug and tea preparation, comparison of various commercial preparations).

Besides, some preliminary experiments aiming at the improvement of the procyanidin analysis of *Crataegus* were carried out.

For *Passiflora*, a HPLC fingerprint method which allows the separation of the major flavone-C-glycosides was elaborated as well. Among 15 investigated commercial samples, remarkable qualitative and quantitative variations could be made out.

The quantitative assay developed for *Crataegus* was transferred to *Passiflora* and adapted. The acid hydrolysis led to a reduction to four main flavonoids

(schaftoside, isoschaftoside, isovitexin, isoorientin) which were calculated as isovitexin.

Since recent interest in *Passiflora* focused on the potential presence of harman alkaloids, and previous methods for analysis of harman alkaloids were not convincing, a selective and sensitive, validated method for trace analysis of alkaloids in *Passiflora* was developed. The sample preparation comprises several purification and concentration steps with various solid phase extraction cartridges, and the determination of alkaloids was performed by HPLC. Of totally 15 investigated commercial samples only one revealed a possible content of approximately 0.1 ppm harman, which corresponded to the limit of detection. Therefore the presence of harman alkaloids in *Passiflorae herba* can be denied, and a routine analysis of harman alkaloids is considered to be not necessary.

Zusammenfassung

Das in den letzten Jahren stetig gewachsene Interesse an pflanzlichen Heilmitteln hat die Anforderungen an die Qualität der Produkte hochgeschraubt. Die Einhaltung der festgelegten gesetzlichen Richtlinien erfordert eine seriöse Qualitätskontrolle mittels geeigneter, validierter Analyseverfahren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Weissdorn (*Crataegus*) und Passionsblume (*Passiflora incarnata*) ausführlich bearbeitet. Da bisherige, v.a. spektrophotometrische Analysemethoden für die beiden Arzneipflanzen mangels Selektivität und Richtigkeit unbefriedigend sind, war das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung und Validierung moderner Analysemethoden (HPLC) zur Identitäts- und Reinheitsprüfung sowie zur Gehaltsbestimmung der Flavonoide als Leitsubstanzen.

In der Einleitung (Teil I) werden die beiden Pflanzen vorgestellt, und es wird auf die Problematik ihrer Analytik eingegangen. Teil II umfasst drei Publikationen, welche im Laufe dieser Arbeit entstanden sind, während im Anhang (Teil III) zusätzliche Experimente, Validierungsdaten und ergänzende Bemerkungen und Diskussionen zu finden sind.

Für Weissdorn wurde eine HPLC-Fingerprintmethode entwickelt, welche eine Trennung der Hauptflavonoide erlaubt und eine schnelle und zuverlässige Aussage über Identität und Reinheit gestattet. Die Gehaltsbestimmung der

Flavonoide in Weissdorn erfolgte mittels HPLC nach saurer Hydrolyse eines methanolischen Extraktes. Die Hydrolyse ermöglicht eine Reduktion des Flavonoidmusters auf die beiden Substanzen Vitexin und Quercetin, welche mittels Eichgeraden quantifiziert werden können. Da die Quercetinderivate (Flavonol-O-glykoside) und Vitexinderivate (Flavone-C-glykoside) unterschiedlich starke Hydrolysebedingungen erfordern, erfolgte die Probenaufbereitung und HPLC-Bestimmung separat.

Die entwickelte Hydrolysemethode wurde validiert und für verschiedene Untersuchungen eingesetzt (Überprüfung der Gehaltseinheitlichkeit von Handelsmustern, saisonale Schwankungen von *C. monogyna*, Vergleich von Droge und Teezubereitung, Vergleich verschiedener Handelspräparate).

Zusätzlich wurden einige Vorversuche zur Verbesserung der Procyanidin-Analytik von Weissdorn durchgeführt.

Für Passionsblumenkraut wurde ebenfalls eine HPLC-Fingerprintmethode erarbeitet, welche die Trennung der wichtigsten Flavon-C-glykoside erlaubt. Innerhalb von 15 untersuchten Handelsmustern konnten dabei beträchtliche qualitative und quantitative Schwankungen festgestellt werden.

Die für Weissdorn entwickelte Gehaltsbestimmungsmethode wurde auf Passionsblumenkraut übertragen und angepasst. Die saure Hydrolyse führte zu einer Reduktion auf vier Hauptflavonoide (Schaftosid, Isoschaftosid, Isovitexin, Isoorientin), welche als Isovitexin berechnet wurden.

Da Passionsblumenkraut in den letzten Jahren aufgrund seines eventuellen Gehaltes an Harmanalkaloiden Aktualität erlangte, bisherige Methoden zu Harmananalytik aber wenig überzeugend waren, wurde eine selektive und empfindliche, validierte Methode zur Spurenanalytik von Harmanalkaloiden in Passionsblumenkraut entwickelt. Die Probenaufbereitung umfasste mehrere Reinigungs- und Aufkonzentrierungsschritte über verschiedene Festphasen-Extraktionssäulen, und die Bestimmung der Alkaloide erfolgte mittels HPLC. Da von insgesamt 15 untersuchten Handelsmustern nur eines einen möglichen Gehalt von 0.1 ppm Harman aufwies, was etwa der Nachweisgrenze entsprach, kann die Abwesenheit von Harmanalkaloiden in Passiflora-Handelsmustern bestätigt werden, und eine routinemässige Prüfung auf Alkaloide wird als nicht nötig erachtet.