

Untersuchungen zur Stabilität von flavonoid- und gerbstoffhaltigen Drogen



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie –
der Universität Regensburg

vorgelegt von Dietmar Heigl

2003

Untersuchungen zur Stabilität von flavonoid- und gerbstoffhaltigen Drogen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät IV
– Chemie und Pharmazie –
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Dietmar Heigl
aus Straßkirchen

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 1999 bis Oktober 2002 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie an der Universität Regensburg und wurde während dieser Zeit vom **Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM)**, Bonn, großzügig finanziell gefördert.

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. G. Franz

Promotionsgesuch eingereicht am: 09.05.2003

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2003

Prüfungsausschuß:
Prof. Dr. S. Elz (Vorsitzender)
Prof. Dr. G. Franz (Erstgutachter)
Prof. Dr. A. Göpferich (Zweitgutachter)
Prof. Dr. C. Steinem

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. G. Franz* dafür, daß er mir diese Arbeit ermöglichte und genügend Freiraum bei der praktischen Umsetzung ließ. Darüberhinaus danke ich ihm für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie der Möglichkeit, auf diversen Kongressen und Konferenzen Ergebnisse präsentieren und Erfahrungen austauschen zu können.

Besonders danken möchte ich auch Frau *N. Baschir* für ihre Mitarbeit und Engagement bei diesem Projekt; ohne ihre Unterstützung wäre das umfangreiche Penum nicht zu bewältigen gewesen.

Weiterhin bedanke ich mich bei

- den Firmen *Phytolab*, Vestenbergsgreuth, *Müggenburg*, Alveslohe und *Salus*, Bruckmühl für das zur Verfügung gestellte Drogenmaterial
- der *Fa. Pfeuffer*, Kitzingen, für die Überlassung des Tannometers zur Gerbstoffbestimmung
- Herrn *Dr. K. Mayer* und seinen Mitarbeitern für die Aufnahme der Massenspektren

sowie bei allen derzeitigen und ausgeschiedenen Mitarbeitern des Lehrstuhls Pharmazeutische Biologie für das angenehme Arbeitsklima während meiner dortigen Tätigkeit. Im Besonderen:

Frau K. Wolf, die bei Engpässen an Büromaterialien immer aushelfen konnte. Sie sorgte direkt (selbst) oder indirekt (Hund) immer dafür, daß nach Feiern nie was übrig blieb !

Herrn Dr. H. Schuhbaum, der mir die Geheimnisse der HPLC näherbrachte und mir freundlicherweise die Imbus-Schlüssel und die Nummer der Service-Hotline hinterlassen hat

Frau Dr. M. Braun, für Klatsch und Tratsch über dieses und jenes und die Motivation zum Durchhalten

Herrn M. Becker, Chico des Jahres 2000, der mich in die Geheimnisse des chattens einführte, für zahlreiche Kneipentouren und für optimalen Informationsfluß, welche Frauen nicht nur in Regensburg schön anzusehen sind (guad is beinander d' Muttl ☺)

Herrn M. Goppel, Hoffnungsträger und Partner im Stabilitätsteam, der mit den HPLC-Anlagen nicht weniger Ärger hatte und mit seinen Baldrianextrakten immer für einen Wohlgeruch im Labor sorgte.

Frau G. Brunner, A. Grashuber und H. Schmidt, die stets für eine angenehme Atmosphäre am Lehrstuhl sorgten

Herrn F. Demirci, dessen außerordentliche Hilfsbereitschaft ich sehr zu schätzen wußte. Zusammen haben wir das Motto „wir wollen nur billig“ und Geiz ist geil“ neu belebt !

Maria danke ich für ihre liebevolle Begleitung während der letzten beiden Jahre

Besonders danke ich meinen Eltern und meiner Familie für den Rückhalt und die Unterstützung in jeglicher Art

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Stabilitätsprüfung von Phytopharmaka	1
1.1.1 Besonderheiten von Phytopharmaka.....	1
1.1.2 Stabilitätsprüfung bei Phytopharmaka	4
1.2 Flavonoide und Gerbstoffe als Inhaltsstoffe von Arzneipflanzen.....	7
1.2.1 Chemie der Flavonoide	7
1.2.2 Pharmakologische Wirkungen von Flavonoiden	8
1.2.3 Resorption und Metabolismus von Flavonoiden.....	12
1.2.4 Chemie der Gerbstoffe	13
1.2.5 Pharmakologische Effekte von Gerbstoffen	14
1.2.6 Resorption und Metabolismus von Gerbstoffen	15
2. Problemstellung	16
3. Ergebnisse	18
3.1 Flavonoidhaltige Drogen.....	18
3.1.1 Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen und analytische Methodik	18
3.1.1.1 Auswahl und Zerkleinerung des Drogenmaterials	18
3.1.1.2 Lagerungsbedingungen und Packmaterial.....	22
3.1.1.3 Extraktion	23
3.1.1.4 Analytische Methodik zur Stabilitätsuntersuchung.....	25
3.1.1.5 Auswertung der Stabilitätsdaten.....	27
3.1.2 Flavonoidstrukturen und deren Retentionsverhalten	28
3.1.3 Goldrutenkraut.....	31
3.1.3.1 Allgemeines	31
3.1.3.2 Indikationen und Anwendung	31
3.1.3.3 Inhaltsstoffe	32
3.1.3.4 Stabilitätsuntersuchungen mit Goldrutenkraut - Drogenmaterialien.....	33
3.1.4 Ringelblumenblüten	37

3.1.4.1 Allgemeines	37
3.1.4.2 Indikationen und Anwendung.....	37
3.1.4.3 Inhaltsstoffe.....	38
3.1.4.4 Stabilitätsuntersuchungen mit Ringelblumenblüten-Drogenmaterialien	39
3.1.5 Passionsblumenkraut.....	42
3.1.5.1 Allgemeines	42
3.1.5.2 Indikation und Anwendung.....	42
3.1.5.3 Inhaltsstoffe.....	43
3.1.5.4 Stabilitätsuntersuchungen mit Passionsblumenkraut-Drogenmaterialien.....	44
3.1.6 Mädesüßblüten	47
3.1.6.1 Allgemeines	47
3.1.6.2 Indikation und Anwendung.....	47
3.1.6.3 Inhaltsstoffe.....	48
3.1.6.4 Stabilitätsuntersuchungen mit Mädesüßblüten-Drogenmaterialien	48
3.1.7 Birkenblätter.....	50
3.1.7.1 Allgemeines	50
3.1.7.2 Indikation und Anwendung.....	50
3.1.7.3 Inhaltsstoffe.....	51
3.1.7.4 Stabilitätsprüfung an Birkenblätter-Drogenmaterialien.....	51
3.1.8 Ruhrkrautblüten.....	55
3.1.8.1 Allgemeines	55
3.1.8.2 Indikation und Anwendung.....	55
3.1.8.3 Inhaltsstoffe.....	56
3.1.8.4 Stabilitätsuntersuchungen an Ruhrkrautblüten-Drogenmaterialien	57
3.1.9 Holunderblüten.....	58
3.1.9.1 Allgemeines	58
3.1.9.2 Indikation und Anwendung.....	58
3.1.9.3 Inhaltsstoffe.....	59
3.1.9.4 Stabilitätsuntersuchungen an Holunderblüten-Drogenmaterialien	60
3.1.10 Stiefmütterchenkraut	62
3.1.10.1 Allgemeines	62
3.1.10.2. Indikation und Anwendung.....	62
3.1.10.3 Inhaltsstoffe.....	63
3.1.10.4 Stabilitätsuntersuchungen an Stiefmütterchenkraut-Drogenmaterialien	63

3.1.11 Stabilität unter Streßbedingungen (accelerated testing).....	66
3.1.11.1 Accelerated testing bei 40°C / 75% rF (gemäß ICH-guideline).....	67
3.1.11.2 Streßtests bei erhöhten Temperaturen	71
3.2 Gerbstoffhaltige Drogen	73
3.2.1 Analytik von Polyphenolen (Gerbstoffe)	73
3.2.2 Photometrische Methoden (Konventionsmethoden).....	75
3.2.2.1 Hautpulvermethode	75
3.2.2.2 Butanol-HCl-Methode (Proanthocyanidin-Bestimmung)	80
3.2.2.3 Vanillin-Methode	83
3.2.3 Fällungsreaktionen	89
3.2.3.1 Proteinfällungen	89
3.2.3.2 Trübungsmessung von Gerbstoff-PVP-Komplexen mit der Tannometer-Methode.....	92
3.2.4 Chromatographische Verfahren	100
4. Zusammenfassung der Ergebnisse	102
5. Materialien und Methoden.....	104
5.1 Materialien	104
5.1.1 Loses Drogenmaterial.....	104
5.1.2 Verpackungsmaterial.....	105
5.1.3 Lösungsmittel und Chemikalien.....	106
5.1.4 Geräte	106
5.2 Methoden.....	108
5.2.1 Zerkleinerung des Drogenmaterials	108
5.2.2 Methoden zur Stabilitätsuntersuchung von Flavonoiden.....	108
5.2.2.1 Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes nach Ph. Eu. 2002	108
5.2.2.2 Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes nach DAC.....	109
5.2.2.3 Extraktherstellung für HPLC-Untersuchung.....	109
5.2.2.4 HPLC-Bedingungen	110
5.2.3 Methoden zur Stabilitätsuntersuchung von Gerbstoffen.....	112

5.2.3.1 Bestimmung des Gerbstoffgehaltes nach Ph. Eur. 2002	112
5.2.3.2 Bestimmung des Gerbstoffgehaltes nach der Vanillin-Methode	113
5.2.3.3 Bestimmung des Gerbstoffgehaltes mit dem Tannometer	113
5.2.3.4 Protein-Präzipitations-assay.....	114
5.2.3.5 Bestimmung des Gerbstoffgehalts nach der BuOH / HCl – Methode	115
6. Anhang	116
7. Abkürzungsverzeichnis.....	128
8. Literaturverzeichnis.....	130

1. Einleitung

1.1 Stabilitätsprüfung von Phytopharmaka

1.1.1 Besonderheiten von Phytopharmaka

Die Therapie mit pflanzlichen Arzneimitteln (rationale Phytotherapie) erfolgt nach den Regeln der Allopathie und gehört damit zu den schulmedizinischen Therapieformen. Eine Abgrenzung nach AMG §§21, 105 erfolgt zur Gruppe der

- homöopathischen Arzneimittel
- anthroposophischen Arzneimittel
- traditionell angewendeten Arzneimittel (§109a AMG),

die sehr oft ebenfalls pflanzlicher Herkunft sind.

Der Begriff „Phytopharmakon“ ist im Arzneimittelgesetz zwar nicht explizit genannt, es sind jedoch Stoffe nach AMG §3 Abs. 2 als solche anzusehen, die dort definiert sind als „Stoffe aus Pflanzen, Pflanzenteilen und Pflanzenbestandteilen in bearbeitetem oder unbearbeitetem Zustand.“[LOEW et al. (1999)] Wie alle anderen Arzneimittel unterliegen sie der Zulassungspflicht, es müssen Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der jeweiligen Präparate nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den chemisch definierten Arzneimitteln, handelt es sich beim Wirkstoff der Phytopharmaka nicht um Einzelstoffe, sondern in der Regel um standardisierte bzw. normierte Extrakte. Der Extrakt als Ganzes ist als der „Wirkstoff“ anzusehen. Je nach Kenntnisstand zum Wirkprinzip von Arzneipflanzen lassen sich Extrakte folgendermaßen einteilen:

- Extrakte, bei denen die **wirksamkeitsbestimmenden** Inhaltsstoffe **bekannt** sind und bei denen sich eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung aufstellen lässt (z.B. Anthrachinondrogen)
- Extrakte, bei denen **wirksamkeitsmitbestimmende** Inhaltsstoffe **bekannt** sind, wobei für die Gesamtwirkung aber noch weitere (möglicherweise nicht bekannte) Inhaltsstoffe verantwortlich sind (z.B. Johanniskraut)
- Extrakte, die pharmakologische Effekte zeigen, bei denen aber die **Wirkung nicht** bestimmten **Substanzen zugeordnet** werden kann (z.B. Passionsblumenkraut)

Eine Anforderung, die die Arzneimittelhersteller zu erbringen haben, ist eine gleichbleibende, hohe Qualität Ihrer Produkte zu gewährleisten. Nach §4 AMG versteht man unter Qualität die „Beschaffenheit eines Arzneimittels, die nach Identität, Gehalt, Reinheit, sonstigen chemischen, physikalischen, biologischen Eigenschaften oder durch das Herstellungsverfahren bestimmt wird.“ Anhand dieser Definition lassen sich die Besonderheiten pflanzlicher Arzneimittel und die daraus resultierenden Probleme gut erläutern. Bei botanisch nur unscharf abgegrenzten Arten kann die Identität nicht immer eindeutig überprüft werden. Weiterhin können sich die einzelnen Arten im Gehalt bestimmter Inhaltsstoffe (verschiedene Chemotypen) beträchtlich unterscheiden, was zusätzliche Angaben in den Arzneibuchmonographien neben den üblichen makroskopischen bzw. mikroskopischen Identitätsbeschreibungen erforderlich macht [WICHTL (1984)]. Die Reinheitsprüfungen bei Phytopharmaka müssen im Hinblick auf die Herkunft bzw. Art des verwendeten Ausgangsmaterials wesentlich umfangreicher ausfallen als bei synthetischen Stoffen bzw. isolierten Naturstoffen. So spielt beispielsweise die Bestimmung von Pestizidrückständen, Schwermetallen und Lösungsmittelrückständen eine wichtige Rolle. Die „sonstigen chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften“ (§4 AMG) können bei Naturprodukten verständlicherweise starken Schwankungen unterworfen sein. Die besondere Problematik für Pflanzenmaterial besteht in der Schaffung allgemein verbindlicher und akzeptierter Normen. Der Auswahl eines geeigneten Herstellungsverfahrens als einem qualitätsbestimmenden Parameter kommt besondere Bedeutung zu, zumal dadurch Schwankungen im Ausgangsmaterial bis zu einem gewissen Grad ausgeglichen werden können, jedoch dadurch alleine keine gleichbleibende Qualität garantiert werden kann [WICHTL (1984)]. Die Bestimmung des Gehaltes bereitet bei bekannten wirksamkeitsbestimmenden Substanzen, deren Gehalt eine klare Relation zur erwünschten Wirkung erkennen lässt, in der Regel keine Schwierigkeiten. Häufig ist jedoch eine Vielzahl von Verbindungen in einem komplex zusammengesetzten Gemisch chemisch ähnlicher Inhaltsstoffe an der Wirkung eines Drogenauszugs beteiligt. Art und Menge der Begleitstoffe spielen für die Qualität und therapeutische Wirksamkeit oftmals eine entscheidende Rolle [WICHTL (1984)]. Dabei kann die Bedeutung der Begleitstoffe eine große Bandbreite einnehmen. So können diese ohne einen Einfluß auf die Wirkung eines Phytopharmakons sein oder andererseits dessen Wirkung wesentlich beeinflussen. Als Beispiel sei hier die resorptionsvermittelnde Wirkung von Saponinen in vielen Drogenzubereitungen genannt [WAGNER (1999 D)]. Die entsprechenden Identitäts- und Gehaltsprüfungen sollten deshalb so angelegt sein, daß neben den wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen auch die

Zusammensetzung von Extrakten in ihrer Gesamtheit erfaßt wird. Hilfreich hierbei haben sich chromatographische Fingerprintanalysen erwiesen [LAZAROWYCH et al. (1998)], womit Informationen über eine konstante oder abweichende Zusammensetzung eines breiten Spektrums an Inhaltsstoffen gewonnen werden können. Fingerprintanalysen bieten sich vor allem für Stabilitätsuntersuchungen an, können aber auch bei Identitäts- und Reinheitsprüfungen von Nutzen sein [BAUER et al. (1993)]. Um für Drogen, bei denen die pharmakologisch wirksamen Substanzen nicht hinreichend bekannt sind, dennoch qualitätsbestimmende „Parameter“ bestimmen zu können, wurde das Konstrukt der Leitsubstanzen (Marker) geschaffen. Darunter versteht man „chemisch definierte Inhaltsstoffe oder Inhaltsstoffgruppen in Drogen und daraus hergestellten Extrakten, die zum Zweck der pharmazeutischen Qualitätssicherung (Identität, Reinhalt, Gehalt, Stabilität) fiktiv die Rolle von wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen übernehmen [STEINEGGER et al. (1999 C)]. Die Auswahl von Leitsubstanzen für Gehaltsbestimmungen erfolgt nach dem Hauptkriterium einer leichten und eindeutigen Quantifizierbarkeit und muß grundsätzlich als Hilfsmittel betrachtet werden. Eine Einschätzung und Beurteilung von Präparaten anhand von Leitsubstanzen ist nicht sinnvoll, weswegen diese bei den jeweiligen Arzneimitteln auch nicht deklariert sind. Besondere Schwierigkeit bereitet die Auswahl von Leitsubstanzen für Stabilitätsuntersuchungen. HEFENDEHL, LANDER (1984) empfehlen, gemäß der Modellvorstellung des schwächsten Gliedes einer Kette, einen besonders labilen Stoff bzw. Stoffgruppe als Leitstruktur auszuwählen. Diese Aussage sollte kritisch hinterfragt werden, da eine wenig stabile Leitsubstanz möglicherweise nicht oder nur wenig zur Gesamtwirkung eines Extraktes beiträgt. Die Haltbarkeitsdauer eines Produktes würde in der Folge auf einen zu kurzen Zeitraum beschränkt werden. Andererseits bedeutet eine starke Abnahme von Leitsubstanzen, daß sich der Gesamtzustand eines Arzneimittels verändert hat. HANKE (1990) gibt zu bedenken, ob der Abbau eines Inhaltsstoffes in beliebigem Ausmaß tolerierbar ist, wenn nur der geforderte Mindestgehalt nicht unterschritten wird. Dennoch dürfte diese Vorgehensweise ihre Berechtigung haben, solange keine Alternativmethoden gefunden sind [HEFENDEHL, LANDER (1984)]. Deswegen sind vor allem die pharmazeutischen Hersteller gefordert, das Hilfskonstrukt der Leitsubstanzen nicht als Ist-Zustand festzuschreiben, sondern es mit neuen Forschungsergebnissen zu wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen weiterzuentwickeln. Eine Notwendigkeit für das Festlegen von Markersubstanzen bei Stabilitätsprüfungen sieht auch KOLKMANN (2002), wonach Veränderungen von chromatographischen „Fingerprints“ mit Augenmaß betrachtet werden sollten, und oberstes Ziel ein Sicherstellen der Wirksamkeit von Präparaten ist.

In Drogen- bzw. Extraktmonographien von Ph. Eur., DAB, DAC, sowie den Standardzulassungen und Aufbereitungsmonographien der Kommission E sind Lagerhinweise relativ unpräzise formuliert und entsprechen folgenden allgemeinen Lagerempfehlungen für pflanzliche Drogen:

- vor Licht geschützt lagern
- trocken lagern
- kühl lagern (d.h. nicht über 25°C)

Eine Lagerung unter Lichtschutz und nicht zu hohen Temperaturen (< 25°C) ist für nahezu alle Drogen von Bedeutung, da Lichteinfluß vor allem bei Blatt- und Blütendrogen das Ausbleichen fördert. Erhöhte Temperatur katalysiert chemische Reaktionen und führt zu Verlusten an flüchtigen Inhaltsstoffen [STEINEGGER et al. (1999 A), KIEFL (1998)]. Eine zu hohe Luftfeuchtigkeit fördert den mikrobiellen Befall des Drogenmaterials und beschleunigt enzymatische Abbaureaktionen.

1.1.2 Stabilitätsprüfung bei Phytopharmaka

Als Haltbarkeit von Arzneimitteln ist definiert, daß deren Qualität über den gesamten Verwendungszeitraum bei üblichen oder genau vorgeschriebenen Lagerbedingungen gewährleistet sein muß, wobei der Konstanz der Inhaltsstoffe d.h. der Stabilität von Inhaltsstoffen besondere Bedeutung zukommt [HÄNSEL (1999 D)]. Nach der APV-Richtlinie über „Haltbarkeit und Lagerung von Arzneimitteln“ bedeutet Haltbarkeit die „gleichbleibende Qualität eines Fertigarzneimittels über die projektierte Haltbarkeitsperiode und zwar sowohl in galenischer, physikalischer, chemischer, biologischer als auch mikrobiologischer Hinsicht, insbesondere seinem Wirkstoffgehalt, seiner Wirkstoff-Freigabe und seiner Reinheit.“[GRIMM (1985)]

Haltbarkeitsuntersuchungen müssen sich daher auf folgende Parameter beziehen:

- Sinnesprüfungen (organoleptische Prüfungen) von Aussehen, Geruch, Geschmack
- Physikalische Stabilität (Stabilität der galenischen Form)
- Mikrobiologische Stabilität (Keimzahl)
- Chemische Stabilität (Gehalt von Wirkstoffen, Leitsubstanzen, Zersetzungspprodukten)

[nach STEINIGEN (1984)]

Haltbarkeitsfristen von pflanzlichen Fertigarzneimitteln werden nach entsprechenden Stabilitätsstudien (Haltbarkeitsprüfungen) festgelegt; dabei darf der Gehalt nicht unter 90%

des deklarierten Gehaltes gesunken sein [CPMP/QWP/556/96 (1998)]. Der Zweck von Stabilitätsstudien [vgl. KOMMANABOYINA et al. (1999)] liegt darin, Aussagen über

- die Eignung unterschiedlicher Packmittel
- die Lagerbedingungen (v.a. von Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Licht)
- mögliche labile Substanzen und Abbauprodukte
- Möglichkeiten zur Stabilisierung von Fertigprodukten (z.B. Zusatz von Antioxidantien, Konservierungsmitteln etc.)

zu erhalten.

Das heute für alle pharmazeutischen Hersteller in Europa verbindliche Regelwerk bzgl. Qualitäts- und Stabilitätsanforderungen stellen die ICH-Guidelines dar [KRÄMER (1996)]. Für Stabilitätsuntersuchungen an bestehenden chemisch-synthetischen Wirkstoffen und Produkten daraus, existiert die Vorschrift CPMP/QWP/556/96 (1998) des Committee for Proprietary Medicinal Products der obersten Europäischen Gesundheitsbehörde EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), London. Die wichtigsten Vorschriften daraus, wie Stabilitätsstudien durchzuführen sind, werden in folgender Übersicht (Tab. 1) zusammengefaßt:

Lagerbedingungen	Langzeittest (long term testing) bei $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 60 % rF $\pm 5\%$ Streßtest (accelerated testing) bei $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 75 % rF $\pm 5\%$
Prüfumfang bei Wirkstoffen	Option a: Langzeittest und Streßtest von zwei Produktionschargen jeweils über 6 Monate Option b: Langzeittest an drei Pilotchargen über 12 Monate und Streßtest über 6 Monate
Prüfumfang bei Fertigarzneimitteln	a) bei unkritischen Darreichungsformen und bekanntermaßen stabilen Wirkstoffen zwei Pilotchargen über 6 Monate im Streß- und Langzeittest b) bei kritischen Darreichungsformen (z.B. Retardarzneiformen) und bekanntermaßen instabilen Wirkstoffen drei Pilotchargen über 6 Monate im Streßtest und 12 Monate im Langzeittest
Prüfintervalle	3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 Monate
Ziel der Prüfungen	<ul style="list-style-type: none"> - Ermittlung von physikalischen Instabilitäten - Ermittlung von instabilen Inhaltsstoffen bzw. Abbauprodukten - Festlegung von Lagerungs- und Transportbedingungen - Festlegung einer „re-test period“

Instabilität definiert als:	<ul style="list-style-type: none"> - Gehalt unter 95% des Ausgangswertes - Inhaltsstoffe bzw. Abbauprodukte außerhalb der Spezifikation - pH-Wert außerhalb der Spezifikation - Freisetzung außerhalb der Spezifikation - Aussehen bzw. physikal. Eigenschaften außerhalb der Spezif.
------------------------------------	--

Tab. 1: Ausgewählte Vorschriften der ICH-Guideline CPMP/QWP/556/96 bei Stabilitätsprüfungen

Spezifische Qualitätsanforderungen an pflanzliche Arzneimittel sind in der „Note for Guidance“ CPMP/QWP/2819/00 (2001) festgelegt. In diesen Regularien wird pflanzlichen Präparaten, falls wirksame Inhaltsstoffe nicht bekannt sind, eine Schwankungsbreite von $\pm 10\%$ zugestanden. Bei HMP (Herbal Medicinal Products) mit bekannten Wirkstoffen, gelten dieselben Grenzen wie für chemisch-synthetische Arzneistoffe, nämlich $\pm 5\%$. Seit Juli 2001 wurde mit einer modifizierten Fassung der Guideline CPMP/QWP/2819/00 (2001) ein Passus aufgenommen, nach dem Stabilitätsprüfung an Pflanzenprodukten grundsätzlich in Übereinstimmung mit der „Note for guidance on existing drug substances and related finished products“ stehen sollte. Die erwähnten Guidelines müssen nicht zwingend im exakten Wortlaut beachtet werden, sondern lassen den Antragstellern und Behörden grundsätzlich einen gewissen Handlungsspielraum. Der Wortlaut der Präambel, wonach es nicht immer notwendig ist, die Vorschriften genau einzuhalten, wenn wissenschaftliche Gründe ein anderes Vorgehen verlangen und Formulierungen wie „should be determined“, „unless otherwise justified“, „reasons for using alternative approaches“ erlauben es, Gesamtdatenlage und Besonderheiten eines jeden Arzneimittels zu berücksichtigen. Da trotz gegebener Interpretationsmöglichkeit der ICH-Guidelines diese den HMP nicht in allen Punkten gerecht werden, wird derzeit von verschiedenen Herstellern pflanzlicher Arzneimittel an einer neuen Richtlinie gearbeitet, die besser auf die speziellen Bedürfnisse dieser Produkte zugeschnitten ist. Ein Entwurf ist von einem Expertengremium der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller (FAH) [VEIT (2002)] publiziert.

Folgende Besonderheiten bei der Stabilitätsprüfung von HMPs sind darin berücksichtigt:

- eine Definition einzelner Abbauprodukte ist, im Gegensatz zu chemisch definierten Stoffen, in vielen Fällen nicht möglich, da es sich bei Pflanzenextrakten um komplexe zusammengesetzte Systeme handelt, bei denen die wirksamen Bestandteile oft nicht bekannt sind

- Streßtests werden aufgrund mangelnder Daten über Abbauwege bzw. Abbauprodukte nur bei bekannten Inhaltsstoffen mit anerkannter therapeutischer Wirksamkeit als hilfreich erachtet. Bei Vorliegen von Stabilitätsdaten zweier Chargen über 24 Monate (long term testing) sollte man auf die Durchführung von Streßtests (accelerated testing) verzichten können.
- für hochlabile bzw. flüchtige Inhaltsstoffe sollten mit entsprechender Begründung die Toleranzgrenzen erweitert werden dürfen

[nach LANG (2002)]

1.2 Flavonoide und Gerbstoffe als Inhaltsstoffe von Arzneipflanzen

Die Bezeichnung „Flavonoid“ leitet sich historisch betrachtet vom lat. Wort *flavus* (=gelb) ab. Diese Bezeichnung röhrt daher, daß man früher die gelben Säfte bestimmter Pflanzen (z.B. *Quercus tinctoria* BARTR., *Morus tinctoria* L.) zum Färben von Wolle und Baumwolle verwendet hat. Nach Konstitutionsaufklärung dieser Pigmente wurden sie unter der Bezeichnung „Flavonoide“ zusammengefaßt, obwohl bei weitem nicht alle Vertreter dieser Gruppe gelb gefärbt sind.

Flavonoide kommen bei nahezu allen höheren Pflanzen als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe v. a. in Blättern und Blüten vor. Sie fehlen bei Bakterien, Pilzen und im gesamten Tierreich. Zur Gruppe der Flavonoide zählen auch die Anthocyanidine, Chalkone, Isoflavone und Catechin-Derivate. Bis heute wurden mehr als 4000 Verbindungen dieser Stoffklasse identifiziert und es werden fortlaufend weitere Strukturen entdeckt, die den Flavonoiden zuzuordnen sind. [HARBORNE et al. (1994)]

Als biologische Funktion von Flavonoiden in den sie bildenden Pflanzen werden die Kontrolle von Wachstumsvorgängen, Beteiligung am Oxidoreduktionssystem der Zellen, Schutz vor Infektionen und die Anlockung von Insekten diskutiert [WAGNER (1999 A)].

1.2.1 Chemie der Flavonoide

Gemeinsame Grundstruktur dieser Verbindungen sind zwei durch eine C₃-Brücke miteinander verbundene aromatische Ringe (siehe Abb. 1). Ring A weist das Substitutionsmuster des Phloroglucins auf; Ring B ist gewöhnlich in meta- bzw. para-Stellung hydroxyliert (1). Die C₃-Brücke weist unterschiedliche Oxidationsgrade auf (2). Die in Position 3 vorhandene OH-Gruppe kann auch fehlen (3). Substituenten in den Positionen 7 und 8 kommen ebenfalls vor

und sind meist C-glykosidisch gebundene Zucker (4). Desweiteren existieren auch prenylierte Verbindungen mit einem Isoprenrest in Position 8, die für Vertreter der Gattung *Epimedium* charakteristisch sind [BÖDDEKER (1995)]. Alle im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen können frei, methyliert oder glykosyliert sein. Eine unterschiedlich gestaltete C₃-Kette bestimmt weitgehend das analytische Verhalten und dient der Einteilung in Untergruppen. (siehe hierzu Abschnitt 3.1.2)

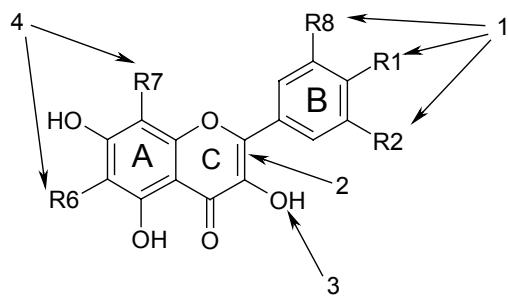


Abb. 1: Flavonoid-Grundstruktur

Biosynthetisch erfolgt der Aufbau der Grundstruktur aus einem Molekül aktivierter p-Cumarsäure, die aus dem Shikimat-Weg stammt, und drei Molekülen Malonyl-CoA (Polyketid-Bildung). Nach Zyklisierung entsteht ein Chalkon (ringoffenes Flavanon), das enzymkatalysiert zu einer ersten Flavonoid-Grundstruktur, dem Flavanon Naringenin, zyklisieren kann. Die Bildung von weiteren Verbindungen dieser Stoffklasse ist in folgendem Formelschema dargestellt (Abb. 2, S. 9) [RIMPLER (1999)]

1.2.2 Pharmakologische Wirkungen von Flavonoiden

Bedingt durch die Vielzahl natürlich vorkommender Flavonoide mit den verschiedenartigsten Strukturen, finden sich Publikationen zu einer großen Bandbreite an pharmakologischen Wirkaspekten dieser Substanzklasse. Ursprünglich bezeichnete man Flavonoide als Vitamin P-(Permeabilitäts-) Substanzen, da man von einer essentiellen Bedeutung dieser Pflanzeninhaltsstoffe für den menschlichen Organismus ausging. Zu dieser Annahme kam man, als Untersuchungen an Zitrusfrüchten gezeigt hatten, daß das darin enthaltene Flavonoidgemisch die Kapillardurchlässigkeit und Kapillarbrüchigkeit (antihämorrhagische Wirkung) herabsetzen. Da echte Mangelerscheinungen aber niemals beobachtet wurden, dürfte eine Zuordnung zu den Vitaminen nicht korrekt sein [WAGNER (1999 A)].

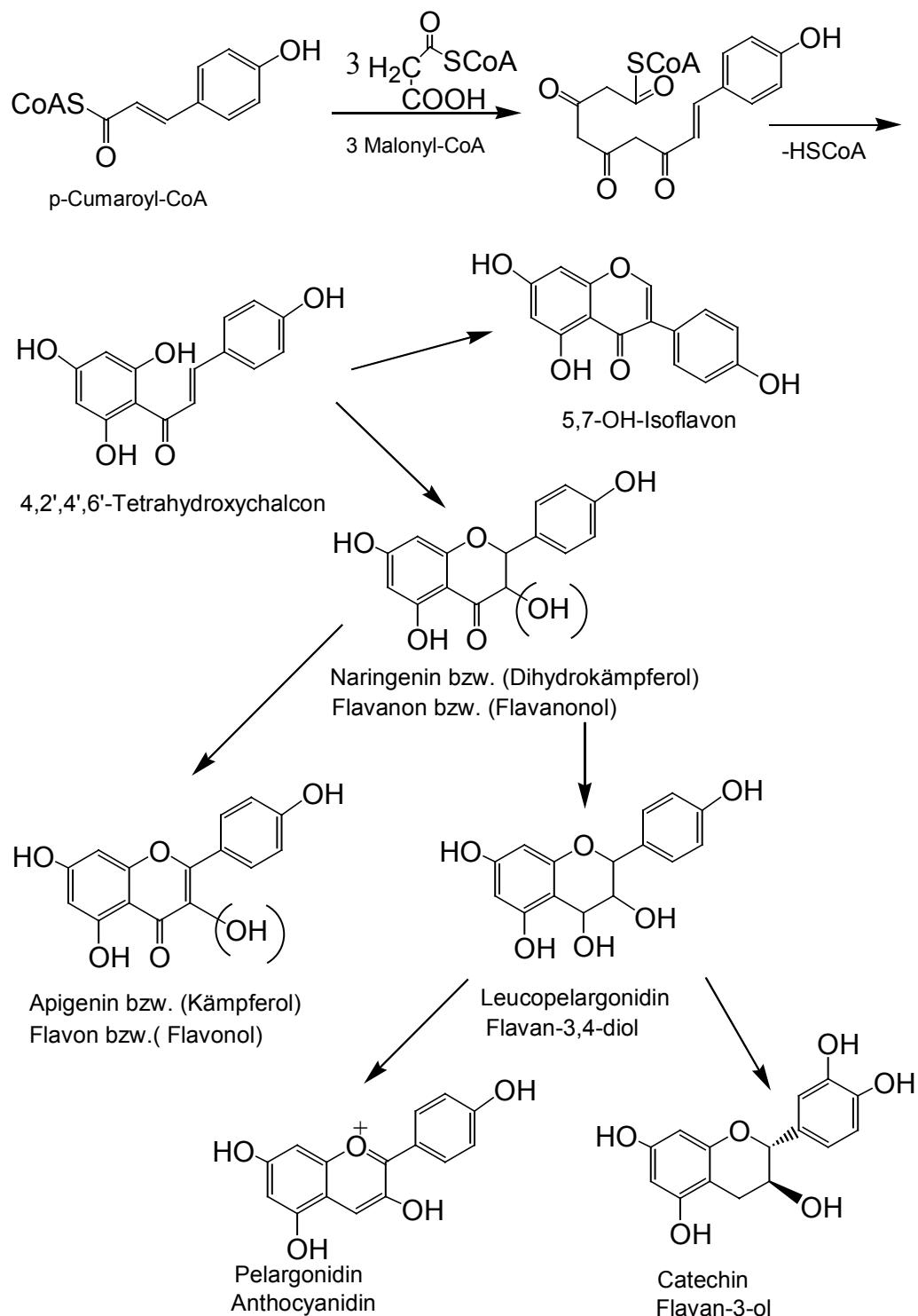


Abb. 2: Biosynthese-Weg von Flavonoiden und davon abgeleiteten Verbindungen [nach RIMPLER (1999)]

Umfassende Übersichtsartikel zu Flavonoidwirkungen sind bei SPILKOVÁ (1988), HUBÍK(1992) zu finden. Ein kurzer Abriß über die unterschiedlichen Flavonoidwirkungen wird im folgenden gegeben.

Wirkung auf Blutkapillaren: Die bereits erwähnte Wirkung auf die Kapillarpermeabilität (kapillarabdichtende Wirkung) konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen belegt werden [FELIX (1984), GABOR (1987)]. Therapeutisch kommen partialsynthetische Rutinderivate wie Troxerutin und O-(β -hydroxyethyl)-rutosid (Venoruton®) bei Varikosis unterschiedlicher Genese, chronisch-venöser Insuffizienz und damit verbundenen Stauungszuständen zum Einsatz [vgl. ROTE LISTE (2003)].

Wirkung auf das kardiovaskuläre System: Quercetin und Rutin zeigen eine, die Kontraktionskraft des Herzens erhöhende, pos. inotrope und die Herzfrequenz senkende, neg. chronotrope Wirkung [OCCHIUTO et al. (1986)]. Darüberhinaus zeigen bestimmte Flavonoide hypotensive und antiarrhythmische Wirkungen. Heute kommen bei leichten Formen von Herzinsuffizienz (NYHA I und II Stadien) u. a. Präparate aus Crataegus-Extrakten zur Anwendung. Dabei zeigte sich, daß isolierte Flavonoide aus *Crataegus sp.* qualitativ und quantitativ anders wirken als der Gesamtextract. Dies macht deutlich, wie wichtig in manchen Fällen das Zusammenspiel verschiedener Inhaltsstoffe ist und liefert eine Begründung dafür, einen definierten und standardisierten Gesamtextract als den „Wirkstoff“ zu deklarieren [SPILKOVÁ (1988)].

Antiphlogistische Wirkung: Eine antientzündliche Wirkkomponente von Flavonoiden ist seit langem bekannt und war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. So ließ sich in neueren Studien zeigen, daß diese den Arachidonsäure-Metabolismus beeinflussen. Flavonoide setzen die Bildung von Entzündungsmediatoren (v.a. Prostaglandin E₂ und Leukotrien B₄) durch Hemmung von Cyclooxygenase und Lipoxigenase herab [MASCOLO et al. (1988)]. Eine Hemmung der 12-Lipoxygenase, die möglicherweise an das Vorhandensein einer Catechol-Struktur am Flavonoid-Molekül gebunden ist, konnte FERRÁNDIZ (1990) zeigen.

Spasmolytische Wirkung: Flavonoide in Kamillenblüten-Extrakten (wie Apigenin und Kämpferol) wirken, neben vorhandenen Terpenkohlenwasserstoffen, spasmolytisch auf die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltrakts [ACHTERRATH-TUCKERMANN et al. (1980)]. Durch Prostaglandine oder Leukotriene hervorgerufene Spasmen am Meerschweinchenileum konnten durch Flavonoide wie Apigenin, Quercetin und Kämpferol antagonisiert werden [CAPASSO et al. (1991)].

Hepatoprotektive Wirkung: Flavolignane der Mariendistel (Silybin, Silychristin, Silydianin) werden hepatoprotektiv bei Fettleber, Leberzirrhose und akuten Leberintoxikationen (z.B. Knollenblätterpilzvergiftung) eingesetzt. Die Leberschutzwirkung des Silymarin-Komplexes beruht u. a. auf einer Stimmulierung der rRNA-Synthese und einer damit verbesserten Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten [MACHICAO et al. (1988)].

Antiallergische Wirkung: Verschiedene Flavonoide, u. a. Quercetin und Chrysin, inhibieren die Histaminfreisetzung auf Mukosamastzellen des Ratten-Dünndarms. Quercetin, dessen Struktur als Modell für den mastzellstabilisierenden Wirkstoff Cromoglicinsäure diente, zeigt hier die stärkste Wirkung [SPILKOVÁ (1992)]. Versuche an menschlichen basophilen Granulozyten bestätigten die Hemmung der Histaminfreisetzung durch Flavonoide [PEARCE (1984)].

Hypoglykämische Wirkung: Im Tierversuch ließ sich eine blutzuckersenkende Wirkung von Quercetin und Quercitrin nachweisen, während Rutin kaum wirksam war [AMMAR et al. (1987)]. Andere Studien belegen ebenfalls die hypoglykämische Wirkung verschiedener Flavonole, mit Ausnahme von Rutin und knüpfen die Wirksamkeit an das Vorhandensein eines Chromonrings [SPILKOVÁ (1992)].

Antimikrobielle und antivirale Wirkung: Bei den Flavonoiden wurden in zahlreichen Untersuchungen antibakterielle, antivirale, antifungale und Antiprotozoen-Aktivität nachgewiesen. So wirken Flavanone aus der Rinde von *Erythrina sigmoidea* (*Eleagnaceae*) gegen grampositive Bakterien [BIYITI et al. (1988)]. Gegen den Schimmelpilz *Cladosporium cucumerinum* wirken Flavonoide aus *Helichrysum nitende* bzw. *Erythrina berteroana* [TOMAS-BARBERAN et al. (1988), MAILLARD et al. (1987)]. Ein Zusatz von Quercetin und Naringenin in Zahnpasten verhindert das Wachstum vieler gramnegativer Erreger und von Aktinomyceten in der Mundhöhle [AMMAR et al. (1990)]. Viele Flavonoide wirken gegen die Replikation bestimmter Viren (z.B. Herpes simplex, Polio) [SPILKOVÁ (1992)].

Darüberhinaus sind die schwach **östrogene Wirkung** von Isoflavonen und **antineoplastischen** [BÖDDEKER (1995)], **aquaretischen** [BORMANN (2000)] **und antiulcerogenen** Eigenschaften zu erwähnen. Ein Effekt, der in neuerer Zeit immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses gerückt ist, sind deren **antioxidative Eigenschaften** (Radikalfänger-Eigenschaften) [DEHMLOW (1996)].

Gerade die Laienpresse hebt häufig zellschützende, antiatherosklerotische und anticarcinogene Wirkungen aufgrund der antioxidativen Eigenschaften der „Bioflavone“ hervor. Die oft gepriesene Wirkung der in Rotwein enthaltenen Flavonoide gegen Herzinfarkt und die

antioxidativen Eigenschaften von Flavonoiden in Gemüse [CHU et al. (2000)] seien hier als ein Beispiel genannt. Struktur-Wirkungsbeziehungen bzgl. der antioxidativen Aktivität von Flavonoiden wurden von BURDA, OLESZEK (2001) aufgestellt. [vgl. RICE-EVANS et al. (1996)]

1.2.3 Resorption und Metabolismus von Flavonoiden

Bei Betrachtung der vielfältigen Wirkungen von Flavonoiden taucht zwangsläufig die Frage nach der Bioverfügbarkeit auf, d.h. in welchem Umfang diese resorbiert und in welcher Form sie im Körper wirksam werden können. Resorption und Metabolismus von Flavonoiden wurden vielfach untersucht, erste Untersuchungen dazu stammen aus den 50er Jahren [CLARK et al. (1950)]. Die bisherigen Ergebnisse lassen jedoch keinen eindeutigen Schluß zur Bioverfügbarkeit zu. Eine Zusammenfassung der Daten von HEILMANN, MERTFORT (1998 A, B) liefert folgende Erkenntnisse:

- Flavonglykoside werden stets im Darm (Kolon) von der Bakterienflora in Aglyka und Zucker gespalten
- Flavonoidaglyka dürften zu einem geringen Teil resorbiert werden, zu einem größeren Teil aber durch die Darmbakterien in Bruchstücke gespalten werden
- Der bakterielle Abbau von Flavonoiden erfolgt zum Großteil zu Phloroglucin und Phenolcarbonsäuren wie 4-Hydroxyphenylpropionsäure, 4-Hydroxyzimtsäure, 4-Hydroxybenzoësäure, Hydroxyphenylessigsäure-Derivaten
- Vollständig resorbierte Flavonoide kommen als Phase-II-Metaboliten im Humanplasma vor und werden renal in sulfatiertes bzw. glukuronidierter Form ausgeschieden

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich für Flavonoide bei „*in vitro*“-Tests und im Tierexperiment zahlreiche Effekte belegen lassen, daß die Metaboliten aber bisher nicht systematisch auf ihre Wirkung untersucht wurden. Nur wenige aussagekräftige klinische Studien am Menschen sind vorhanden, die die festgestellten Befunde ausreichend belegen könnten [DINGERMANN et al. (2003 A)].

1.2.4 Chemie der Gerbstoffe

Der Begriff „Gerbstoff“ röhrt ursprünglich daher, daß bestimmte Pflanzenextrakte zum gerben von Tierhäuten und damit zur Lederherstellung verwendet wurden. Pflanzliche Gerbstoffe sind in der Regel wasserlösliche hochmolekulare phenolische Verbindungen, die mit Proteinen wasserunlösliche Fällungen ergeben. Eine Einteilung kann erfolgen in

- hydrolysierbare Gerbstoffe, die mit verdünnten Säuren vollständig spaltbar sind (Gallotannine, Ellagitannine; Abb. 4, 5)
- kondensierte Gerbstoffe, die bei Säurebehandlung polymerisieren und nur zum Teil in kleinere Moleküle (Anthocyanidine) gespalten werden (Procyanidine, s. Abb. 3)
- komplexe Gerbstoffe, die aus Strukturelementen beider Gerbstoffklassen zusammengesetzt sind [nach RIMPLER (1999 B)]

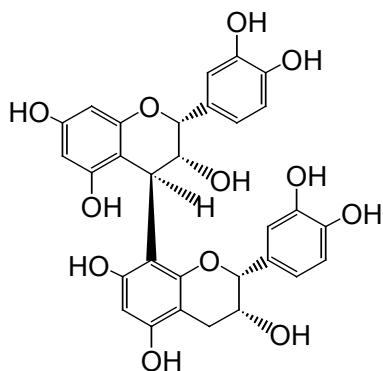


Abb. 3: Procyanodin B₂

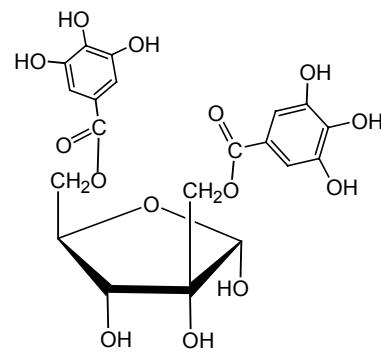


Abb. 4: β-Hamamelitannin

Zu den hydrolysierbaren Gerbstoffen zählen zum einen die Gallotannine, die Ester mit verschiedenen Zuckern als Alkoholkomponente und Gallussäure oder Gallussäuredepsiden als Säurekomponente (s. Abb. 4) darstellen. In den Ellagitanninen ist Hexahydroxydiphensäure esterartig mit Zuckern (meist Glucose) verknüpft. Nach Hydrolyse entsteht durch Lactonbildung die Ellagsäure (Abb. 5), die diesem Gerbstofftyp den Namen gegeben hat [RIMPLER (1999 B)]

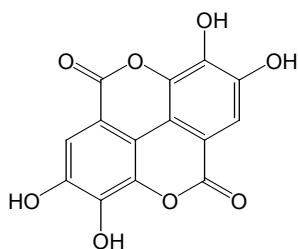


Abb. 5: Ellagsäure

Kondensierte Gerbstoffe bestehen aus Flavan-3-ol-Einheiten, die über meist (4,8) und (4,6) C-C-Bindungen verknüpft sind. Catechin/Epicatechin, die sich nur durch die Stereochemie an C₂ und C₃ unterscheiden, kommen als häufigste Monomere vor. Die einzelnen Catechineinheiten sind zu Oligomeren (Polymerisationsgrad <8) oder Polymeren verknüpft, wobei Procyanidine mit bis zu acht Catechineinheiten gut wasserlöslich sind und adstringierende Eigenschaften besitzen, während höher kondensierte Procyanidine zunehmend schlechter wasserlöslich sind und schließlich als sog. Phlobaphene (=Gerbstoffrote) vorliegen können. Diese Phlobaphenbildung tritt beim Trocknen und Lagern durch Kontakt mit Luftsauerstoff und durch Enzymtätigkeit ein. Phlobaphene, die nicht mehr adstringierend wirken, besitzen eine rote bis braun-schwarze Farbe und sind für die Dunkelfärbung vieler Wurzel- und Rindendrogen verantwortlich [STEINEGGER et al. (1999 E)].

Gerbstoffe können aufgrund ihrer reaktiven funktionellen Gruppen und durch Verknüpfung von Gallussäurederivaten mit Catechinderivaten komplexe Strukturen darstellen, die analytisch schwer zu erfassen sind. Auf mögliche Nachweisreaktionen und Gehaltsbestimmungsmethoden wird im Kapitel 3.2 näher eingegangen. Charakteristisches Merkmal aller Gerbstofftypen sind Arylreste mit freien Hydroxylgruppen, die mit anderen Molekülen in Wechselwirkung treten können. Besonders mit Proteinen können über Wasserstoffbrückenbindungen, durch hydrophobe Wechselwirkungen und aufgrund von kovalenten Bindungen reversible oder irreversible Assoziate entstehen.

1.2.5 Pharmakologische Effekte von Gerbstoffen

Die Wechselwirkungen mit Proteinen der Schleimhaut werden vielfach therapeutisch genutzt. Hauptanwendungsgebiete von Gerbstoffen stellen Durchfallerkrankungen und Entzündungen des Mund- und Rachenraumes dar. Aufgrund ihrer adstringierenden Eigenschaften wirken sie schleimhautabdichtend bzw. entzündungshemmend und wundheilungsfördernd [SCHOLZ (1994), SCHOLZ (1989)]. Neuere Untersuchungen zeigen spezifische Wirkungen von Gerbstoffen:

Cholesterinsenkende und antisklerotische Wirkung: Versuche an Nagern lieferten Ergebnisse zu deutlichen hypcholesterolemischen Effekten von Extraktten aus grünem Tee bzw. der entsprechenden Einzelsubstanzen (Epicatechingallat, Epigallocatechingallat) [MATSUDA et al. (1986), CHOI et al. (1991)].

Entzündungshemmende Wirkungen: Durch Hemmung von Elastase bzw. Hyaluronidase entfalten Gerbstoffe antiphlogistische Wirkungen [ERDELMEIER et al. (1996)].

Antivirale Wirkungen: Insbesondere hydrolysierbare Gerbstoffe und Ellagitannin hemmen die Vermehrung einiger Viren (Herpes simplex, HIV). Als Mechanismen wurden eine Inhibierung der reversen Transkriptase sowie eine verschlechterte Anheftung der Viren an Zellen gefunden [ERDELMEIER et al. (1996)].

Antikaries-Wirkung: Gallotannine und oligomere Procyanidine sind in der Lage, die Plaqueentstehung zu hemmen, indem sie die Glykosyltransferase des Bakteriums *Streptococcus mutans* in der Mundhöhle zu inhibieren. Eine Polymerisation von Glucoseeinheiten zu Dextranen wird somit unterbunden, die Bildung von Zahnbefall als Vorstufe der Karies unterbleibt [WAGNER (1999 C)].

Antioxidative Wirkung: Aufgrund ihrer phenolischen Struktur besitzen Gerbstoffe stark antioxidative Eigenschaften [MARKANT et al. (1995)],; ein Einsatz als chemopräventive Substanzen bei Erkrankungen, an denen reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sind (Ischämien, Rheuma, Arteriosklerose), wäre denkbar

Antitumorale Wirkung: Die beobachtete Inhibierung des Wachstums einiger Tumorzelllinien beruht möglicherweise u.a. auf einer direkten Hemmung der Proteinkinase C [WANG et al. (1996)], Hemmung der Tyrosin-Kinase-Aktivität oder Apoptoseinduktion [AHMAD, MUKHTAR (1999)].

Antimikrobielle Wirkung: Für Gerbstoffe wurden Hemmeffekt für eine ganze Reihe von Bakterien, Pilzen und Hefen beschrieben [SCALBERT (1991), MORI et al. (1987)].

1.2.6 Resorption und Metabolismus von Gerbstoffen

Die Resorption von Gerbstoffen betreffende Daten deuten darauf hin, daß diese nur in sehr geringem Umfang nach oraler Aufnahme von der gesunden Darmschleimhaut resorbiert werden. Untersuchungen von JIMENEZ-RAMSAY et al. (1994) an Hühnern zeigten, daß ¹⁴C markierte Procyanidine im Molekülmassenbereich von 1500-2000 Da oral nicht resorbiert werden. An geschädigtem Darmepithel, was durch schleimhautreizende Effekte der Gerbstoffe selbst verursacht werden kann, konnte jedoch eine deutliche Resorption dieser Verbindungen nachgewiesen werden [BOYD et al. (1965)]. In der Summe sind relativ wenige Publikationen vorhanden, die sich mit Resorption und Metabolismus von Gerbstoffen beschäftigen. Gerade dazu, um abklären zu können, ob „*in vitro*“ gemessene pharmakologische Effekte auch „*in vivo*“ relevant sind, dürfte dies von Bedeutung sein.

2. Problemstellung

Das wissenschaftliche Interesse an Flavonoiden und Gerbstoffen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. So werden zum einen ständig neue Substanzen dieser Stoffklassen aus wenig untersuchten Pflanzen (z.B. afrikanischen Heilpflanzen) gefunden und deren Struktur aufgeklärt, zum anderen lassen eingehende Erforschung der interessanten Wirkungen auf wichtige neue Erkenntnisse und Arzneimittel in der Zukunft hoffen.

Neben strukturspezifischen Kenntnissen zu Wirksamkeit und Unbedenklichkeit spielt die gleichbleibende pharmazeutische Qualität von Präparaten und Ausgangsmaterial eine entscheidende Rolle. Der hohe Qualitätsanspruch muß verständlicherweise nicht nur zum Zeitpunkt der Herstellung und des Inverkehrbringens eines Arzneimittels, sondern während der gesamten Verwendungsdauer gewährleistet sein [GRIMM (1985)], d. h. die Stabilität einer Arzneiform und insbesondere die Stabilität der enthaltenen Wirkstoffe ist von großer Wichtigkeit.

Dazu sind Erkenntnisse zu Lagerbedingungen, Lagerbehältnissen und zum chemischen Verhalten von Inhaltsstoffen während der Lagerzeit erforderlich. Stabilitätsrelevante Angaben zu Flavonoiden und Gerbstoffen sind bisher nicht vorhanden. In den spezifischen Monographien von Ph. Eu., DAB und DAC beschränken sich die Angaben auf pauschale Aussagen wie „vor Licht geschützt lagern“ oder fehlen völlig.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, für ausgewählte, in der pharmazeutischen Praxis häufig verwendete Flavonoid- und Gerbstoffdrogen, Haltbarkeitshinweise zu erstellen, die u. a. Eingang in die entsprechenden Standardzulassungen finden sollten. Weiterhin müssen mögliche Abbaureaktionen verfolgt und analytisch erfaßt werden, um drogenspezifische Angaben zu Lagerbedingungen und Packmitteln machen zu können. Die Entwicklung neuer, vor allem validierter Analysenmethoden, die für Stabilitätsprüfungen geeignet sind, sollte grundlegender Bestandteil der Untersuchungen werden.

Die vorliegende Arbeit führt die Fragestellungen früherer Dissertationen fort [KIEFL (1998), FEUERSTEIN (1994)] und wurde wegen der hohen Aktualität der Thematik vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) angeregt und gefördert.

Grundlage der Untersuchungen für Flavonoid- und Gerbstoffdrogen waren Langzeit-Stabilitätstests, wobei auch die Parameter Schnittgröße und Lagerbehältnis für das

Drogenmaterial variiert werden sollten. Die Beurteilung von qualitativen und quantitativen Veränderungen bei den Flavonoiddrogen sollte anhand von Vergleichen der chromatographischen Fingerprints erfolgen, die durch eine photometrische Gehaltsbestimmungsmethode, entsprechend der aktuellen Arzneibuchvorschriften, ergänzt werden.

Daneben sollte eine Lagerung bei erhöhten Temperaturen und erhöhter Luftfeuchtigkeit Erkenntnisse zur Stabilität der Inhaltsstoffe unter Streßbedingungen liefern.

Bei den gerbstoffhaltigen Drogen sollte die Beurteilung der Langzeitstabilität durch Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes (Hautpulvermethode) gemäß den aktuellen Arzneibuchvorschriften erfolgen. Schwerpunkt der Arbeiten sollte zunächst auch bei dieser Stoffgruppe die Entwicklung und Validierung neuer HPLC-Methoden sein, um Veränderungen von Einzelkomponenten erfassen zu können. Daneben war beabsichtigt, bereits etablierte analytische Methoden anzuwenden und zu beurteilen, ob diese grundsätzlich für Stabilitätsuntersuchungen bei Gerbstoffen geeignet sind.

3. Ergebnisse

3.1 Flavonoidhaltige Drogen

3.1.1 Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen und analytische Methodik

3.1.1.1 Auswahl und Zerkleinerung des Drogenmaterials

Das für die Stabilitätsuntersuchungen eingesetzte Drogenmaterial wurde ausschließlich vom Drogengroßhandel bezogen. Soweit erhältlich, wurde Ganzdroge eingesetzt, die zu Beginn der Untersuchungen zerkleinert und in die entsprechenden Lagerbehältnisse abgefüllt wurde. Die Qualität des Pflanzenmaterials entsprach den Anforderungen der gültigen Arzneibücher (Ph. Eur., DAB, DAC), was in mitgelieferten Analysenzertifikaten dokumentiert ist. Aus diesem Grund beschränkt sich die Analytik zum Einlagerungsbeginn auf die jeweiligen Gehaltsbestimmungen, auf zusätzliche Identitäts- und Reinheitsprüfungen wurde verzichtet.

In folgender Übersicht (Tab. 2) sind die Drogen zusammengestellt, die in unterschiedlichem Umfang, d.h. mit ein bis drei Chargen, Teil der Stabilitätsuntersuchungen waren:

Droge	Monographie	geforderter Flavonoiden nach AB	Mindestgehalt	an
Birkenblätter (<i>Betulae folium</i>)	Ph. Eur. 2002	1,5 % berechnet als Hyperosid		
Holunderblüten (<i>Sambuci flos</i>)	Ph. Eur. 2002	0,8 % berechnet als Isoquercitrin		
echtes Goldrutenkraut (<i>Solidaginis virgaurea herba</i>)	DAB 2002	0,1 % berechnet als Leicarposid		
Riesengoldrutenkraut (<i>Solidaginis giganteae herba</i>)	Ph. Eur. 2002	2,5 % berechnet als Hyperosid		
Mädesüßblüten (<i>Spireae ulmariae flos</i>)	DAC Ph. Eur. supplement 2002	1,8 % berechnet als Hyperosid 1 ml/kg wasserdampffl. Substanzen		
Passionsblumenkraut (<i>Passiflorae herba</i>)	Ph. Eur. 2002	1,5 % berechnet als Vitexin		

Ringelblumenblüten (<i>Calendulae flos</i>)	Ph. Eur. 2002	0,4 % berechnet als Hyperosid
Ruhrkrautblüten (<i>Helichrysi flos</i>)	DAC	0,6 % berechnet als Hyperosid
Stiefmütterchenkraut (<i>Violae tricoloris herba</i>)	DAC	0,2 % berechnet als Hyperosid

Tab. 2: Untersuchte flavonoidhaltige Drogen

Um für die pharmazeutische Praxis Lagerungshinweise erstellen zu können, die nachfolgend Eingang in die entsprechenden Standardzulassungen finden sollen, ist es notwendig, das Drogenmaterial vergleichend in verschiedenen Schnittgraden und Packmaterialien zu lagern. Die Zerkleinerung der Ganzdroge erfolgte mit einer Schneidemühle, die zum Bearbeiten entsprechend größerer Drogenmengen (kg-Maßstab) dimensioniert ist und auch industriell in vergleichbarer Bauart verwendet wird [LIST, SCHMIDT (1984)]. Durch Einsatz unterschiedlicher Siebeinsätze (Maschenweiten 8, 6, 4, 2, 1 und 0.5 mm), die sich zwischen Schneidemesser und Auffangbehälter befinden, ist es möglich, das Pflanzenmaterial in einem Korngrößenbereich zu erhalten, der der Klassifikation „gepulvert“ nach DAB 2002 entspricht. Das DAB führt folgende gebräuchliche Schnittgrößen auf [DAB 2002; 2.8.N5]: (angegeben ist jeweils die lichte Maschenweite in µm)

„grob geschnitten“ (4000 – 2800)

„fein geschnitten“ (2000)

„gepulvert (710 – 180)

In PH. EUR. (3), 2002 werden „Haufwerke“, zu denen auch Drogenschnitte zu zählen sind, folgendermaßen eingeteilt:

Kornklasse	A	B
grobe Pulver	1400	355
mittelfeine Pulver	355	180
feine Pulver	180	125
sehr feine Pulver	125	90

Tab. 3: Korngrößeneinteilung nach Ph. Eur. (A: obere Maschenweite; B: untere Maschenweite)

Zur Zuordnung einer Korngrößenklasse schreibt das Arzneibuch vor, daß mehr als 95% des Ausgangsmaterials das unter A angegebene Sieb passieren muß, jedoch nicht mehr als 40% das unter B angegebene Sieb passieren dürfen.

In den Abb. 6 – 9 ist jeweils die Korngrößenverteilung von eingelagerten, pulverisierten Drogenmustern an ausgewählten Blatt-, Blüten-, bzw. Krautdrogen dargestellt.

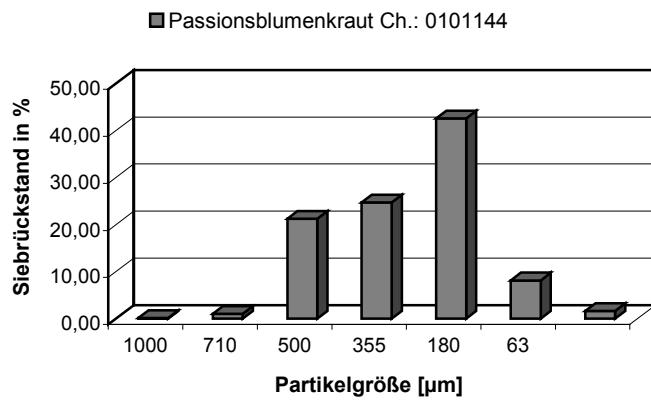


Abb. 6: Korngrößenverteilung von zerkleinertem Passionsblumenkraut

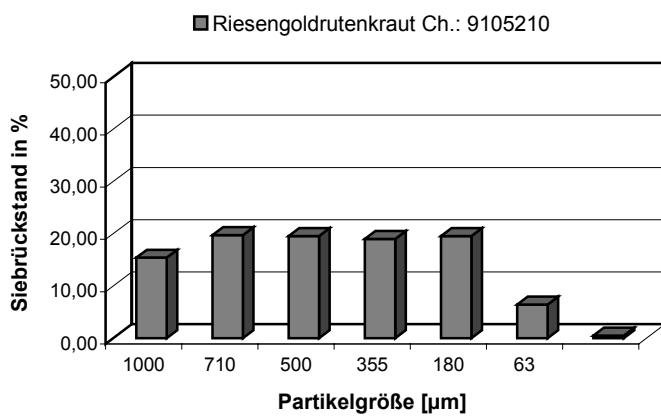


Abb. 7: Korngrößenverteilung von zerkleinertem Riesengoldrutenkraut

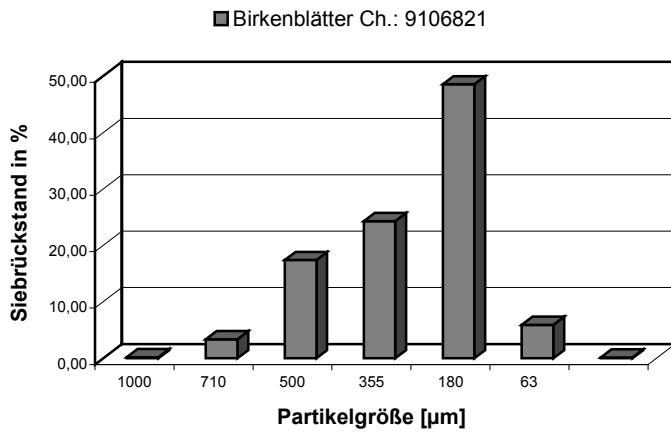


Abb. 8: Korngrößenverteilung von zerkleinerten Birkenblättern

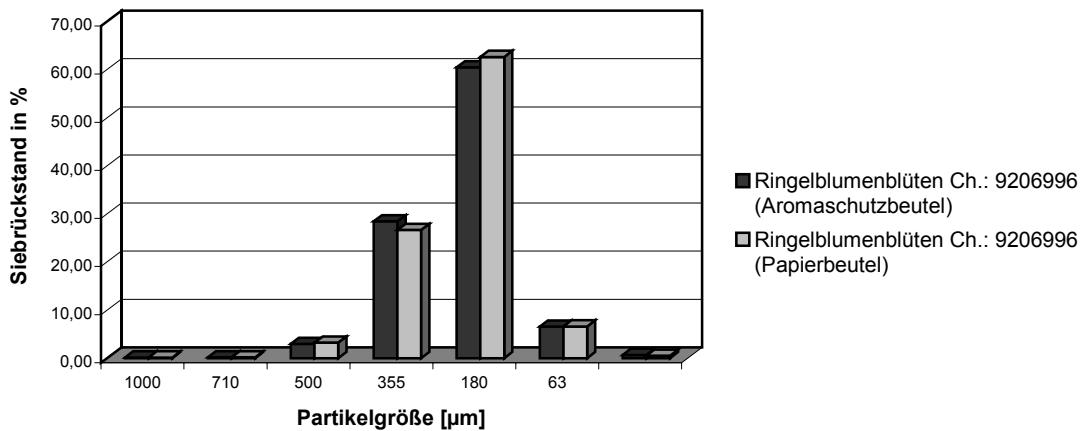


Abb. 9: Korngrößenverteilung von zerkleinerten Ringelblumenblüten

Abb. 6 und 8 zeigen Pulver, die eine gaußähnliche Häufigkeitsverteilung aufweisen und eine dominierende Partikelgröße zwischen 180 und 355 µm besitzen.

Aus dem Vergleich zweier Krautdrogen (Abb. 6: Passionsblumenkraut, Abb. 7: Riesengoldrutenkraut) wird eine grundsätzliche Problematik beim Zerkleinern von Drogenmaterialien deutlich: Riesengoldrutenkraut, das größere Anteile stark verholzter Stengelteile enthält, lässt sich relativ schwer zerkleinern. Der Partikelanteil >710 µm liegt nach entsprechender Zerkleinerung bei über 30%. Bei Passionsblumenkraut sind die Stengelanteile weniger stark verholzt; der resultierende Partikelanteil >710 µm liegt unter 5%.

Abb. 9 zeigt die relativ enge Korngrößenverteilung einer Blütendroge (Ringelblumenblüten). Die dünnen Blütenblätter lassen sich gut zerkleinern, woraus eine einheitliche Korngröße resultiert. Die in Abb. 9 dargestellten Ergebnisse der Siebanalyse von Drogenpulvern aus Papierbeutel und Aromaschutzbeutel zeigen keinerlei Unterschiede in der Korngrößenverteilung. Eine ähnliche Korngrößenzusammensetzung dürfte somit bei Proben aus verschiedenen Packmitteln nach der Zerkleinerung gegeben sein.

Generell bestimmt die morphologische Beschaffenheit des jeweiligen Drogenmaterials die erzielbare Schnittgröße. In der Regel weisen Krautdrogen eine uneinheitlichere Zusammensetzung auf als Blatt- oder Blütendrogen.

3.1.1.2 Lagerungsbedingungen und Packmaterial

Eingesetzte Packmaterialien

Als Packmaterialien wurden apothekenübliche **Blockbodenbeutel**, gefüllt mit gebleichtem Pergamyn verwendet, die gemäß der Standardzulassungen als Verpackung für den Endverbraucher vorgesehen sind. Ergänzend erfolgte die Lagerung des Drogenmaterials in **Aromaschutzverpackungen**, kaschiert gegen Aluminiumfolie und Polyethylen.

Auf die Lagerung in Weißblechdosen wurde nach einem Schädlingsbefall verzichtet, da sich diese als besonders leicht zugänglich für Insekten erwiesen. Die vorliegenden Stabilitätsdaten beschränken sich daher auf Papierbeutel (Pa) und Aromaschutzbeutel (Ar). Die eingesetzten Packungen wurden durch dreifaches Umfalten mit handelsüblichen Metallklammern verschlossen.

Lagerungsbedingungen

Die Lagerung der Packungen erfolgte gemäß den Bedingungen der ICH-Guideline [CPMP (1) u. (2) (1998)]. Für die Untersuchungen zur Langzeitstabilität („long term testing“) schreiben diese einen Temperaturbereich von 25 ± 2 °C und eine Umgebungsfeuchte von 60 ± 5 % rF (rel. Feuchte) vor. Diese Bedingungen entsprechen den Lagervorschriften für Stabilitätstests in der Klimazone II. In Tab. 4 sind die Klimazonen, in die der Globus gemäß den ICH-Richtlinien unterteilt wird, zusammengefaßt.

Klimazone	Definition	Lagerbedingungen
I	gemäßiges Klima	21°C / 45 % rel. Luftfeuchte
II	subtropisches u. mediterranes Klima	25°C / 60 % rel. Luftfeuchte
III	heiß-trockenes Klima	30°C / 35 % rel. Luftfeuchte
IV	heiß-feuchtes Klima	30°C / 70 % rel. Luftfeuchte

Tab. 4: Definition und Lagerbedingungen der 4 Welt-Klimazonen nach ICH

Die vorgesehene Temperatur lässt sich in einem Klimaraum exakt einstellen, die vorgeschriebene Luftfeuchtigkeit muß von Ultraschall-bzw. Verdunstungsbefeuchtern erzeugt werden. Da es je nach herrschenden Außentemperaturen nicht immer möglich war, die relative Luftfeuchtigkeit bei $60 \pm 5\%$ zu halten, wurden temporäre Abweichungen von $60 \pm 10\%$ toleriert.

Die Einlagerung unter Stressbedingungen bei 40°C und 75 % rF erfolgte in einem entsprechend präparierten Exsikkator. Untersuchungen zum Stabilitätsverhalten der Drogeninhaltsstoffe bei 70°C, 80°C und 100°C erfolgten nach Lagerung in entsprechend temperierten Trockenschränken, wobei hier die Höhe der Luftfeuchtigkeit außer Acht gelassen wurde.

3.1.1.3 Extraktion

Ziel war es, ein Verfahren zur Extraktion von Flavonoiden zu entwickeln, das für HPLC-Untersuchungen Probenlösungen liefert, die – wenn möglich – ohne weitere Bearbeitung direkt analysierbar sind. Darüberhinaus sollte die Extraktion zeitsparend, schonend und möglichst erschöpfend sein. Nach NIESEL (1992) ergibt eine Heißextraktion einen wesentlich höheren nachweisbaren Flavonoidanteil, ohne negative Auswirkungen auf die Stabilität dieser Substanzklasse zu haben. Bei der Wahl des Extraktionsmediums verwenden eine Vielzahl von Autoren Methanol-Wasser-Mischungen unterschiedlicher Zusammensetzung. [BRONNER et al. (1995); MC RAE et al. (1990); MINAMI et al. (1998); JUSTESEN et al. (1998)].

Diese scheinen als mittelpolare Lösungsmittelgemische am besten in der Lage zu sein, sowohl die hydrophileren Flavonoidglykoside als auch die lipophileren Flavonoidaglyka möglichst erschöpfend aus dem Drogenmaterial zu extrahieren.

Um ein geeignetes Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch zu finden, wurde flavonoidhaltiges Pflanzenmaterial mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert und jeweils der Gesamtflavonoidgehalt (relativ als Gesamtpunktfläche angegeben) bestimmt. Abb. 10 zeigt

am Beispiel von Birkenblättern verschiedene Extraktionsmittel im Vergleich. Im Diagramm sind die Peakflächen der Einzelflavonoide (1-9) in Birkenblättern gegenübergestellt.

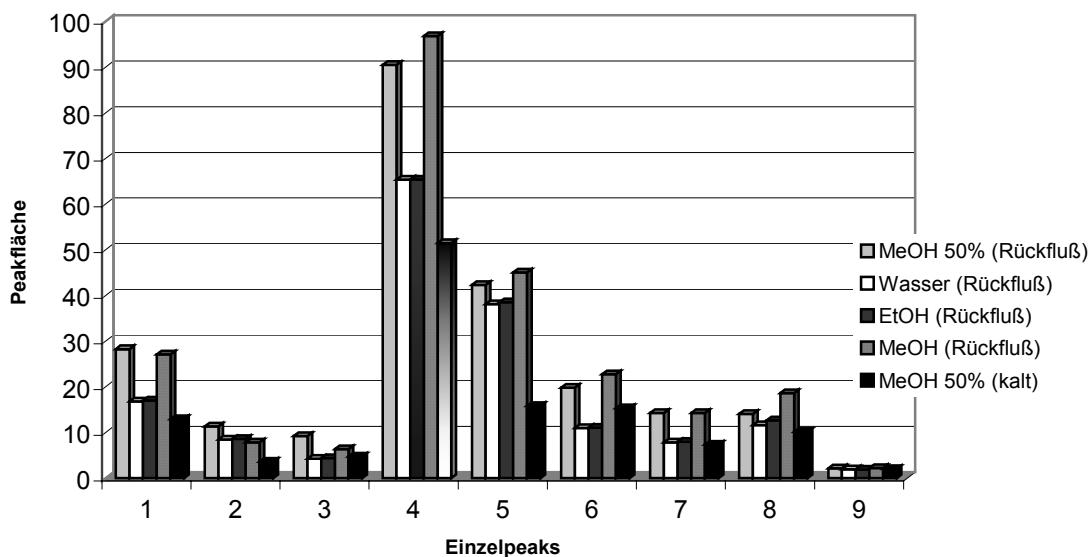


Abb. 10: Extraktionsvermögen verschiedener Lösungsmittel für Flavonoide aus Birkenblättern

Aus den dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, daß neben Methanol/Wasser-Gemischen 50/50 (v/v) reine Methanolextrakte die quantitativ größten Ausbeuten an Flavonoiden liefern; bei Verwendung von Wasser bzw. 50 % Ethanol ergeben sich deutlich geringere Flavonoidmengen in den Extrakten. Des Weiteren scheint eine Heißextraktion bei ca. 80°C – 100°C unter Rückfluß effektiver zu sein als eine Kaltextraktion (Raumtemperatur) mit dem gleichen Menstruum. (vgl. MeOH 50 % Rückfluß und kalt). Da bei Verwendung von reinem Methanol auch größere Anteile an Chlorophyll mitextrahiert werden, das sich negativ auf die Haltbarkeit von HPLC-Säulen oder die Trennleistung auswirkt, wurde Methanol 50 % als Extraktionsmedium für die HPLC-Analytik der Vorzug gegeben. Nach 2-maliger Rückflußextraktion des Drogenmaterials mit MeOH 50 % kann der erhaltene Extrakt direkt für die HPLC verwendet werden.

3.1.1.4 Analytische Methodik zur Stabilitätsuntersuchung

Gehaltsbestimmung nach Arzneibuch

Als generell anerkanntes analytisches Verfahren zur Quantifizierung von Drogeninhaltsstoffen bieten sich die Gehaltsbestimmungsmethoden der jeweiligen Arzneibücher an.

Für Flavonoide ist in Ph. Eur., DAB und DAC eine einheitliche Gehaltsbestimmungsmethode vorgeschrieben. Diese besteht in einer Hydrolyse der extrahierten Flavonoidglykoside mit Aceton/HCl und anschließendem Ausschütteln der Flavonoidaglyka mit Ethylacetat. Um eine Anthocyanidinbildung von Catechinderivaten aufgrund des Säurezusatzes zu verhindern, wird Methenamin als Reduktionsmittel zugesetzt. Die mögliche Bildung störender Cyanidinfarbstoffe wird dadurch erheblich reduziert. Nach Zusatz von AlCl₃ wird der entstandene Chelatkomplex photometrisch quantifiziert. Ein Schwachpunkt dieser Methode liegt darin, daß nur Flavonoid-O-Glykoside erfaßt werden. Da C-Glykoside unter den gewählten Bedingungen nicht gespalten werden und nicht in die lipophile Ethylacetatphase gelangen, entgehen diese der photometrischen Quantifizierung als Al-Chelatkomplex und es resultieren zu niedrige Gehaltswerte. In Ph. Eur. 2002 ist für Flavonoiddrogen mit hohem C-Glykosid-Anteil (z. B. Weißdornkraut mit Blüten, Passionsblumenkraut) eine modifizierte Gehaltsbestimmungsmethode (photometrische Bestimmung mit Borsäure/Oxalsäure-Reagenz ohne vorhergehende Hydrolyse) enthalten, mit der C- bzw. O- Glykoside gleichermaßen erfaßt werden [PH. EUR. (4) (2002)]. Mögliche störende Einflüsse von Pflanzenpigmenten (Xanthophylle, Carotinoide, Chlorophylle) auf die Farbkomplexbildung können durch zusätzliches Ausschütteln des Extraktes mit Hexan vermieden werden [GLASL (1984)]. Den im folgenden dargestellten Ergebnissen nach der Arzneibuchmethode, liegt - mit Ausnahme von Stiefmütterchenkraut - die Gehaltsbestimmung entsprechend der Monographie *Birkenblätter* [PH. EUR. (1) (2002)] zugrunde.

Gehaltsbestimmung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die Analytik von Flavonoiden und somit auch für Stabilitätsuntersuchungen ist die HPLC die Methode der Wahl [WAGNER et al. (1983), DAIGLE et al. (1988), MERKEN et al. (2000)] und aktueller Standard für die Qualitätskontrolle pharmazeutischer Hersteller. Die Vorteile dieser Bestimmungsmethode liegen in der hohen Auflösung, Genauigkeit und Empfindlichkeit. Präparatives Arbeiten ist ebenfalls problemlos möglich. Als

Säulenmaterialien haben sich Umkehrphasen (RP 8 bzw. RP 18) bewährt [CASTEELE (1982), MARKHAM (1998), CROZIER et al. (1997), KEINÄNEN et al. (1998), REHWALD et al. (1994)]. Ausgehend von den Arbeiten von SCHNEIDER-LEUKEL (1994) wurden entsprechende HPLC Bedingungen für die Stabilitätsuntersuchungen zum Teil übernommen und weiterentwickelt. Um möglichst alle Flavonoide in einem einzigen Lauf aufzutrennen und vergleichen zu können, wurden sog. HPLC-Fingerprints aufgezeichnet, mit deren Hilfe Veränderungen der untersuchten Extrakte relativ leicht entdeckt werden können [LAZAROWYCH, PEKOS (1998)]. Da es sich bei Pflanzenextrakten um komplexe Mischungen verschiedenster Inhaltsstoffe handelt, ist bei der HPLC eine Gradientenelution erforderlich. Die mobile Phase besteht aus Wasser bzw. Mischungen von Wasser und einem organischen Lösungsmittel. Am häufigsten kommen für diese Trennprobleme Methanol bzw. Acetonitril zum Einsatz. Aufgrund der höheren Selektivität für besonders schwer zu trennende Flavonoidglykoside (z. B. Q-gal und Q-glu, (s. Abkürzungsverzeichnis)) und verminderter Tailing der Flavonoidpeaks wurde Acetonitril verwendet, obwohl Toxizität und Kosten dagegen sprechen.

Das eingesetzte HPLC-System sollte – soweit möglich – eine Trennung der Flavonoide über einen weiten Polaritätsbereich in einem Lauf ermöglichen. Darüberhinaus wurde versucht, kurze Laufzeiten zur Trennung der Drogenextrakte zu erreichen. Dabei erwiesen sich die von SCHNEIDER-LEUKEL (1994) durchgeführten Arbeiten als hilfreich. Das verwendete HPLC-System ist optimal auf Trennungen von Flavonoiden abgestimmt und wurde deshalb für die im folgenden dargestellten Stabilitätsuntersuchungen verwendet.

Die Fließmittel waren folgendermaßen zusammengesetzt:

A: 90 % (v/v) Wasser, 10 % (v/v) CH₃CN

B: 10 % (v/v) Wasser, 90 % (v/v) CH₃CN

Die HPLC-Bedingungen für Passionsblumenkrautextrakte wurden aus Untersuchungen von KRENN et al. (1995) übernommen. Die Dauer eines Laufes liegt hier bei nur 35 Min. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus A: Wasser und B: CH₃CN verwendet. Eine Vormischung der Fließmittel zur Vermeidung von Luftblasenbildung im System erfolgt bei diesem System nicht. Da bei der Verwendung von reinem Wasser bzw. Acetonitril keine Probleme beim Vermischen (Luftblasenbildung im System) auftraten, scheint eine von SCHNEIDER-LEUKEL (1994) geforderte Vormischung nicht zwingend notwendig zu sein. Um die Laufzeit der HPLC-Trennungen zu verkürzen, wurden die Bedingungen von SCHNEIDER-LEUKEL (1994) dahingehend modifiziert, daß eine schnellere Zumischung von Acetonitril im

Verlauf des Gradienten erfolgte. Die Dauer einer chromatographischen Trennung konnte bei gleichbleibender Trennleistung von 82 min auf 50 min verkürzt werden. (s. Kapitel 5.2.2.4 b). Zu den Fließmitteln wurde jeweils 0,5 % (v/v) H₃PO₄ gegeben, um einen pH-Wert (ca. 3,5) im sauren Bereich zu erhalten. Der saure pH-Wert soll die Dissoziation phenolischer OH-Gruppen (der Flavonoide) bzw. von OH- und Carboxylgruppen von Pflanzensäuren (z.B. Kaffeesäure, Chlorogensäure) zurückzudrängen. Peak tailing, das durch Adsorptionseffekte geladener Verbindungen an freien Silanolgruppen entsteht, kann dadurch verhindert werden. Zur Detektion der Flavonoide wurde ein DAD-Detektor mit einem Wellenlängenbereich von 200 – 800 nm verwendet [MATTILA (2000)]. Dabei war zugleich eine Identifizierung der detektierten Flavonoide anhand deren UV-Spektren möglich, die mit authentischen Standards verglichen wurden. Zusätzlich wurden Einzelkomponenten durch Vergleich der Retentionszeiten bzw. Überspritzen mit den jeweiligen Standardsubstanzen identifiziert. Da nur eine begrenzte Zahl an authentischen Reinsubstanzen käuflich erhältlich war, konnten nicht alle Flavonoidpeaks in den Chromatogrammen eindeutig bestimmt werden.

3.1.1.5 Auswertung der Stabilitätsdaten

Die unter 3.1.1.4 beschriebenen analytischen Verfahren wurden nebeneinander angewandt. Die Prüfzeitpunkte konnten aus internen Gründen nicht immer entsprechend den Bestimmungen der ICH-Guideline gewählt werden. Diese schreibt eine Überprüfung des Gehaltes alle drei Monate im ersten Jahr, alle sechs Monate im zweiten Jahr und dann jährlich vor [CPMP (1), (2)]. Bei den Bestimmungen nach der Arzneibuchmethode wird bei der Darstellung der Ergebnisse auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet, da es sich jeweils nur um Zweifachbestimmungen handelt und daher eine Angabe der Schwankungsbreite nicht sinnvoll erscheint. Die in die Darstellung der HPLC-Untersuchungen eingehenden Werte sind Vierfachbestimmungen von Extrakten der jeweiligen Drogenmuster.

Bei der Auswertung der HPLC-Chromatogramme wurde die Fläche aller Flavonoidpeaks, zu einer „Gesamtpeakfläche“ addiert. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 340 nm. Zu Beginn der Einlagerung des Drogenmaterials wurde der entsprechende Ausgangsgehalt bestimmt und in der Folge die charakteristischen Fingerprint-Chromatogramme auf mögliche Veränderungen miteinander verglichen. Absolutwerte des Flavonidgehaltes, bezogen auf eine Referenzsubstanz, wurden nicht bestimmt. Soweit im folgenden keine Aussagen über Einzelkomponenten der Extrakte gemacht werden, ist von keinen Veränderungen dieser Substanzen während der Lagerung im Vergleich zum Ausgangswert auszugehen.

3.1.2 Flavonoidstrukturen und deren Retentionsverhalten

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, besitzt die Stoffgruppe der Flavonoide eine große strukturelle Vielfalt. Bis heute wurden ca. 4000 Flavonoidverbindungen isoliert und charakterisiert. Die große Vielfalt dieser Verbindungen (s. Abb. 11) ergibt sich

- durch unterschiedlichen Oxidationsgrad des heterozyklischen Rings (C-Ring)
- unterschiedliche Substitutionsmuster der beiden aromatischen Ringe A und B mit OH- OCH₃- bzw. O-Alkyl- Substituenten
- verschiedenartige Zucker, deren Bindungstyp (C- bzw. O-glykosidisch), Zahl und Stellung am Flavonoidmolekül stark variieren.

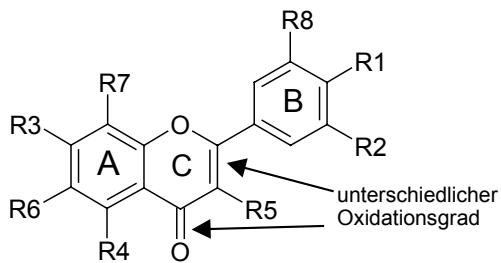


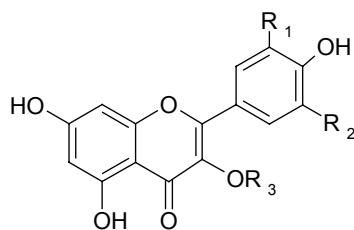
Abb. 11: Flavonoid-Modellstruktur

Eine Einteilung der Flavonoide in Untergruppen erfolgt nach dem Oxidationsgrad des C-Ringes. In Abb. 12 – 14 sind die chemischen Grundkörper mit einigen wichtigen Vertretern dargestellt.

	R1	R2	R3	R4
Chrysin	H	H	H	H
Apigenin	OH	H	H	H
Luteolin	OH	OH	H	H
Vitexin	OH	H	-glu	H
Orientin	OH	OH	-glu	H
Isovitexin	OH	H	H	-glu
Isoorientin	OH	OH	H	-glu
Schaftosid	OH	H	-ara	-glu
Isoschaftosid	OH	H	-glu	-ara

Flavon-Grundstruktur

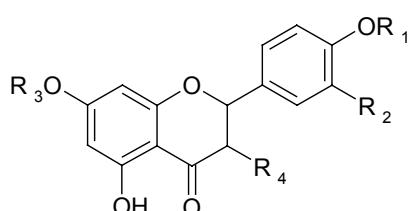
Abb. 12: natürlich vorkommende Vertreter der Flavon-Reihe



	R1	R2	R3
Quercetin	OH	H	H
Kämpferol	H	H	H
Myricetin	OH	OH	H
Isorhamnetin	OCH ₃	H	H
Hyperosid	OH	H	-gal
Isoquercitrin	OH	H	-glu
Quercitrin	OH	H	-rha
Rutin	OH	H	-rut
Astragalin	H	H	-glu
Avicularin	OH	H	-ara

Flavonol-Grundstruktur

Abb. 13: natürlich vorkommende Vertreter der Flavonol-Reihe



	R1	R2	R3	R4
Naringenin	H	H	H	H
Hesperitin	CH ₃	OH	H	H
Hesperidin	CH ₃	OH	-rut	H
Taxifolin	H	OH	H	OH

Flavanon bzw. Flavanonol-Reihe

Abb. 14: natürlich vorkommende Vertreter der Flavanon- bzw. Flavanonol-Reihe

Das Retentionsverhalten der Flavonoide ist von deren Oxidationsgrad, dem Substitutionsmuster und der daraus resultierenden Stereochemie abhängig. Entscheidend für das Retentionsverhalten dürften die Planarität des Moleküls, seine Wasserstoffbrücken-Akzeptoreigenschaften und die Fähigkeit zur Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrücken sein. So fehlt beispielsweise den Flavanol- und Flavanonderivaten eine intramolekulare Planarität, wodurch diese leichter solvatisierbar sind und somit schneller eluieren. Hydroxylsubstitution im B-Ring und Glykosidierung des Flavonoidmoleküls (unabhängig von der Position) steigern die Polarität und bewirken eine Verkürzung der Retentionszeit [SCHNEIDER-LEUKEL (1994)].

In Tab. 5 sind die Retentionszeiten wichtiger Flavonoid-Vertreter zusammengestellt:

Flavonoid	Retentionszeit t_R [min]
Saponarin	26,88
Isoorientin	29,18
Luteolin	30,60
Vitexin-2“-O-rha	31,63
Vitexin	32,35
Myricitrin	34,61
Rutin	34,73
Isovitexin	35,12
Hyperosid	35,95
Isoquercitrin	36,88
Avicularin	40,71
Isorhamnetin-3-rut	41,62
Kämpferol-3-glu	42,58
Quercitrin	42,78
Isorhamnetin-3-glu	43,77
Spiraeosid	44,18
Myricetin	47,26
Rhamnetin	53,21
Quercetin	60,28
Hesperetin	66,68
Apigenin	67,37

Tab. 5: Retentionszeiten einiger Flavonoide an RP 18 Säulenmaterial

(chromatogr. Bedingungen siehe Abschnitt 5 „Materialien und Methoden“)

Eingesetztes Drogenmaterial

3.1.3 Goldrutenkraut

3.1.3.1 Allgemeines



Abb. 15: *Solidago virgaurea* L.

Bei der Goldrute (*Solidago sp.*, Asteraceae) handelt es sich nach HAGER (2002) um eine mehr als 100 Arten umfassende Gattung ausdauernder Kräuter oder selten Halbsträucher mit wechselständigen, meist lanzettlichen oder elliptischen Stengelblättchen. Die Blüten sind durchweg gelb gefärbt mit weiblichen Zungenblüten und zwittrigen Röhrenblüten in traubigen oder rispigen Blütenständen [HILLER (1996)]. Als Herba-Drogen finden die Arten *Solidago virgaurea* L. (echte Goldrute), *Solidago canadensis* L. (kanadische Goldrute) und *Solidago gigantea* AIT. (Riesengoldrute) Verwendung, wobei die in den Arzneibüchern bestehende Unterscheidung in echtes (*S. virgaurea*) bzw. Riesengoldrutenkraut (*S. canadensis* u. *S. gigantea*) mehr an Bedeutung zu verlieren scheint.

Letztere Arten unterscheiden sich von *S. virgaurea* in der Zusammensetzung des Inhaltsstoffspektrums, beispielsweise weist *S. virgaurea* einen deutlich geringeren Flavonoidgehalt auf. In Ph. Eur. (2002) sind Monographien für *S. virgaurea* und *S. gigantea* aufgenommen. Das ausschließlich in *S. virgaurea* vorkommende Phenolglykosid Leiocarpoxid, mit einem Gehalt von 0,2 – 1,0 %, lässt eine eindeutige chemotaxonomische Unterscheidung zu. [HILLER (1996)]

Während *S. canadensis* und *S. gigantea* ursprünglich in Nordamerika beheimatet waren, inzwischen aber auch wild in Europa vorkommen, kommt *S. virgaurea* in Europa, Nordafrika und Asien weit verbreitet vor [HAGER 2002].

3.1.3.2 Indikationen und Anwendung

Die Drogen werden in Form von Tees oder Fertigpräparaten allein oder zusammen mit weiteren synergistisch wirkenden Drogen zur Durchspülungstherapie und Erhöhung der Harnmenge (Aquarese) [CHODERA ET AL. (1988), SCHILCHER (1988)] bei entzündlichen Erkrankungen der ableitenden Harnwege verwendet [SCHILCHER (1987)]. Die Anwendung

bei Harnwegsinfekten und bei Nieren- und Blasensteinen wurde von der Kommission E positiv bewertet [BANZ (1987)]. Darüberhinaus besitzen sie eine schwach spasmolytische und antiphlogistische Wirkkomponente [WESTENDORF (1983), LEUSCHNER (1995)]. Als wirksames Prinzip wird ein Zusammenwirken von Flavonoiden, Saponinen und Phenolglykosiden angesehen [HILLER (1996)]. Neuere Untersuchungen zum pharmakologischen Wirkungsmechanismus von Goldrutenkraut lassen vermuten, daß Flavonoide (v.a. Quercetin) und Phenolglykoside den Abbau der neutralen Endopeptidase hemmen, was letztendlich zu einer geringeren Na-Rückresorption verbunden mit einer erhöhten Wasserausscheidung (Diurese) führt. Die neutrale Endopeptidase ist im menschlichen Organismus für den Abbau des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) verantwortlich, das die Na-Reabsorption hemmt und durch Vasodilatation zu einer erhöhten glomerulären Filtrationsrate führt [MELZIG, MAJOR (2000)].

3.1.3.3 Inhaltsstoffe

[nach HAGER (2002), HILLER (1996)]

- ätherisches Öl (ca. 0,5%) mit der Hauptkomponente γ -Cadinene
- Saponine (ca. 6%): Triterpensaponine vom Oleanen-Typ
- Phenolglykoside (nur in *S. virgaurea*): Leiocarposid, Virgaureosid A
- saure Polysaccharide
- Flavonoide: *S. virgaurea* (ca. 1,5 %), *S. canadensis* und *S. giganteae* (ca. 2,4-3,9 %)

Es kommen vor allem Flavonol-O-glykoside mit Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin als Aglyka vor. Nach HILLER (1996) ist Quercitrin (Quercetin-3-O-rut) in *S. giganteae* und *S. canadensis* das mengenmäßig dominierende Flavonoid, das in *S. virgaurea* fehlt.

In den Abb. 16 und Abb. 17 sind die charakteristischen Fingerprintchromatogramme von echtem bzw. Riesengoldrutenkraut gegenübergestellt. Peak 6 in Abb. 17 konnte als Quercitrin identifiziert werden, fehlt aber bei *S. virgaurea* in Abb. 16. Der Gehalt an Rutin (Peak 1) ist in *S. virgaurea* (Abb. 16) deutlich höher. Die Gesamtpeakfläche (= Summe aller Flavonoidpeaks), die zum - nach der Konventionalmethode des Arzneibuches [PH.EUR. (1) (2002)] bestimmten Flavonoidgehalt - proportional ist, ist bei *S. gigantea* (Abb. 17) deutlich größer. Diese Beobachtungen decken sich mit Literaturangaben. [HILLER (1996), HAGER (2002)].

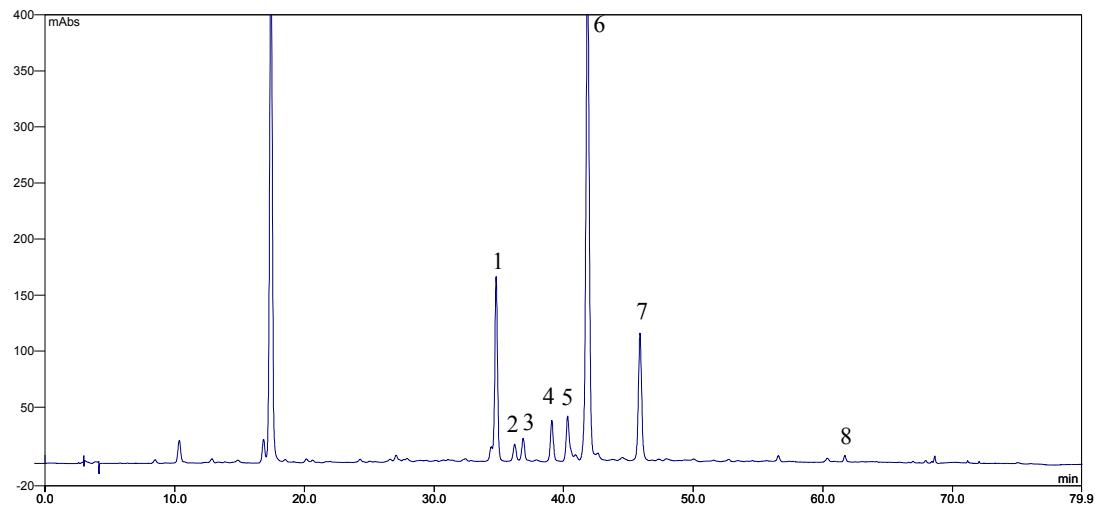


Abb. 16: HPLC-Fingerprint eines Extraktes von *Herba solidaginis (S. virgaurea)*

Peakzuordnung: 1=Rutin; 2=Hyperosid; 3=Isoquercitrin; 4-7=nicht bestimmt; 8=Quercetin

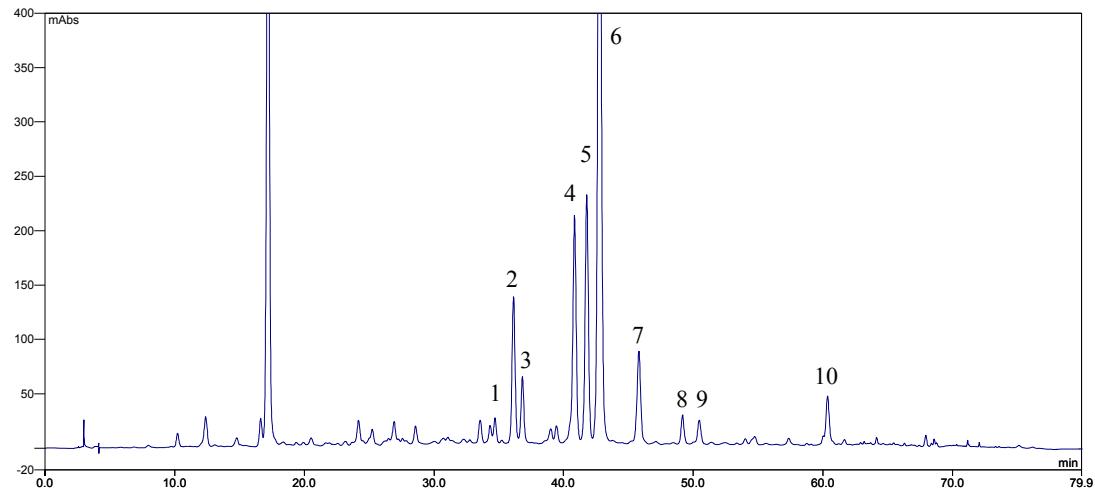


Abb. 17: HPLC-Fingerprint eines Extraktes von *Herba solidaginis (S. gigantea)*

Peakzuordnung: 1=Rutin; 2=Hyperosid; 3=Isoquercitrin; 4,5=nicht bestimmt; 6=Quercitrin; 7-9=n. b.
10=Quercetin

3.1.3.4 Stabilitätsuntersuchungen mit Goldrutenkraut - Drogenmaterialien

Wird Goldrutenkraut bei 25°C und 60 % rF gelagert, beobachtet man bei einigen Drogenmustern einen schwankenden Verlauf des Flavonoidgehaltes (Abb. 18). Eine mögliche Ursache, warum die Flavonoidwerte während der ersten 18 Monate Lagerdauer eine relativ große Schwankungsbreite zeigen und auch teilweise außerhalb der Haltbarkeitsgrenzen liegen, kann in der Inhomogenität resp. Problemen bei der Zerkleinerung des Drogenmaterials liegen.

liegen. Möglicherweise kommt auch unterschiedliches Freisetzungerverhalten aus dem relativ inhomogenen Goldrutenkraut während der Extraktionsschritte zum Tragen. Der in Abb. 19 dargestellte Verlauf des Flavonoidgehaltes für echtes Goldrutenkraut ist einheitlicher. Es lässt sich bei allen untersuchten Chargen kein signifikanter Abfall des Flavonoidgehaltes erkennen.

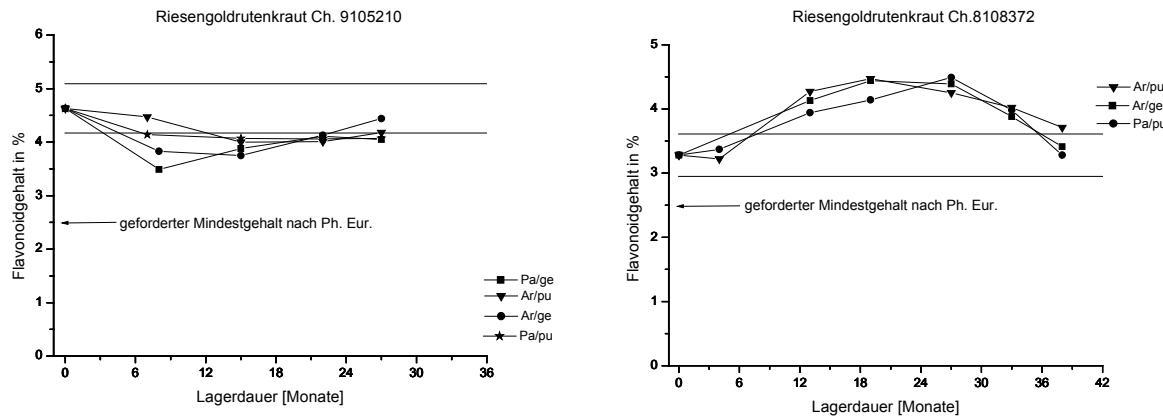


Abb. 18: Verlauf des Gesamtflavonoidgehaltes für zwei unterschiedliche Riesengoldrutenkraut-Chargen

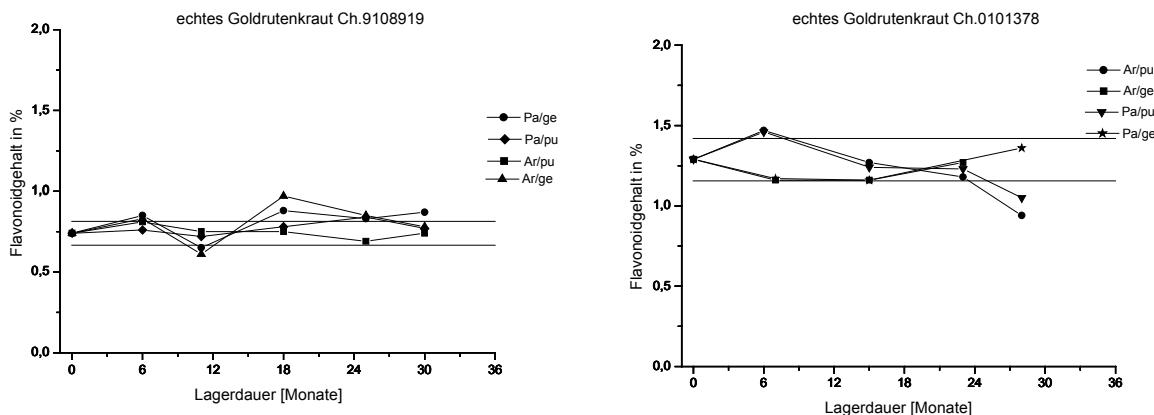


Abb. 19: Verlauf des Gesamtflavonoidgehaltes für zwei unterschiedliche Chargen echtes Goldrutenkraut

verwendete Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis
eingezeichnete Parallelen

zur Abszisse:

Diese geben die Haltbarkeitsgrenzen von +10 % (obere Linie) und -10% (untere Linie) zum Ausgangswert des Flavonoidgehaltes an

Hinweis zu Abb. 18 und 19: Auf die Angabe der Standardabweichungen wird hier, sowie bei allen weiteren Diagrammen zu den Gehaltsbestimmungen nach der Arzneibuchmethode verzichtet. Da die Einzelwerte nur zweifach bestimmt wurden, wird eine Angabe für nicht sinnvoll gehalten.

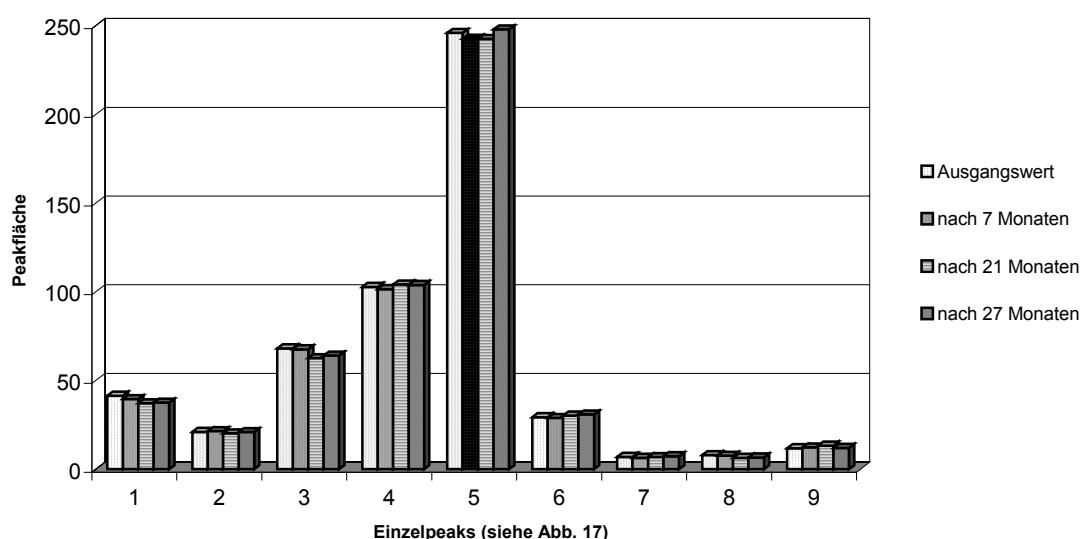
Ergänzende HPLC-Untersuchungen sollten Abweichungen im Flavonoid-Fingerprint erkennen lassen.

Abb. 20 (A/B) und Abb. 21 (A/B) zeigen für zwei herausgegriffene Vertreter die Peakflächen der Einzelkomponenten im Verlauf der Lagerung bei 60 % rF und 25 °C (Abb. 20) und die Gesamtpeakfläche der Drogenextrakte unterschieden nach Schnittgrad und Packmittel (Abb. 21). In beiden Diagrammen sind keine signifikanten Veränderungen einzelner Flavonoide erkennbar, somit bleibt auch die Peakflächensumme relativ konstant. Unterschiede zwischen pulverisierten und geschnittenen Drogenmustern, bzw. solchen, die im Papierbeutel oder Aromaschutzbeutel gelagert waren, können nicht festgestellt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der Flavonoidkomplex in Goldrutenkraut-Drogen unabhängig von Schnittgrad und Verpackung unter den Bedingungen der Klimazone II über einen Zeitraum von mehr als 24 Monaten stabil ist.

A

Riesengoldrutenkraut (Pa/pu) Ch.8108372



B

echtes Goldrutenkraut (Pa/pu) Ch.0101378

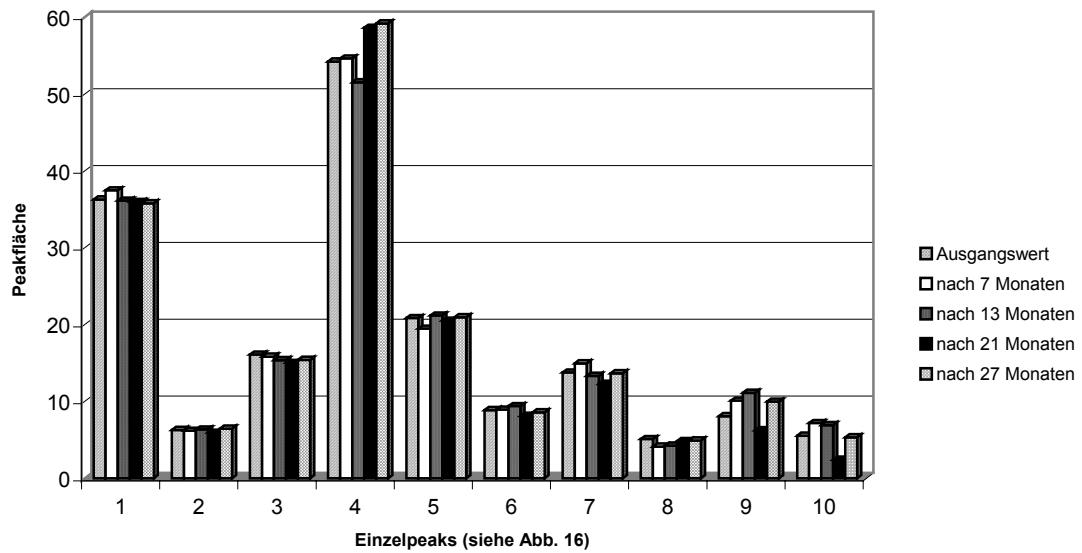
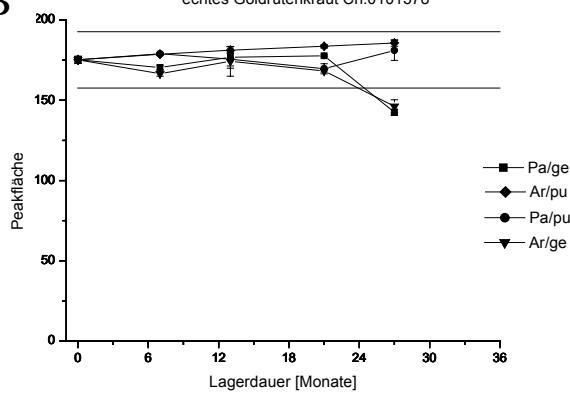


Abb. 20: Veränderung der Peakflächen der Einzelkomponenten in *S. gigantea* (A) und *S. virgaurea* (B) während der Lagerung

B

echtes Goldrutenkraut Ch.0101378



A

Riesengoldrutenkraut Ch.8108372

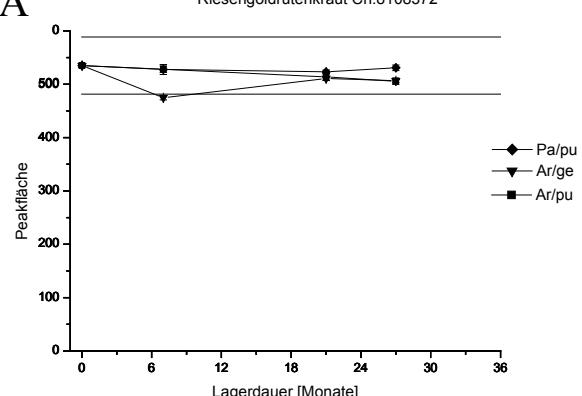


Abb. 21: Veränderung der Peakflächensumme in *S. virgaurea* (A) und *S. gigantea* (B) während der Lagerung

3.1.4 Ringelblumenblüten

3.1.4.1 Allgemeines



Abb. 22: *Calendula officinalis* L.

Bei der Ringelblume (*Calendula officinalis* L., Asteraceae) handelt es sich um 30 – 50 cm hohe Pflanzen mit wechselständigen, weich behaarten Blättern. Die bis zu 50 Infloreszenzen sind 2 – 5 cm breit, leuchtend gelb bis orange gefärbt und bestehen aus inneren Röhren- oder Scheibenblüten und 2-3 Reihen äußeren Zungen-oder Strahlblüten [ISAAC (1994)]. In den Handel gelangen neben den reinen Ringelblumenblüten (*Calendulae flos*), die in den Standardzulassungen und Ph. Eur. offizinell sind, auch Ringelblumenblüten mit Blütenkelch (*Flores Calendulae cum calycibus*) und Ringelblumenblüten mit Kraut (*Flores Calendulae cum herba*). Die Bedeutung der letzten beiden Handelsformen der Droge ist jedoch gering

[ISAAC (2000)]. Bei *Calendulae flos* handelt es sich um die „völlig entfalteten, vom Blütenstandsboden abgetrennten, getrockneten Zungenblüten“ [HAGER (2002)]. Die Droge stammt vorwiegend aus dem Anbau in Ägypten, Ungarn, Polen und den Balkanländern [HAGER (2002)].

3.1.4.2 Indikationen und Anwendung

Dem ätherischen Öl von Ringelblumenblüten wird eine antimikrobielle Wirkung zugeschrieben, wofür die enthaltenen Terpenalkohole und Terpenlaktone verantwortlich sein dürften. Darüberhinaus besitzen Ringelblumenzubereitungen eine entzündungshemmende [DELLA LOGIA (1994)] und granulationsfördernde Wirkung [WISSINGER-GRÄFENHAHN (2000)]. Die Kommission E nennt als Anwendungsgebiete „Wunden, auch mit schlechter Heilungstendenz, Ulcus cruris und entzündliche Veränderungen der Mund- und Rachenschleimhaut“ [BANZ (1986)]. Die ESCOP (1986) gibt als Indikationen „Entzündungen von Haut und Schleimhaut und Förderung der Wundheilung“ an. Daneben besitzen Ringelblumenblüten immunmodulatorische, antitumorale und ulkusprotektive Effekte [ISAAC (1994)]. Die Anwendung von Ringelblumenblüten erfolgt in Form von Teeaufgüssen, Tinkturen oder Salbenzubereitungen.

3.1.4.3 Inhaltsstoffe

[Übersicht in HAGER (2002), JÄNICKE (2003)]

- Triterpenglykoside: 2- 10 % an Saponosiden (Oleanolsäureglykoside)
- Triterpenalkohole abgeleitet vom Taraxan-, Lupen-, Oleanen-, Ursen-Typ, meist verestert mit Essigsäure, Laurin-, Myristin-, oder Palmitinsäure
- Carotinoide
- Cumarine: Hydroxycumarine (z. B. Umbelliferon, Scopoletin)
- Ätherisches Öl (ca. 0,3-0,8%) [STEINEGGER et al. (1999)]
- Polysaccharide (ca. 15%): Pektine, Hemicellulose und wasserlösliche Polysaccharide
- Flavonoide (bis zu 0,8 %): Quercetin-, Kämpferol-, und Isorhamnetin-O-glykoside [WAGNER (1999 E)]

In HAGER (2002) werden folgende Quercetin- und Isorhamnetinglykoside als Inhaltsstoffe aufgeführt:

Quercetin-3-O-(2',6'-dirhamnosyl)-glucosid

Isorhamnetin-3-O-(2',6'-dirhamnosyl)-glucosid

Quercetin-3-O-(2'-rhamnosyl)-glucosid

Isorhamnetin-3-O-(6'-rhamnosyl)-glucosid

Isorhamnetin-3-O-(2'-rhamnosyl)-glucosid

Abb. 23 gibt den HPLC-Fingerprint eines Ringelblumenblütenextraktes wieder. Da die oben angegebenen Inhaltsstoffe als Referenzsubstanzen nicht zur Verfügung standen, war eine Zuordnung vieler Peaks nicht möglich. Peak 7, der bei 340 nm flächenmäßig dominierende Bestandteil, konnte als Isorhamnetin-3-O-(6'-rhamnosyl)-glucosid (= Isorhamnetin-3-rut) identifiziert werden. Die Aglyka Quercetin und Isorhamnetin ließen sich in den Extrakten nicht nachweisen.

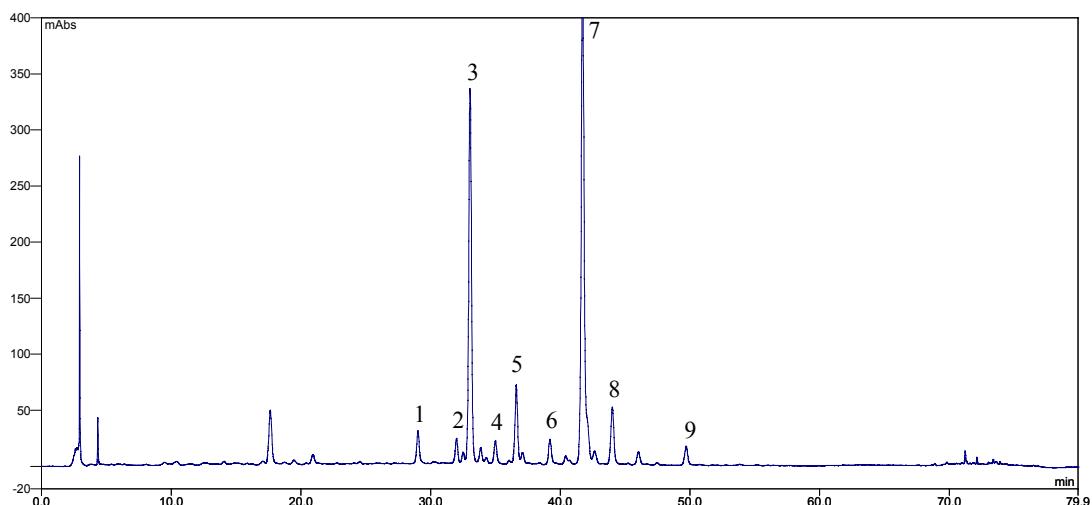


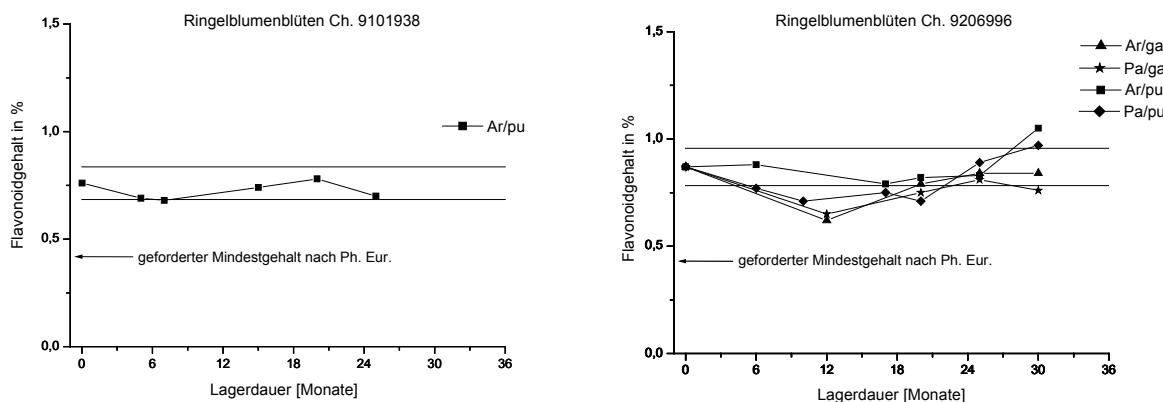
Abb. 23: HPLC-Fingerprint eines Extraktes von *Calendulae Flos* (*Calendula officinalis L.*)

Peakzuordnung: 1-4=n. b.; 5=Hyperosid; 6,9=n.b.; 7=Isorhamnetin-3-rut; 8= Isorhamnetin-3-glu;

3.1.4.4 Stabilitätsuntersuchungen mit Ringelblumenblüten-Drogenmaterialien

Folgende Diagramme zeigen den Verlauf des Gesamtflavonoidgehaltes, bestimmt nach der Methode der Ph. Eur. (Abb. 24). Die Gehaltswerte der einzelnen Chargen bewegen sich größtenteils innerhalb des geforderten Haltbarkeitsintervalls, das eine Schwankung im Bereich von +10 % und –10 % um den Ausgangswert zuläßt. Die stärkere Abnahme einiger Muster bei Ch. 9206996 während der ersten 12 Monate der Lagerung sollten als Ausreißer betrachtet werden und dürfte zum einen an der geringen Zahl der Meßwerte (zwei) liegen, zum anderen an bereits erwähnten Zerkleinerungs- und Freisetzungssproblemen.

Während der Lagerzeit bleibt der Flavonoidgehalt im Rahmen der Meßwert-Schwankungsbreiten konstant, ein Einfluß der Verpackung bzw. der Schnittgröße auf die Stabilität der Flavonoide läßt sich nicht erkennen.



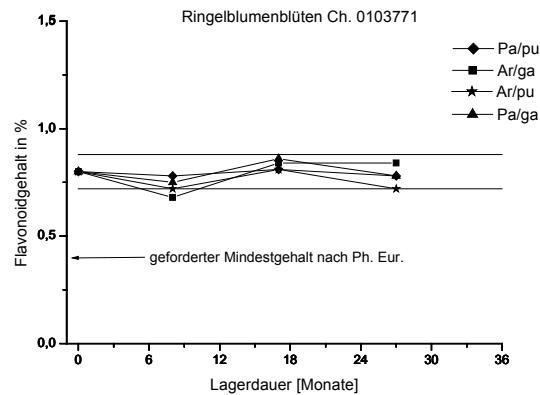


Abb. 24: Verlauf des Gesamtflavonoidgehaltes von drei unterschiedlichen Ringelblumenblüten-Chargen

Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen verschiedener Ringelblumen-Chargen (Abb. 25) zeigen ebenfalls einen über die Lagerdauer konstanten Verlauf der Peakflächensummen, was einem gleichbleibenden Gehalt an Flavonoiden entspricht.

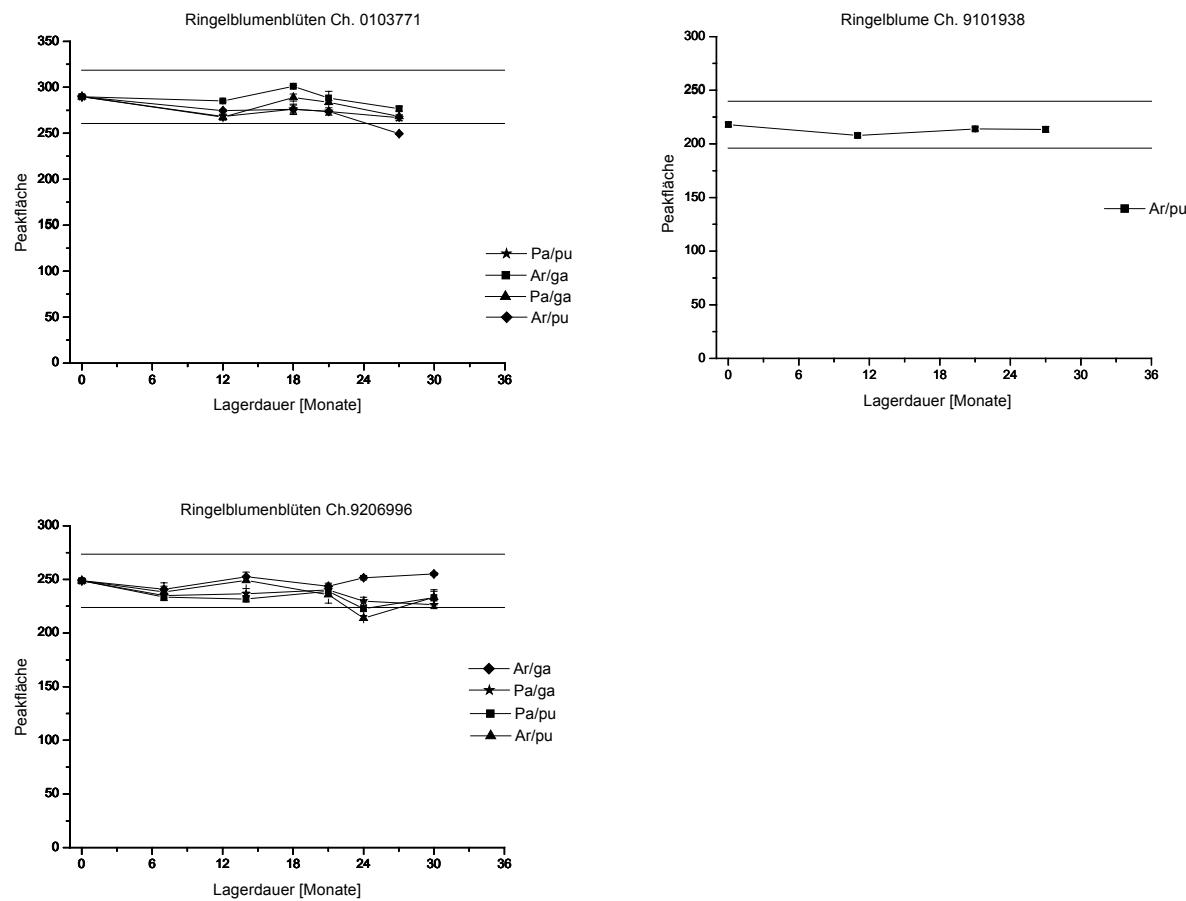


Abb. 25: Veränderung der Peakflächensumme von drei unterschiedlichen Ringelblumenblüten-Chargen

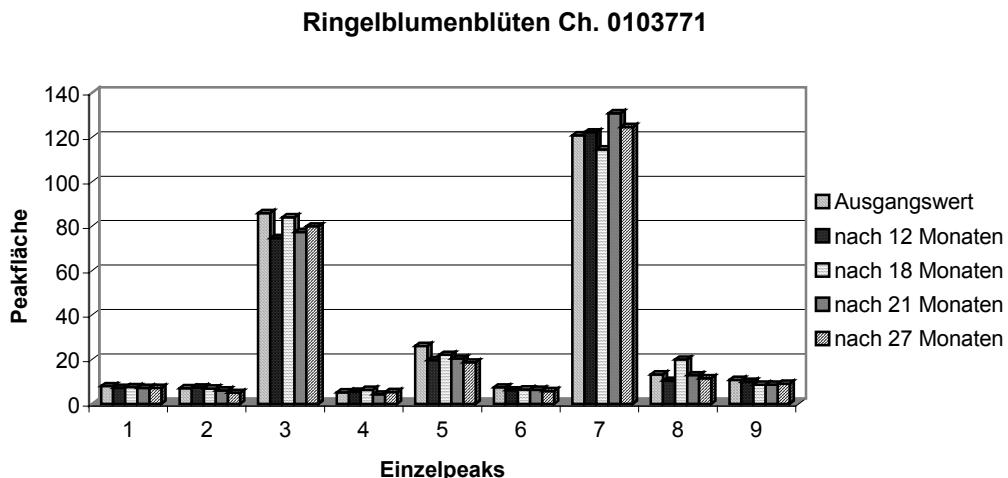


Abb. 26: Veränderungen der Peakflächen der Einzelkomponenten in *Calendulae flos*-Extrakten während der Lagerung

Peakzuordnung: 1-4=n. b.; 5=Hyperosid; 6,9=n.b.; 7=Isorhamnetin-3-rut; 8= Isorhamnetin-3-glu;

In Abb. 26 sind die jeweiligen Peakflächen der einzelnen Flavonoide in Ringelblumenblüten über einen Lagerzeitraum von 27 Monaten dargestellt. Auf die Angabe der Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Die einzelnen Komponenten zeigen keine signifikanten Veränderungen während der Lagerung. Die relativ konstant bleibenden Peakflächen der Flavonoide zu den Prüfzeitpunkten deuten auf eine hohe Stabilität dieser Verbindungen hin.

3.1.5 Passionsblumenkraut

3.1.5.1 Allgemeines



Abb. 27: *Passiflora incarnata* L.

Bei der Passionsblume (*Passiflora incarnata* L., *Passifloraceae*) handelt es sich um einen ausdauernden Kletterstrauch mit wechselständigen, leicht behaarten Laubblättern. Auffallend sind die strahlig gebauten Blüten von 5-9 cm Durchmesser mit 5 weißen Kronblättern und einer innerhalb der Kronblätter liegenden Nebenkrone aus purpurrot gefärbten, konzentrisch angeordneten Fadenkränzen [HAGER (2002)]. Pharmazeutisch verwendet wird das Kraut der Passionsblume (*Passiflorae herba*), das aus rundlichen, hohlen Stengelteilen und grünen bis braungrünen Blattstücken und korkenzieherartig eingerollten Ranken besteht. Zur Ernte wird die Periode kurz vor der Blütezeit empfohlen, um

einen hohen Flavonoidgehalt im Drogenmaterial zu erhalten [MENGHINI et al.(1988)]. Ein hoher Stengelanteil muß als wertmindernd betrachtet werden, da diese einen deutlich geringeren Gehalt an Flavonoiden besitzen. [SCHILCHER (1967), MEIER (1995 B)] und somit den Flavonoidgehalt der Droge herabsetzen. Passionsblumenkraut wird vorwiegend aus den Südstaaten der USA, Mexiko und Indien importiert [HAGER (2002)].

3.1.5.2 Indikation und Anwendung

Zubereitungen aus Passionsblumenkraut werden von der Kommission E und ESCOP bei nervöser Unruhe, leichten Einschlafstörungen und nervös bedingten Beschwerden im Magen-Darm-Trakt empfohlen [BANZ (1990), ESCOP (1997)]. Nach intraperitonealer Verabreichung an Ratten zeigten Extrakte von *Passiflora incarnata* antinozizeptive und sedierende Effekte. So verlängert sich nach Untersuchungen von SPERONI (1988) die Schlafdauer bei Ratten signifikant. Des Weiteren zeigte sich in Tierversuchen eine blutdrucksenkende und das Atemzentrum stimulierende Wirkung. Diese älteren Untersuchungen wurden mit unzureichend definierten Extrakten durchgeführt und bedürfen der Überprüfung [HAGER (2002)]. Untersuchungen zu spasmolytischen und kardialen Effekten (Blutdruck- und Herzfrequenzsenkung) werden nicht zuletzt wegen der hohen eingesetzten Dosen von Passionsblumenkrautextrakten von MEIER (1995 B) als wenig beweiskräftig beurteilt.

Kontrollierte und statistisch aussagekräftige klinische Studien am Menschen sind nicht beschrieben. In der Praxis kommen häufig Kombinationspräparate zum Einsatz, in denen Passionsblumenkraut mit weiteren schlaffördernden Drogen wie Hopfen, Melisse oder Baldrian kombiniert wird. Dies erscheint sinnvoll, um die bislang wissenschaftlich nicht ausreichend belegte, relativ schwach ausgeprägte schlaffördernde Wirkung von Passionsblumenkraut-Zubereitungen zu ergänzen.

3.1.5.3 Inhaltsstoffe

[HAGER (2002), STEINEGGER et al. (1999)]

- Alkaloide: Das Vorkommen von Harmanalkaloiden gilt als umstritten. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß diese nicht oder höchstens in Spuren in *Passiflora incarnata* vorkommen [REHWALD et al. (1994), MEIER (1995)].
- cyanogene Glykoside (Gynocardin)
- Flavonoide (bis 2,5 %)

Kennzeichnend ist das ausschließliche Vorkommen von Flavonoid-C-Glykosiden mit Apigenin- bzw. Luteolin-Grundstruktur. Im HPLC-Fingerprint verschiedener Muster sind nach MEIER (1995 A) und BILIA et al. (2002) stets folgende C-Glykoside nachweisbar:

- Schaftosid / Isoschaftosid
- Isoorientin / Isoorientin-2“-O-glucosid
- Isovitetin / Isovitetin-2“-O-glucosid

(Strukturformeln siehe Abb. 12, Abschnitt 3.1.2)

Diese Aussage konnte durch eigene Analysen bestätigt werden. Abb. 28 zeigt einen typischen HPLC-Fingerprint eines Passionsblumenkrautextraktes. Hier wurde eine HPLC-Methode mit relativ kurzer Laufzeit (24 min) verwendet, die bereits für Passionsblumenkrautextrakte optimiert war [KRENN et al. (1995)]. Das Fließmittelgemisch des Gradienten setzte sich aus Wasser (A) und Acetonitril 100 % (B) zusammen. (genaue Bedingungen siehe Methodenteil 5.2.2.4 c)

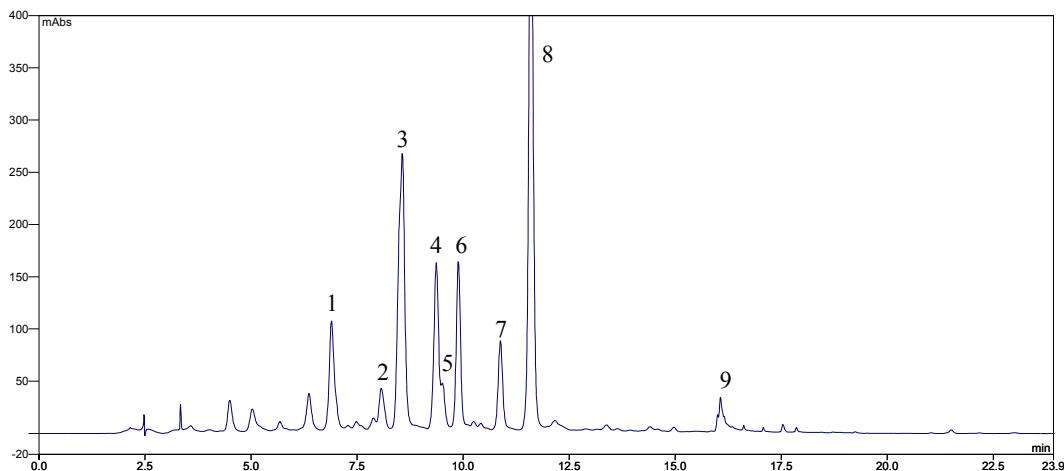


Abb. 28: HPLC-Fingerprint eines Extraktes von *Passiflora incarnata L.*

Peakzuordnung: 1,2=n.b.; 3= Schaftosid, Isoschaftosid (Koelution); 4=Isoorientin; 5=Orientin; 6= Vitexin-2“-O-rha; 7=Vitexin; 8= Isoviten; 9=n.b.

3.1.5.4 Stabilitätsuntersuchungen mit Passionsblumenkraut-Drogenmaterialien

Abb. 29 zeigt den Gesamtflavonoidverlauf für zwei unterschiedliche Chargen Passionsblumenkraut. Die Flavonoidwerte zeigen über die Lagerdauer einen relativ konstanten Verlauf. Die Werte der einzelnen Muster nach 28 monatiger Lagerung liegen größtenteils im Haltbarkeitsintervall zwischen + 10 % und – 10 %. Als Untersuchungsmethode diente hier die Quantifizierung als Al-Chelatkomplex nach salzsaurer Hydrolyse [PH. EUR.(1) (2002)]. Die zum überwiegenden Teil vorkommenden C-Glykoside werden unter diesen Bedingungen nicht hydrolysiert und entgehen somit der Bestimmung [SCHMIDT et al. (1993)]. Die ermittelten Werte müssen als zu niedrig angesehen werden. Aufgrund dieser seit langem bekannten Problematik [GLASL, BECKER (1984)] wurde im NT 2000 der Ph. Eur. für Passionsblumenkraut und Crataeguskraut mit Blüten eine geänderte Methode zur Gehaltsbestimmung aufgenommen. Bei dieser werden die Flavonoide ohne vorhergehende Hydrolyse nach Zusatz von Borsäure-Oxalat reagenz photometrisch vermessen [PH. EUR. (4) (2002)]. Der auf Vitexin bezogene, geforderte Gehalt liegt bei 1,5 % Gesamtflavonoide. In Tab. 6 sind die Gehaltswerte für Birkenblätter, Crataeguskraut und Passionsblumenkraut nach beiden Bestimmungsmethoden gegenübergestellt. Dabei zeigt sich deutlich, daß mit dem Borsäure / Oxalat reagenz höhere Gehaltswerte resultieren. Bei Passionsblume und Crataegus,

mit einem hohen C-Glykosidanteil, ist der Unterschied im ermittelten Flavonoidgehalt nach beiden Methoden im Vergleich zu Birkenblättern (v.a. O-Glykoside) besonders groß.

<i>Bestimmungsmethode</i>	<i>Borsäure / Oxalat</i>	<i>AlCl₃</i>
Crataegi Herba	1,91 %	0,53 %
Betulae Folium	3,05 %	1,70 %
Passiflorae Herba	3,80 %	0,64 %

Tab. 6: Flavonoidgehalt verschiedener Drogen mit unterschiedlichen Bestimmungsmethoden

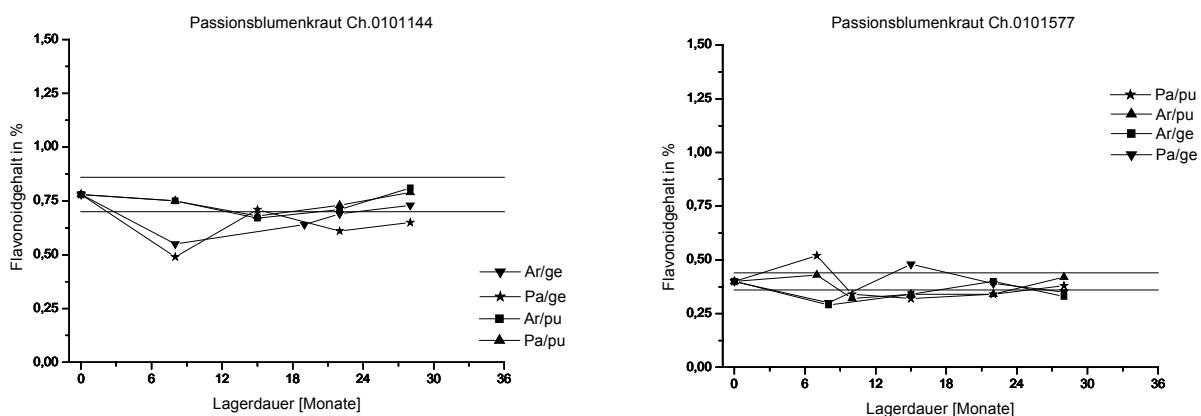


Abb. 29: Verlauf des Gesamtflavonoidgehaltes von zwei unterschiedlichen Passionsblumenkraut-Chargen

Aufgrund der auftretenden Probleme bei der Quantifizierung von C-Glykosylflavonen mittels photometrischer Methoden wird von REHWALD et al. (1994) eine Bestimmung der Flavonoide mit HPLC empfohlen. Die dort beschriebene HPLC-Fingerprintmethode erweist sich als sehr nützlich für Identitäts-, Qualitäts-, und Gehaltsbestimmung von Passionsblumenkraut-Drogenmaterial und daraus hergestellten Zubereitungen. Die Ergebnisse der HPLC-Analytik zeigen ebenfalls einen weitgehend konstanten Verlauf der Peakflächensummen (Abb. 30). Die Abnahme der Flavonoid-Peakflächen für die in geschnittenem Zustand gelagerten Drogen (Pa/ge und Ar/ge) zum Prüfzeitpunkt nach ca. 26 Monaten Lagerdauer sollten als Ausreißer gesehen werden. Die Ursache liegt hier vermutlich in Problemen bei der Zerkleinerung des relativ uneinheitlich zusammengesetzten Passionsblumenkrauts d.h. es liegen harte, verholzte Stengelanteile neben weichen Blattanteilen vor. Ein gut reproduzierbares Probenziehen ist daher problematisch, schwankende Gehaltswerte bzw. nicht erklärbare Ausreißer bei den Gehaltswerten können die Folge sein. Die in Abb. 30 mit einem Pfeil gekennzeichneten Punkte entsprechen Gehaltswerten, die von Drogenmaterial der selben Charge bestimmt

wurden, das jedoch statt der Lagerung bei 25°C und 60 % rF in einem Raum von ca. 18°C und nicht bestimmter Luftfeuchte gelagert wurde. Die Gehaltswerte dieser Rückstellmuster liegen innerhalb des Haltbarkeitsintervalls von – 10% / + 10 % des Ausgangswertes und unterscheiden sich nicht von den Werten des gemäß der ICH-Guideline gelagerten Drogenmaterials.

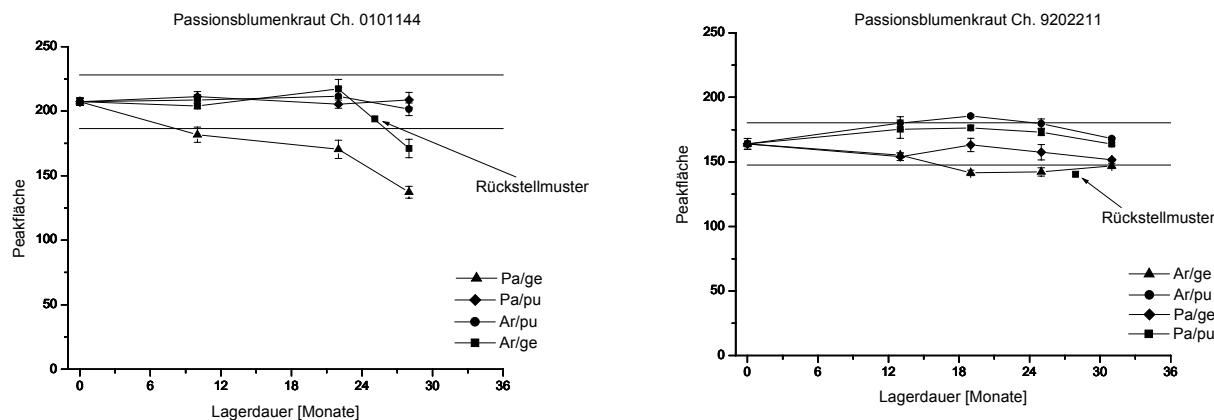


Abb. 30: Veränderung der Peakflächensumme von zwei unterschiedlichen Chargen *Passiflorae herba*

In Abb. 31 sind die Peakflächen der einzelnen Flavonoide einer Charge von Passionsblumenkraut im Verlauf der Lagerung dargestellt. Eine Veränderung des Flavonoid Fingerprints lässt sich nicht erkennen. Die gewonnenen Erkenntnisse decken sich mit Aussagen von MEIER (1995 A), wonach in der getrockneten Droge keine Veränderungen bei den C-Glykosylflavonen stattfinden sollen.

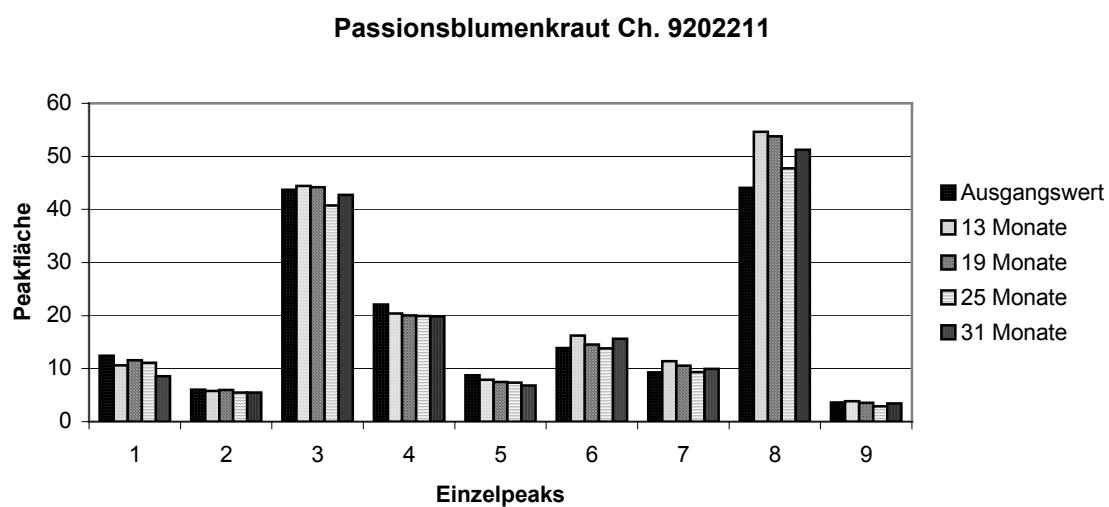


Abb. 31: Veränderung der Peakflächen der Einzelkomponenten in *Passiflorae herba* während der Lagerung

3.1.6 Mädesüßblüten

3.1.6.1 Allgemeines



Abb. 32: *Filipendula ulmaria* L.

Bei Mädesüßblüten (*Filipendula ulmaria* L., Rosaceae) handelt es sich um ein bis zu 2 m hohes Kraut mit wechselständigen, gefiederten Blättern, die an der Unterseite silbrig-grau behaart sind. Die zahlreichen weißen Blüten sind radiär gebaut und an trugdoldigen Blütenständen zu finden [JÄNICKE et al. (2003)]. Pharmazeutische Verwendung finden die Blüten (*Spiraeae flos*) und das Kraut (*Spiraeae herba*), wobei letzteres in der pharmazeutischen Praxis nur in geringem Umfang verwendet wird. Mädesüßblüten werden zur Zeit der Vollblüte abgekämmt und anschließend luftgetrocknet. Verwechslungen mit Holunderblüten (*Sambuci flos*) sind wegen des ähnlichen Aussehens möglich. Die Pflanze ist in

gemäßigten Klimazonen (Nordamerika, Europa, nördliche Teile Asiens) weit verbreitet, der Drogenbedarf in Deutschland wird durch Importe aus Polen, den Balkanländern und Bulgarien gedeckt.

3.1.6.2 Indikation und Anwendung

Mädesüßblüten werden entsprechend der Empfehlung der Kommission E zur unterstützenden Behandlung von Erkältungskrankheiten, resp. Husten und Bronchitis eingesetzt [BANZ (1989)]. Volksmedizinisch werden Teezubereitungen aus der Droge auch als Diuretikum, bei rheumatischen Beschwerden und Kopfschmerzen verwendet [JÄNICKE et al. (2003)]. Wegen des Vorkommens von Salicylsäurederivaten wird bei Überempfindlichkeit auf Salicylate von einer Anwendung abgeraten [BANZ (1989)]. Die Inhaltsstoffe der Droge zeigen antipyretische, aquaretische und antimikrobielle Wirkung [CSEDÖ et al. (1993)]. Die Droge kommt überwiegend in Kombinationspräparaten mit ähnlich wirkenden Arzneidrogen (in Erkältungstees, selten Blasentees) in den Handel.

3.1.6.3 Inhaltsstoffe

[nach HAGER (2002)]

- ätherisches Öl (mind. 0,2 %): Hauptkomponenten sind Salicylaldehyd und Salicylsäuremethylester, die für den charakteristischen Geruch der Droge verantwortlich sind
- Gerbstoffe (10-15%), chemisch nicht näher definiert
- Flavonoide (bis zu 5%): Quercetin-O-Glykoside mit der Hauptkomponente Spiraeosid (Quercetin-4'-O-glu), daneben Kämpferol-4'-O-glu, Hyperosid, Rutin, Avicularin

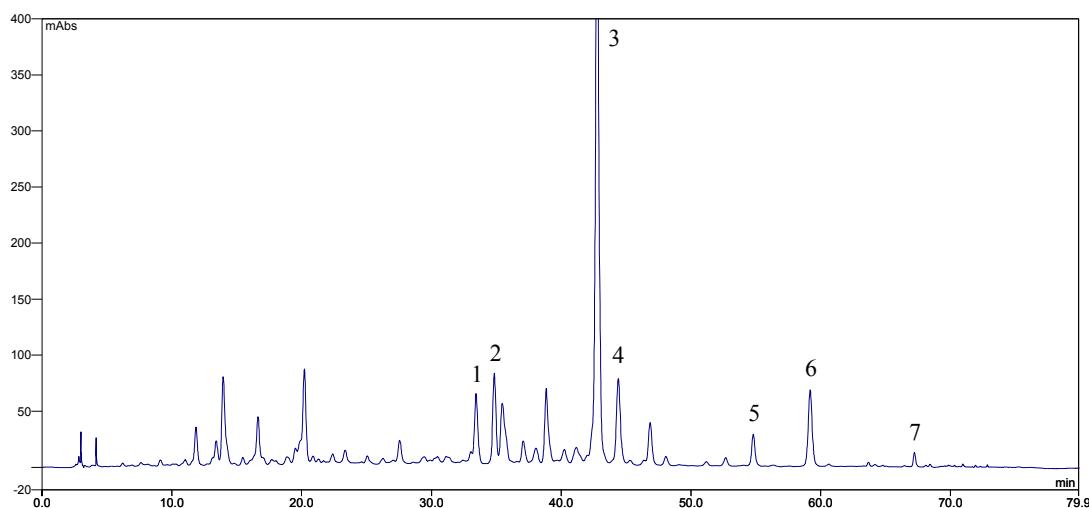


Abb. 33: HPLC-Fingerprint eines Extraktes von *Filipendula ulmaria L.*

Peakzuordnung: 1=Rutin; 2= Hyperosid; 3= Spiraeosid; 4,5=n.b.; 6= Quercetin; 7= n.b.

Charakteristisch für den HPLC-Fingerprint (Abb. 33) von Mädesüßblütenextrakten ist das dominierende Flavonoid Spiraeosid (Peak 3). Einige weitere Quercetin-O-Glykoside konnten zugeordnet werden (Peak 1, 2). Im Vergleich zu anderen Flavonoiddrogen, in deren Extrakten hauptsächlich Quercetin-Glykoside vorkommen, weisen Mädesüßblüten einen relativ hohen Gehalt des Aglykons Quercetin auf (Peak 6). Die Peakfläche von Quercetin liegt hier bei ca. 20 FE (Flächeneinheiten) im Vergleich zu 2-5 FE bei Extrakten von *Solidaginis herba* bzw. *Betulae folium*.

3.1.6.4 Stabilitätsuntersuchungen mit Mädesüßblüten-Drogenmaterialien

Abb. 34 zeigt die Werte des Gesamtflavonidgehalts für die in unterschiedlichen Schnittgraden und Packmitteln vorliegenden Proben. Der Flavonidgehalt befindet sich nach ca. 26-monatiger Lagerdauer im vorgeschriebenen Haltbarkeitsintervall um den

Ausgangswert zu Beginn der Lagerung. Die zu beobachtende Zunahme der Werte im Zeitintervall von ca. 12 bis 24 Monaten sollten als natürliche Schwankung der Arzneibuchmethode gedeutet werden, zumal sich die Werte am Ende der Lagerperiode wieder in der Nähe des Ausgangswertes befinden.

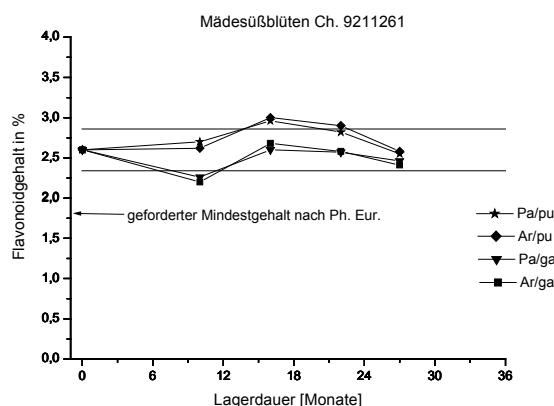


Abb. 34: Verlauf des Gesamtflavonoidgehalts einer Mädesüßblüten-Charge

Die Ergebnisse der parallel durchgeföhrten HPLC-Untersuchungen bestätigen die Resultate der photometrischen Arzneibuchmethodik. Die Gesamtpeakfläche verläuft über die Lagerdauer konstant und gleichmäßig. Der in Abb. 35 (B) dargestellte Verlauf von Spiraeosid (mengenmäßig dominierendes Flavonglykosid) und des Aglykons Quercetin zeigt ebenfalls einen konstanten und - mit dem der Gesamtpeakfläche identischen - Verlauf über die Lagerdauer. Es läßt sich weiterhin beobachten, daß die Drogenmuster, die in pulverisiertem Zustand gelagert wurden, höhere Gehaltswerte ergeben als die Ganzdroge. Möglicherweise kommt es beim Extraktionsvorgang zu einer besseren Freisetzung der Flavonoide aus dem pulverisierten Drogengut.

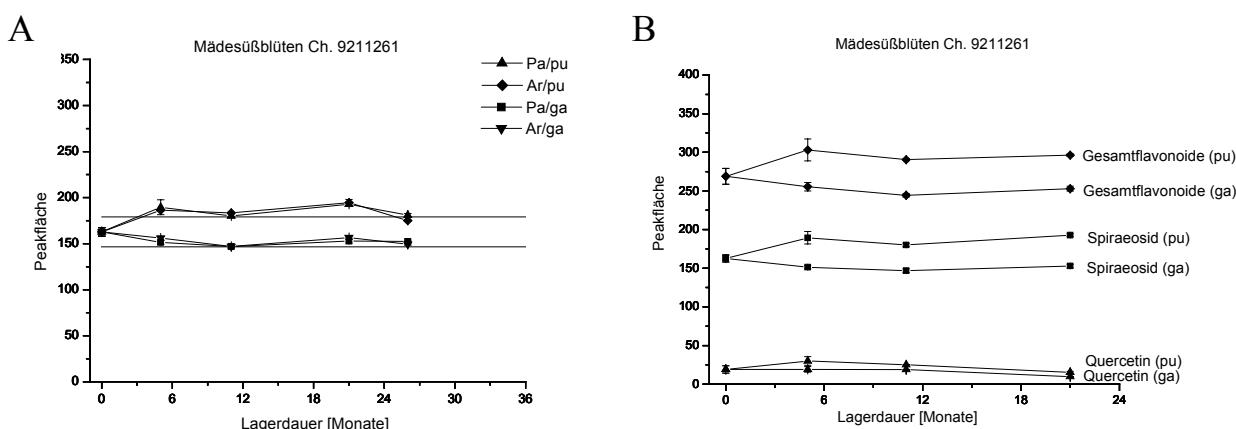


Abb. 35: Veränderung der Peakflächensumme einer Charge *Spiraeae flos* (A) und der Einzelkomponenten Spiraeosid und Quercetin (B)

3.1.7 Birkenblätter

3.1.7.1 Allgemeines



Bei Birkenblättern (*Betulae folium*) handelt es sich um die oberseitig dunkelgrün, unterseitig heller graugrün gefärbten Blätter mit gesägtem Rand von *Betula pendula ROTH* (Hängebirke) und *Betula pubescens EHRH.* (Moorbirke) (*Betulaceae*). Auffallend ist die charakteristische helle Netznervatur der Blätter. Die meist im Frühjahr gesammelten Blätter stammen aus Wildvorkommen vor allem aus osteuropäischen Importen [HAGER (2002), JÄNICKE et al. (2003)]. Im Handel befindet sich die Ganz-, Schnitt- und Pulverdroge.

Abb. 36: *Betula pubescens EHRH.*

3.1.7.2 Indikation und Anwendung

Birkenblätter werden verwendet bei Erkrankungen, bei denen eine erhöhte Harnmenge erwünscht ist, wie zur Durchspülungstherapie bei bakteriellen und entzündlichen Erkrankungen der ableitenden Harnwege, bei Nierengrieß und zur Vorbeugung von Harnsteinen. Untersuchungen an Ratten zeigten einen dosisabhängigen aquaretischen Effekt [SCHILCHER (1988), (1984)]. Klinische Studien bestätigten die Wirksamkeit von Tees mit diuretisch wirkenden Drogen bei Harnwegsinfektionen [JÄNICKE (2003), REUTER et al. (1985)]. Darüberhinaus werden Zubereitungen der Droge zur unterstützenden Behandlung bei Beschwerden des rheumatischen Formenkreises verwendet. Für die genannten Indikationen wurden Birkenblätter von der Kommission E und ESCOP positiv bewertet [BANZ (1992), ESCOP (1996)]. Volksmedizinisch werden Birkenblätter in sog. Blutreinigungstees und äußerlich in Form von Tinkturen bei Haarausfall und Kopfschuppen verwendet. Wissenschaftliche Belege für diese Anwendungsgebiete liegen aber nicht vor [CZYGAN (1989)]. Nach neueren Untersuchungen zeigen Birkenblätterextrakte eine der Acetylsalicylsäure vergleichbare Thrombozytenaggregationshemmung [SMIETANA et al.(1999)].

3.1.7.3 Inhaltsstoffe

[HAGER (2002)]

- Triterpen-Saponine: Triterpenalkohole vom Dammarantyp
- Monoterpenoglucoside [TSCHESCHE et al (1976)]
- Äther. Öl (0,05-0,1 %): u.a. Sesquiterpenoxide
- Phenolcarbonsäuren: u.a. Kaffeesäure, Chlorogensäure
- Ca. 4 % mineralische Bestandteile u. a. K^+ und Ca^{2+} -Salze
- Flavonoide (ca. 2-3 %): vor allem Flavonolglykoside mit Quercetin als Aglykon [DALLENBACH-TÖLKE et al. (1987) KEINÄNEN et al. (1998)]

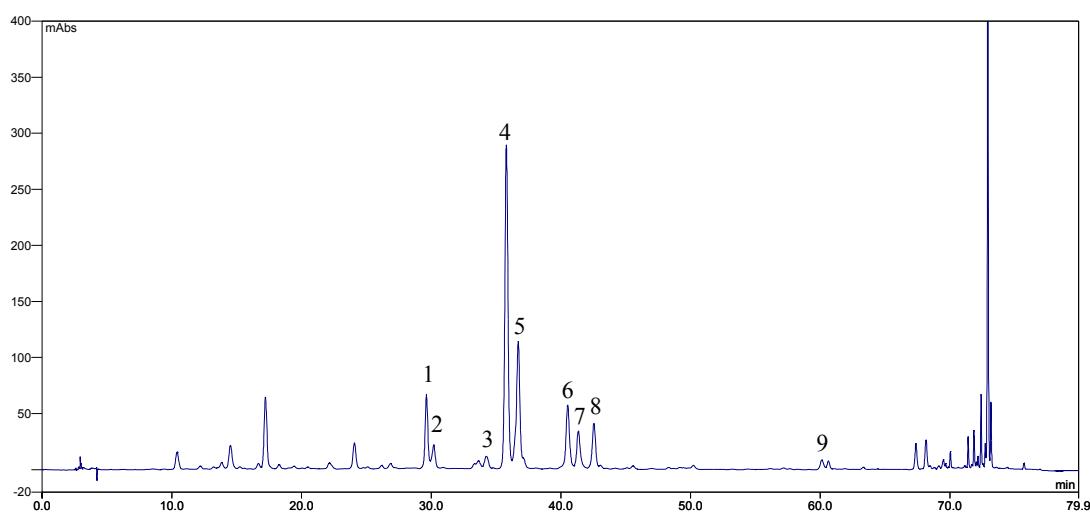


Abb. 37: HPLC-Fingerprint eines Extraktes von *Betulae folium* bei 340 nm

Peakzuordnung: 1,2=n. b.; 3=Myricitrin; 4=Hyperosid; 5=Isoquercitrin; 6=Avicularin; 7=n. b.; 8=Quercitrin; 9=Quercetin

Den charakteristischen HPLC-Fingerprint von Birkenblättern zeigt Abb. 37. Es kommen fast ausschließlich Flavonol-Glykoside vor, die sich von Quercetin ableiten. Hyperosid und Isoquercitrin (Quercetin-3-galactosid bzw. Quercetin-3-glucosid) machen den mengenmäßig größten Anteil der Flavonoidfraktion in Birkenblättern aus. Das Aglykon Quercetin (Peak 9) kommt nur in sehr geringer Menge vor.

3.1.7.4 Stabilitätsprüfung an Birkenblätter-Drogenmaterialien

Der Verlauf des Flavonoidgehaltes unter den Bedingungen eines Langzeitstabilitätstests (long term testing) zeigt keine signifikanten Veränderungen (Abb. 38). Die untersuchten Proben der Charge 9608057 (A) zeigen einen minimalen Abfall im Gehalt, der sich aber nach 12

monatiger Lagerdauer nicht fortsetzt. Die Gehaltswerte am Ende der Lagerperiode liegen knapp unterhalb des geforderten Mindestgehalts von 1,5 % Flavonoide (berechnet als Hyperosid); die Droge würde damit den Anforderungen von Ph. Eur. nicht mehr genügen.

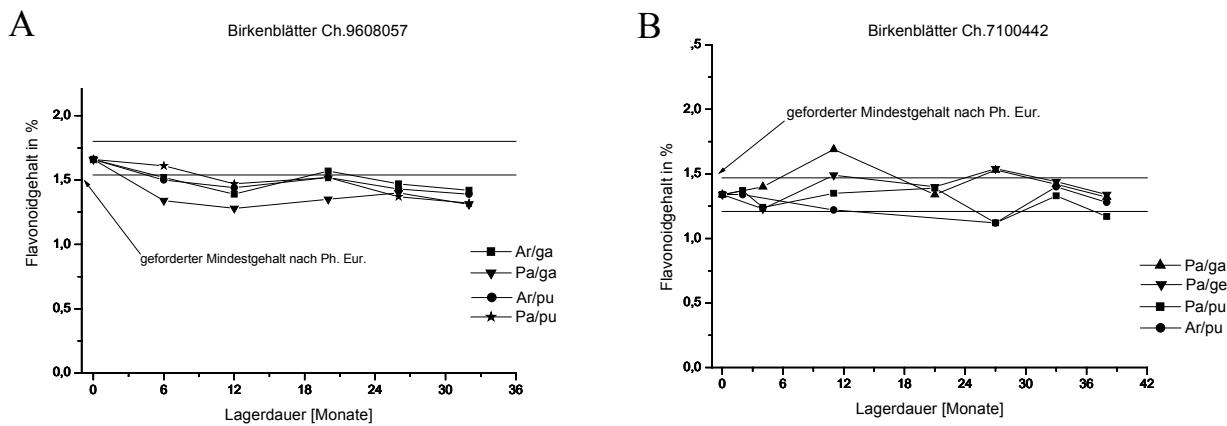


Abb. 38: Verlauf des Gesamtflavonoidgehaltes für zwei unterschiedliche Birkenblätter-Chargen

Bei Charge 7100442 (Abb. 38 (B)) liegt der zum Zeitpunkt der Einlagerung bestimmte Wert bei 1,34 % und entspricht damit nicht den Anforderungen des Arzneibuches. Die Gehaltswerte während der Lagerdauer schwanken mehr oder weniger stark um den Ausgangswert, verändern sich aber nicht signifikant.

In Abb. 39 ist für eine weitere Charge Birkenblätter die Entwicklung des Flavonoidgehaltes für die Packmittel Aromaschutzbeutel (A) und Papierbeutel (B) gegenübergestellt. Zwischen den einzelnen Schnittgraden und Packmitteln ergaben sich keine Unterschiede im ermittelten Gehalt.

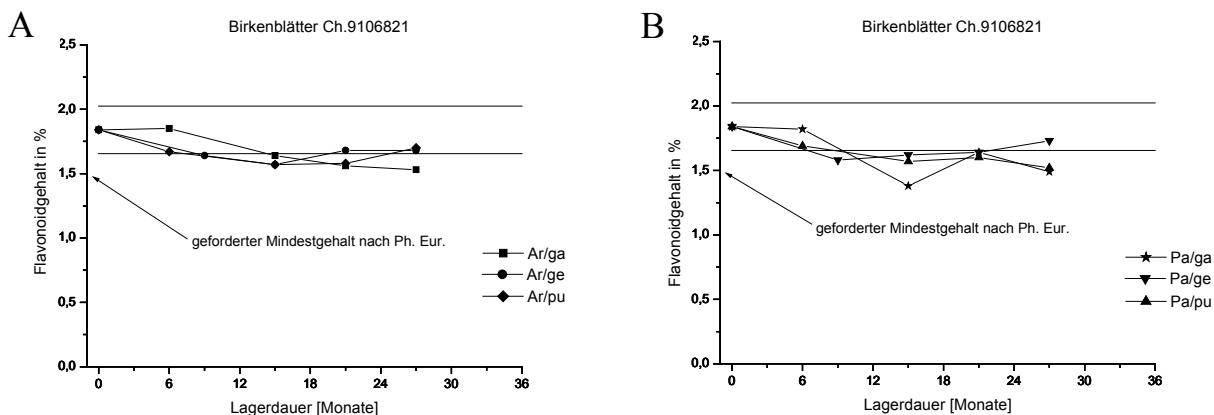


Abb. 39: Verlauf des Gesamtflavonoidgehaltes einer Birkenblätter-Charge für die unterschiedlichen Schnittgrade (ga, ge, pu) im Aromaschutzbeutel (A) und im Papierbeutel (B)

Die Untersuchungen mittels HPLC zeigen für verschiedene Birkenblätter-Chargen über die Lagerzeit einen relativ gleichmäßigen Verlauf der Flavonoid-Peakflächen (Abb. 40), die Einzelwerte zu den Prüfzeitpunkten bewegen sich knapp unter- bzw. oberhalb des Haltbarkeitsintervalls von –10 % / +10 %. Die in den Diagrammen eingezeichneten Fehlerbalken zeigen geringe Standardabweichungen mit Variationskoeffizienten <5 %, was für eine gut reproduzierbare und validierte analytische Methodik spricht. Die Gehaltswerte der Proben mit unterschiedlichem Zerkleinerungsgrad bzw. in verschiedenen Packmitteln sind nahezu identisch und lassen keine Abnahme erkennen.

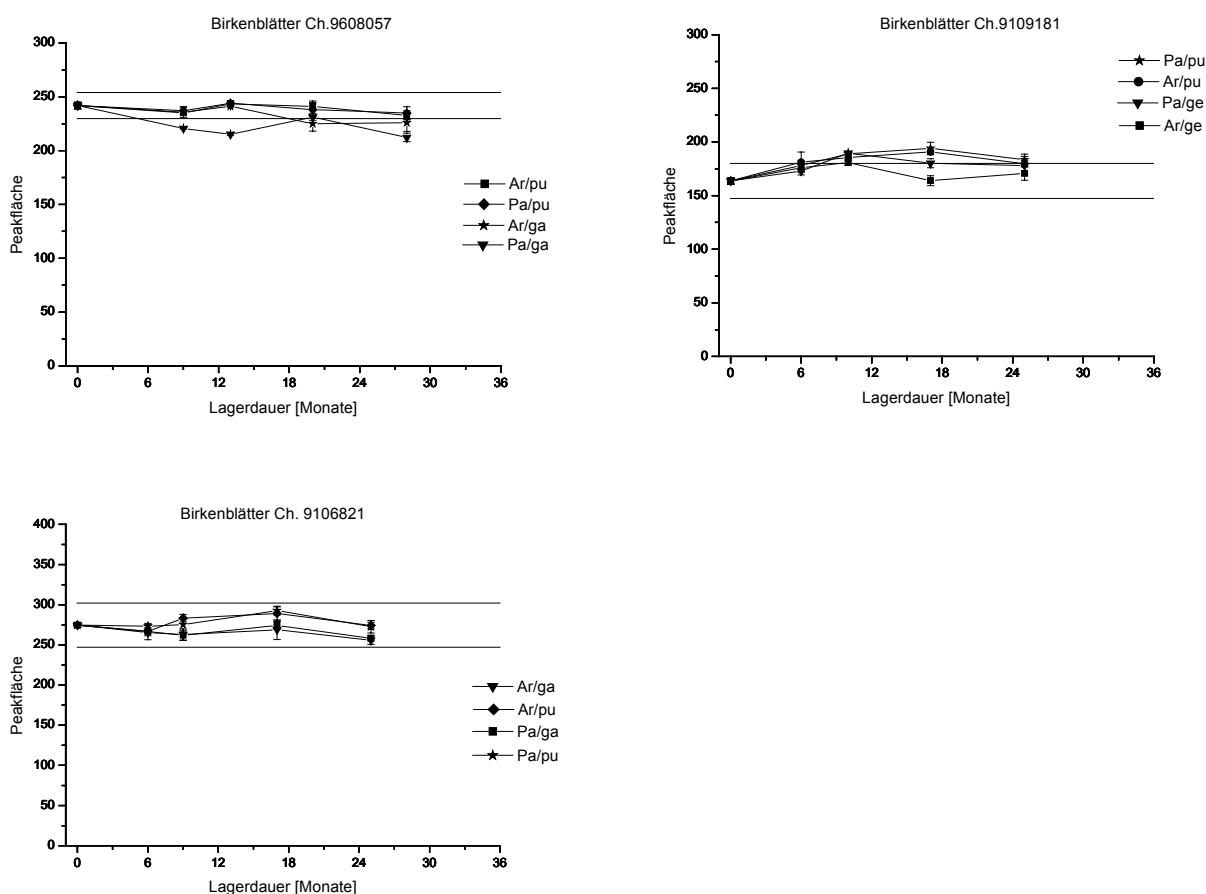


Abb. 40: Zeitlicher Verlauf der Peakflächensumme von verschiedenen Birkenblätter-Chargen

Bei den im Extrakt (MeOH 50 %) enthaltenen Flavonoid-O-Glykosiden Hyperosid und Isoquercitrin zeigen die unterschiedlich gelagerten Proben ebenfalls einen identischen Verlauf und einen über die Lagerdauer gleichbleibend stabilen Wert der Peakfläche (Abb. 41).

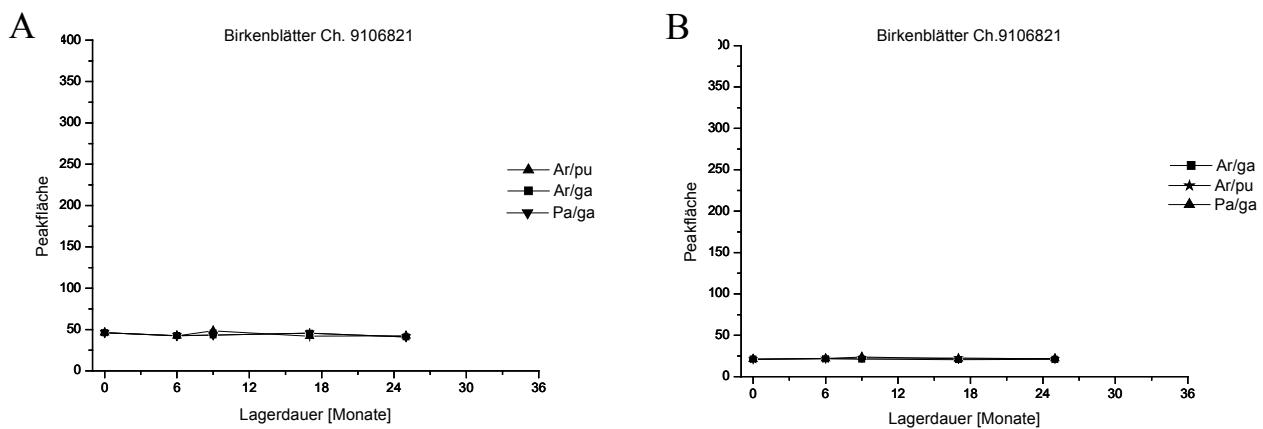


Abb. 41: Zeitlicher Verlauf der Peakfläche von Hyperosid (A) bzw. Isoquercitrin (B) in Birkenblättern

3.1.8 Ruhrkrautblüten

3.1.8.1 Allgemeines



Abb. 42: *Helichrysum arenarium* L.

Bei Ruhrkraut syn. Katzenpfötchen (*Helichrysum arenarium* (L.) MOENCH, Asteraceae) handelt es sich um eine ca. 10-30 cm hohe, ausdauernde Pflanze mit aufrechtem, graufilzigem, nur oben verzweigtem Stengel. Die wechselständigen Blätter sind unten spatelförmig, nach oben lanzettlich spitz zulaufend. Die kugeligen Blütenköpfchen sind zu 2-10 in Form einer Doldentraube angeordnet. Die aus zahlreichen gelben Röhrenblüten bestehenden Köpfchen sind von einem Hüllkelch mit zitronengelben, trockenhäutigen Blättchen umgeben. Als Droge (*Helichrysi flos*) gelangen die kurz vor dem Aufblühen gesammelten Blütenköpfchen in den Handel, die

vorwiegend aus Wildvorkommen in Mittel- und Südeuropa stammen [HAGER (2002)]. Wegen ihrer leuchtend gelben Farbe werden Ruhrkrautblüten häufig als Schmuckdroge verwendet.

3.1.8.2 Indikation und Anwendung

In verschiedenen Literaturstellen wird auf die gallenabsondernden (cholagogogen) Eigenschaften von Ruhrkrautblüten hingewiesen. Experimentelle Belege dafür finden sich jedoch nicht. Die Kommission E empfiehlt Zubereitungen aus Ruhrkrautblüten wegen ihrer schwach cholagogischen Wirkung bei dyspeptischen Beschwerden [BANZ (1988)]. Wegen einer schwach spasmolytischen Wirkkomponente wird die Droge als Adjutans bei krampfartigen Gallenblasenbeschwerden und chronischen Cholezystitiden eingesetzt. Wissenschaftliche Untersuchungen hierzu sind jedoch bislang nicht vorhanden. Neuere Forschungsergebnisse bewiesen eine antioxidative Wirkung (Radikalfängereigenschaften) von Ruhrkrautblüten-extrakten [CZINNER et al. (2001), (2000)].

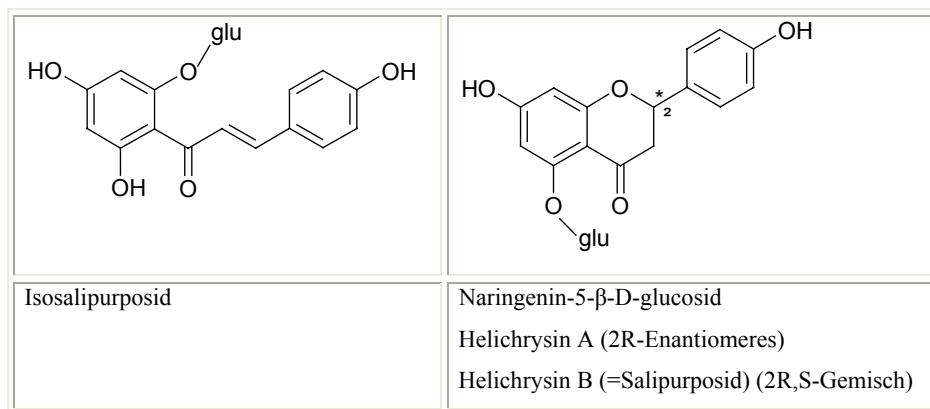
3.1.8.3 Inhaltsstoffe

[nach JÄNICKE et al. (2003)]

Neben Sesquiterpenbitterstoffen, geringen Mengen ätherischem Öl (0,04 %), Phtaliden und Kaffeesäurederivaten bilden die Flavonoide die wichtigste Inhaltsstoffgruppe [MERICLI et al. (1986)].

Isosalipurposid (ca. 0,35 %) (intensiv gelb gefärbtes Chalkonglykosid)

Helichrysin A und B: enantiomere Naringenin-5-O glucoside



Eine eindeutige Zuordnung der Peaks im Chromatogramm von Ruhrkrautblüten (Abb. 43) ist aufgrund mangelnder Literaturdaten und fehlender Referenzsubstanzen nicht möglich. Die UV-Spektren der Peaks 1-7 lassen vermuten, daß es sich bei diesen um Flavonoid- bzw. Chalkonstrukturen handelt.

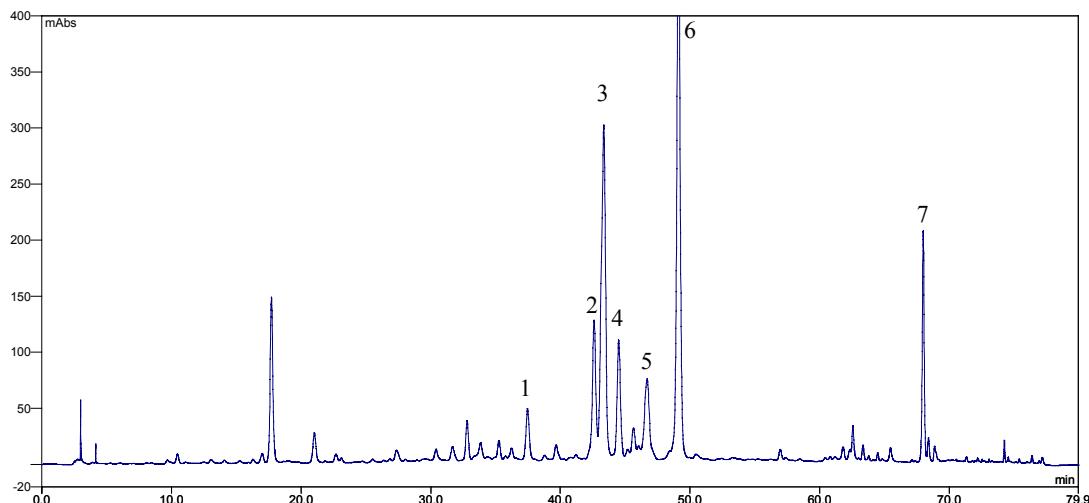


Abb. 43: HPLC-Fingerprint eines Extraktes von *Helichrysum arenarium* (L.) MOENCH bei 340 nm

Peakzuordnung: 1-7=n.b.

3.1.8.4 Stabilitätsuntersuchungen an Ruhrkrautblüten-Drogenmaterialien

Folgende Diagramme zeigen zum einen den Verlauf des Flavonoidgehaltes in Ruhrkrautblüten, bestimmt nach der Arzneibuchmethodik (Abb. 44), zum anderen den mittels HPLC (Abb. 45) bestimmten Peakflächenverlauf. In der untersuchten Charge Ruhrkrautblüten (Ch. Bez. 9205380) bleibt der Flavonoidgehalt bei allen Proben über mehr als 24 Monate konstant und die Einzelwerte zu den Prüfzeitpunkten liegen weitgehend im Haltbarkeitsintervall um den Ausgangswert. Betrachtet man den Gehaltsverlauf von Charge 8104496, so zeigt sich in Abb. 44 und Abb. 45 eine deutliche Zunahme, die bei mehr als 10 % über dem Ausgangswert liegt. Eine plausible Erklärung dieser Resultate kann nicht gegeben werden.

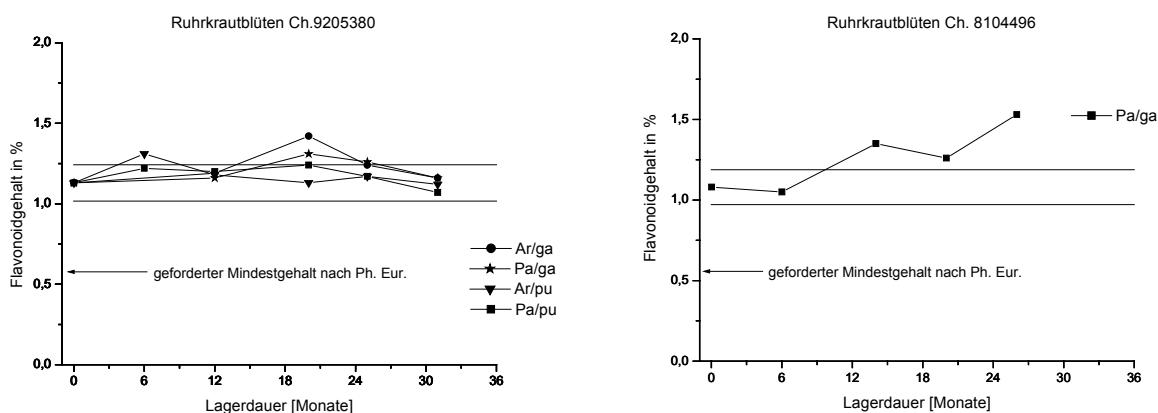


Abb. 44: Verlauf des Gesamtflavonoidgehaltes verschiedener Ruhrkrautblüten-Chargen

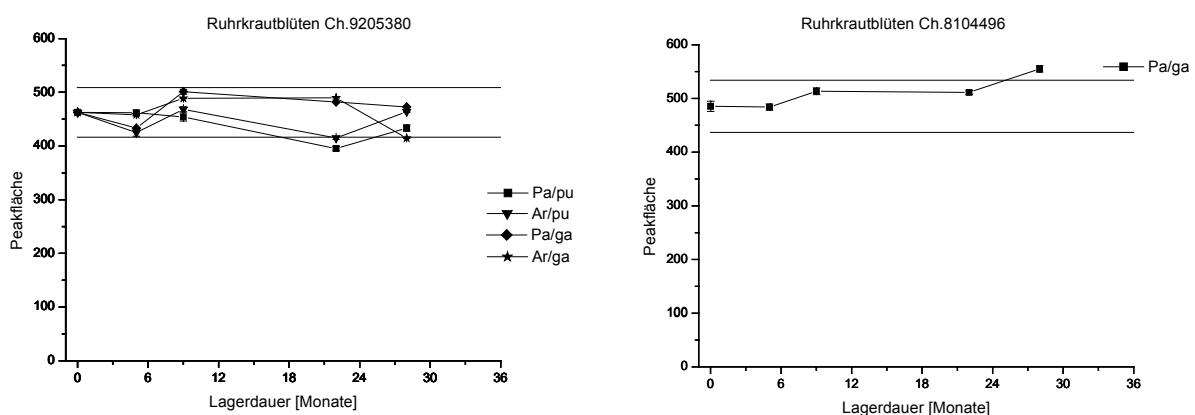


Abb. 45: Zeitlicher Verlauf der Peakflächensummen von verschiedenen Ruhrkrautblüten-Chargen

3.1.9 Holunderblüten

3.1.9.1 Allgemeines



Abb. 46: *Sambucus nigra* L.

Beim Holunder (*Sambucus nigra* L., *Sambucaceae*) handelt es sich um einen bis zu 7 m hohen Strauch oder Baum mit oberseits mattgrün, unterseits blaugrün gefärbten, gefiederten Laubblättern. Die Blüten sind in schirmförmigen Trugdolden mit 5 Hauptästen angeordnet und stark duftend. Die als Droge verwendeten Blüten von Holunder (*Sambuci flos*) sind weiß bis bräunlichgelb gefärbt und schrumpfen beim Trocknen bis auf 3 mm zusammen. Aus dem unterständigen Fruchtknoten entwickeln sich schwarz-violett gefärbte beerenartige Steinfrüchte mit rotvioletter Saft. Der Holunder kommt über ganz Europa

verbreitet vor, die Droge stammt hauptsächlich aus Rußland, Bulgarien, Ungarn und dem Balkan [JÄNICKE et al. (2003)]

3.1.9.2 Indikation und Anwendung

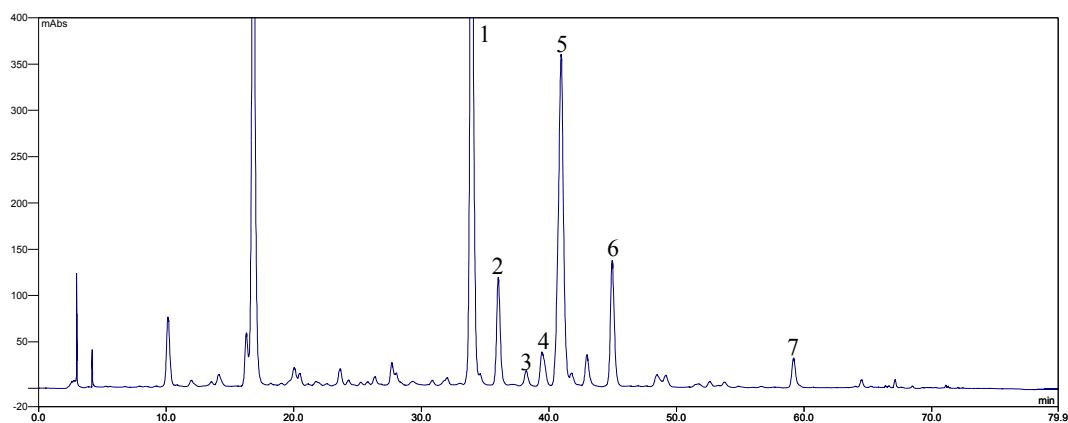
Holunderblüten besitzen eine schweißtreibende und die Bronchialsekretion steigernde (sekretolytische) Wirkung. Während zur schweißtreibenden Wirkung der Droge keine Untersuchungen bekannt sind, konnte die sekretsteigernde Wirkung im Tierexperiment belegt werden [CHIBANGUZA et. al (1984)]. Von der Kommission E wird die Anwendung bei fiebrigen Erkältungskrankheiten und Husten und Bronchitis empfohlen [BANZ (1986)]. Volksmedizinisch werden Holunderblüten neben Teezubereitungen in Form von Gurgelwässern und Mundspülflüssigkeiten bei Erkrankungen der Atmungsorgane, Kehlkopfentzündung und Grippe verwendet [HAGER (2002)]. Von WILLER (1997) konnten antiasthmatische Effekte von Holunderextrakten gezeigt werden. Dabei scheinen die Inhibition reaktiver Sauerstoffspezies und bestimmter Entzündungsmediatoren eine Rolle zu spielen.

3.1.9.3 Inhaltsstoffe

[Übersicht nach HAGER (2002)]

- ätherisches Öl (ca. 0,1 %) mit hohem Anteil an freien Fettsäuren
- Sterole: u.a. Cholesterin, Sitosterol, Campesterol
- Triterpene: u. a. α - und β -Amyrin, Oleanolsäure, Ursolsäure
- Hydroxyzimtsäuren: u. a. p-Cumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure
- Flavonoide (bis 3%) mit den Hauptkomponenten Rutin, Isoquercitrin, Quercitrin, Astragalin, Hyperosid

A



B

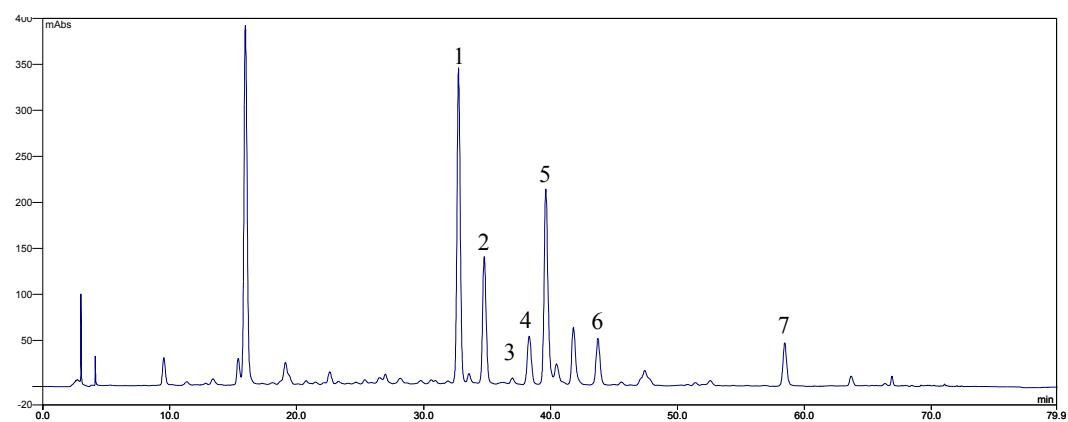


Abb. 47: HPLC-Fingerprint-Chromatogramme von Extrakten zwei verschiedener Chargen *Sambucus nigra L.* bei 340 nm (oben Ch: 9211644, unten Ch: 8102112)

Peakzuordnung: 1=Rutin; 2=Isoquercitrin; 3,4=n.b.; 5=Astragalin; 6=n.b.; 7=Quercetin

Der chromatographische Fingerprint von zwei unterschiedlichen Chargen (Abb. 47) Holunderblüten weist große Ähnlichkeit auf. Rutin (Peak 1) und Astragalin (Peak 5) sind in beiden Chargen die Flavonoide mit dem mengenmäßig größten Anteil.

3.1.9.4 Stabilitätsuntersuchungen an Holunderblüten-Drogenmaterialien

Der Gesamtflavonoidgehalt in Holunderblüten verändert sich während der Lagerung bei der Ganzdroge und der pulverisierten Droge unterschiedlich (siehe Abb. 48, photometrische Methode). In den im pulverisierten Zustand gelagerten Drogenmustern liegt der Flavonoidgehalt über dem der Ganzdroge. Des Weiteren ist bei den pulverisierten Drogenmustern ein Anstieg des Flavonoidgehaltes um ca. 20 % zu beobachten, während bei der Ganzdroge keine signifikante Zunahme des Gehaltes beobachtet werden kann. Die Einzelwerte schwanken relativ stark, was eine Stabilitätsbeurteilung schwierig macht. Bessere Resultate lieferten die HPLC-Untersuchungen (siehe Abb. 49, Abb. 50).

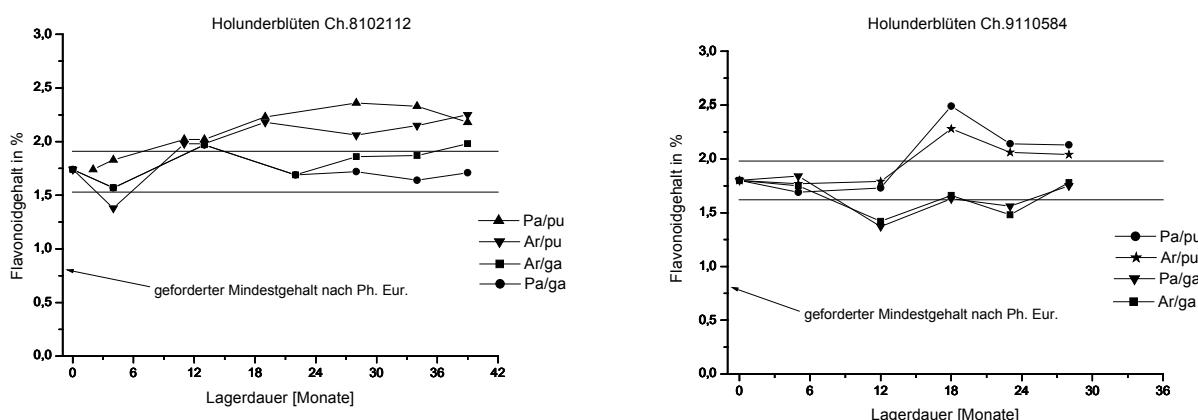


Abb. 48: Verlauf des Gesamtflavonoidgehalts für zwei unterschiedliche Holunderblüten-Chargen

Die resultierenden Werte ergeben einen relativ gleichmäßigen Verlauf der Peakflächen im Vergleich zu den Schwankungen im Gesamtflavonoidgehalt nach der Arzneibuchmethode. Es zeigt sich auch hier, sowohl für die Gesamtpeakflächen (Abb. 49) als auch für einzelne Flavonoide (Abb. 50), daß die Flavonoid-Peakflächen in der Ganzdroge niedriger sind als in der Pulverdroge. Als Ursachen sind eine schlechtere Freisetzung aus den ganzen Holunderblüten denkbar, es könnten aber auch enzymatische Abbaureaktionen in Betracht kommen. Da sich nach der Arzneibuchmethode keine signifikante Abnahme im Flavonoidgehalt der Ganzdroge ergaben und eine ca. 20%ige Abnahme des Gesamtpeakfläche nach der HPLC-Methode bei Pflanzenextrakten möglicherweise im Bereich der natürlichen

Schwankungen liegt, bedarf es weiterer Untersuchungen, um konkrete Aussagen machen zu können. Dieses Beispiel zeigt v.a. aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit die Überlegenheit einer HPLC-Analytik gegenüber photometrischen Methoden.

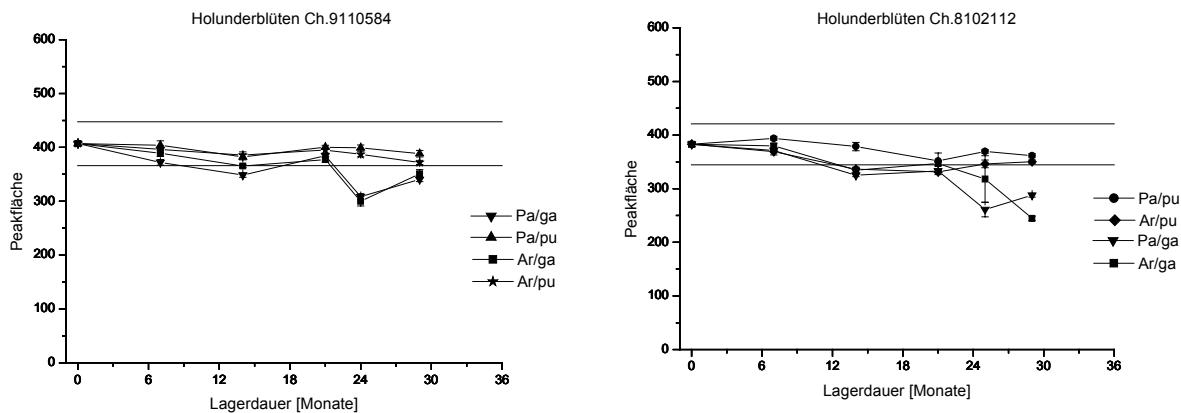


Abb. 49: Zeitlicher Verlauf der Peakflächensummen für zwei unterschiedliche Holunderblüten-Chargen

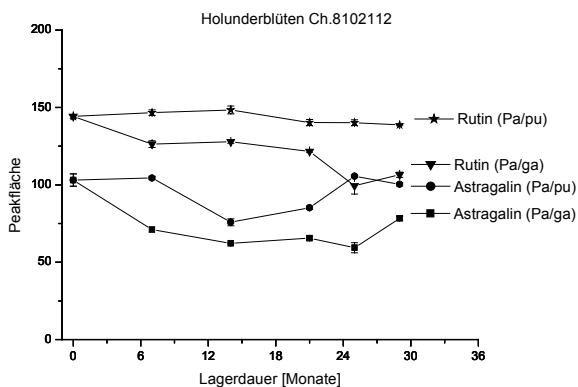


Abb. 50: Verlauf der Peakflächen von Rutin und Astragalin in Holunderblüten (Ch. 8102112)

In Abb. 50 ist die Gehaltsveränderung der Flavonoide mit der größten Peakfläche, Rutin und Isoquercitrin, einer Holunderblüten-Charge dargestellt. Während diese Komponenten der Flavonoidfraktion in der pulverisiert im Papierbeutel gelagerten Probe über zwei Jahre relativ stabil sind, ist bei der als Ganzdroge im Papierbeutel gelagerten Droge eine leichte Abnahme sichtbar (vgl. mit Abb. 49). Es wäre denkbar, daß die Zellmatrix von Drogenpulver, die wegen der größeren Oberfläche in stärkerem Maße Umwelteinflüssen ausgesetzt ist (v. a. Luftsauerstoff, Luftfeuchtigkeit), Abbaureaktionen unterliegt und beim Extrahieren des Drogenmaterials die Inhaltsstoffe leichter freigesetzt werden. Untersuchungen zu dieser Problematik sind in der Literatur nicht zu finden, weshalb weitergehende Versuche dazu Klarheit bringen sollten.

3.1.10 Stiefmütterchenkraut

3.1.10.1 Allgemeines



Abb. 51: *Viola tricolor* L.

Beim Stiefmütterchen (*Viola tricolor* L., *Violaceae*) handelt es sich um 10 - 30 cm hohe Pflanzen mit aufsteigendem, kahlem oder zerstreut behaartem Stengel. Die wechselständigen Laubblätter sind unten herzförmig nach oben länglich elliptisch geformt, die vorhandenen Nebenblätter sind fiederspaltig mit großem, gekerbtem Endabschnitt. Die Blüten sind lang gestielt mit fünf dreifarbigem Kronblättern (gelb, weißlich, rosa oder blauviolett) und von fünf lanzettlich-spitzen, deutlich kleineren Kelchblättern umgeben. Der als Droge verwendete Pflanzenteil (*Violae tricoloris herba*) besteht aus den zur Blütezeit gesammelten oberirdischen Teilen von *Viola tricolor* L. hauptsächlich der Unterarten

vulgaris (KOCH) OBORNY und *arvensis* MURRAY. Das Stiefmütterchen ist in den gemäßigten Zonen Europas und Asiens weit verbreitet, der Drogenbedarf wird durch Importe aus Holland gedeckt [HAGER (2002), JÄNICKE (2003)].

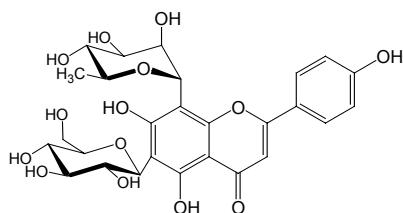
3.1.10.2. Indikation und Anwendung

Von der Kommission E wird die äußerliche Anwendung von Stiefmütterchenkraut-Extrakten bei leichten seborrhoischen Hauterkrankungen und Milchschorf bei Kindern positiv bewertet [BANZ (1986)]. Die volksmedizinische Anwendung bei Halsentzündungen und Katarrhen der Luftwege lässt sich durch reizlindernde und expektorierende Eigenschaften aufgrund des Schleim- und Saponingehalts der Droge erklären. Zugeschriebene antipsoriatische Eigenschaften werden ebenfalls dem Saponingehalt zugeschrieben [JÄNICKE (2003)]. Wissenschaftliche Belege dafür existieren jedoch nicht.

3.1.10.3 Inhaltsstoffe

[Übersicht in HAGER (2002), STEINEGGER (1999 B)]

- Polysaccharide (ca. 10 %), an deren Aufbau Glucose, Galactose, Arabinose, Rhamnose, Xylose und Uronsäuren beteiligt sind [FRANZ (1969)]
- Phenolcarbonsäuren (ca. 0,18 %): u. a. Kaffeesäure, p-Cumarsäure, Gentisinsäure sowie Salicylsäurederivate (Methylsalicylat, Violutosid (Glucosidoarabinosid von Methylsalicylat))
- Carotinoide: u. a. Violaxanthin, Violeoxanthin, Lutein, Neoxanthin [HANSMANN (1982)]
- Vorkommen von Triterpensaponinen ist umstritten [SCHILCHER (1984), SCHÖPKE et al. (1993)].
- Flavonoide (0,2 - 0,4 %): u. a. Rutin, Quercetin, Luteolin-7-glu, Luteolin, Saponarin, Violanthin (s. Formel) [WAGNER et al. (1972)], Vitexin, Orientin, Isoorientin



Strukturformel von Violanthin

Abb. 52 zeigt den typischen Fingerprint eines 50 %igen methanolischen Extraktes von Stiefmütterchenkraut. Im Chromatogramm sind bei 340 nm lediglich fünf Flavonoide nachweisbar, die bis auf Peak 3 den in Abb. 52 angegebenen Substanzen zugeordnet werden können. Als mengenmäßig dominierendes Flavonoid (Peak 4) konnte Rutin identifiziert werden. Das Aglykon Quercetin, das nach ca. 62 min eluieren sollte, kommt nicht in nachweisbaren Mengen vor.

3.1.10.4 Stabilitätsuntersuchungen an Stiefmütterchenkraut-Drogenmaterialien

Die beiden untersuchten Chargen besaßen einen Gesamtflavonoidgehalt, der mit 0,3 % (Ch. 8206284) bzw. 0,4 % (Ch.9106341) über dem geforderten Mindestgehalt des Arzneibuches von 0,2 % lag (Abb. 53). Der Flavonoidgehalt verlief bei Charge 8206284 relativ gleichmäßig, wobei die Endwerte nach 26-monatiger Lagerdauer verstreut über bzw. unterhalb des

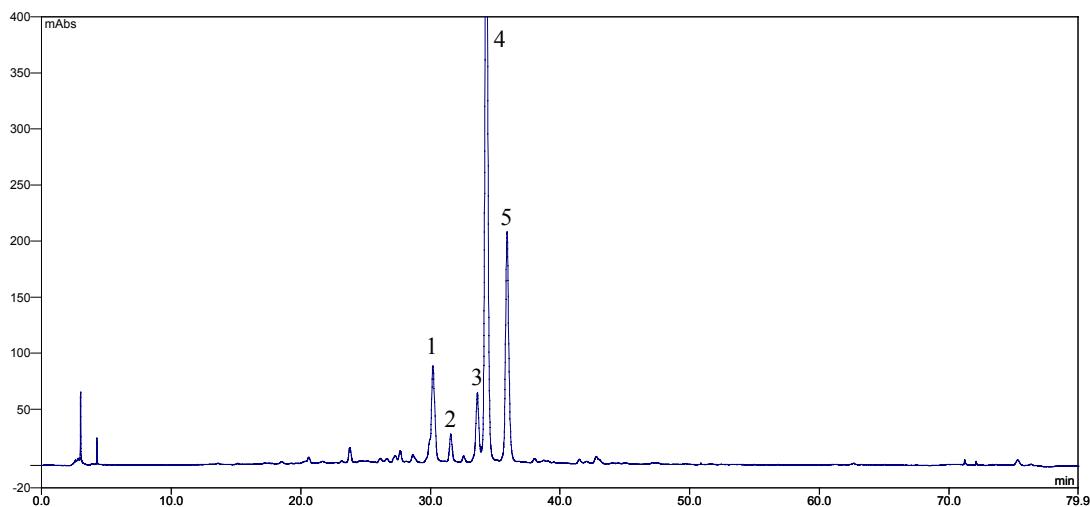


Abb. 52: HPLC-Fingerprint eines Extraktes von *Viola tricolor L.* bei 340 nm

Peakzuordnung: 1=Luteolin; 2=Vitexin; 3= n.b.; 4=Rutin; 5=Isoquercitrin

eingeziechneten Haltbarkeitsintervalls lagen. Charge 9106341 zeigt in den ersten 12 Monaten Lagerung eine deutliche Zunahme im Flavonoidgehalt, der gegen Ende der Langzeituntersuchungen wieder etwas abnimmt. Die Endwerte liegen hier ca. 10 % über dem Ausgangswert.

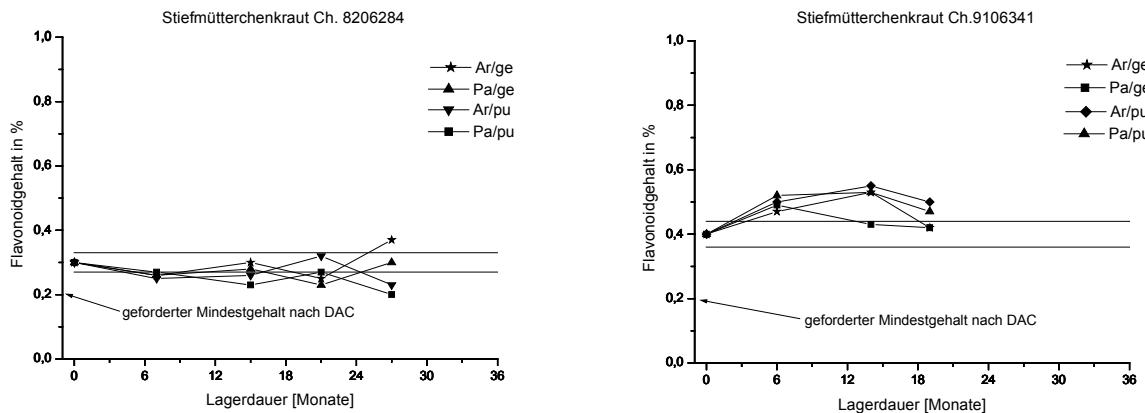


Abb. 53: Verlauf des Gesamtflavonoidgehaltes für zwei unterschiedliche Stiefmütterchenkraut-Chargen

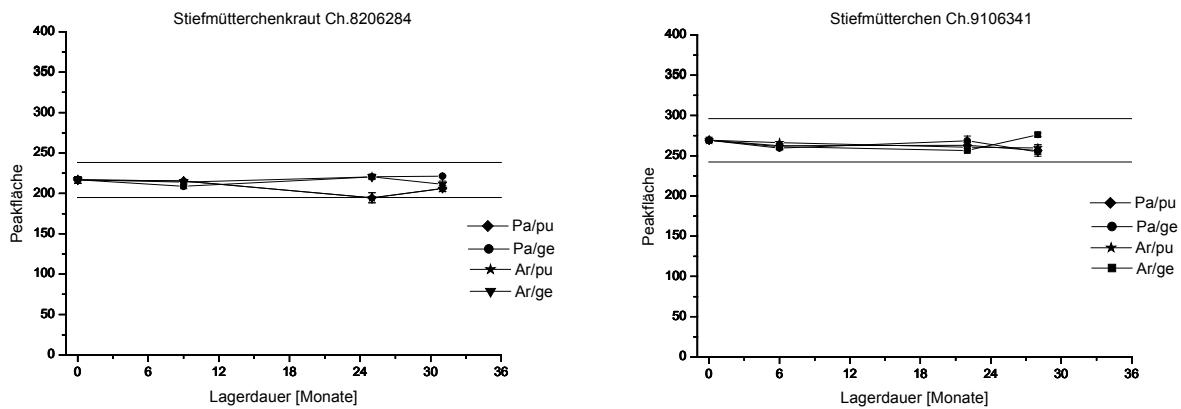


Abb. 54: Entwicklung der Gesamtpeakflächen von zwei unterschiedlichen Stiefmütterchenblüten-Chargen

Die HPLC-Untersuchungen ergaben, daß die Peakflächensumme der untersuchten Chargen (Abb. 54), wie auch einzelne Flavonoide (Abb. 55) konstante Werte im Verlauf der Lagerperiode zeigen. Die Werte der Peakflächen unterscheiden sich vom Ausgangswert nur minimal und liegen alle innerhalb des Haltbarkeitsintervalls von $\pm 10\%$.

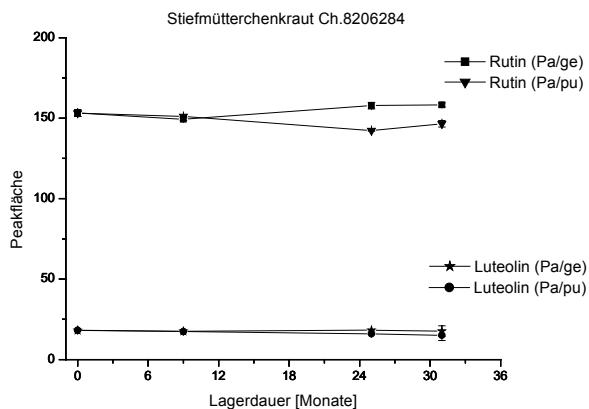


Abb. 55: Entwicklung der Peakflächen von Rutin und Luteolin in Stiefmütterchenkraut

3.1.11 Stabilität unter Stressbedingungen (accelerated testing)

Neben der Langzeitlagerung (long term testing) bei 25°C und 60 % rF wurden einige Drogen Stresstests unterzogen, um mögliche Instabilitäten von Flavonoiden erkennen zu können. In den ICH-guidelines [CPMP (1) (1998)] wird ein sog. „accelerated testing“ bei 40°C und 75 % rF über sechs Monate gefordert. Da die räumlichen Kapazitäten zur Simulation dieser Bedingungen begrenzt waren, konnten nicht alle Drogen unter diesen Verhältnissen untersucht werden. Daneben wurden einige Drogenmuster hohen Temperaturen von 80°C und 100°C (Simulation von Extrembedingungen), wie sie unter Umständen bei Trocknungsprozessen kurzzeitig auftreten können, ausgesetzt, um mögliche theoretische Zersetzungreaktionen zu überprüfen. Eine Lagerung bei 80°C bis 100°C mag praxisfremd erscheinen, wird aber im Hinblick auf die relativ große Stabilität von Flavonoiden bei 30 - 40°C als sinnvoll erachtet, um labile Inhaltsstoffe zu erkennen und mögliche Abbauprodukte zu identifizieren. Stabilitätsprüfungen bei erhöhten Temperaturen von 40°C - 70°C werden grundsätzlich dazu genutzt, um die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k einer Reaktion bei unterschiedlichen Temperaturen zu bestimmen und damit Rückschlüsse auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei niedrigeren Temperaturen zu erhalten [VOIGT (1993)]. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k kann nach der Arrhenius-Beziehung berechnet werden:

$$k(T) = A e^{-\left(\frac{E}{RT}\right)}$$

(E: Aktivierungsenergie [Jmol^{-1}], A: Stoßzahlfaktor, R: Gaskonstante, T: absolute Temperatur [K])

Die Anwendbarkeit der Arrhenius-Beziehung und Extrapolation der Konstanten k über den untersuchten Temperaturbereich hinaus ist an bestimmte Voraussetzungen geknüpft:

- Der untersuchte Wirkstoff liegt in einem Einphasensystem vor (Lösung oder Feststoff)
- Der Wirkstoff wird durch eine temperaturabhängige Reaktion abgebaut
- Reaktionsmechanismus und – ordnung müssen bekannt sein und dürfen sich im untersuchten Temperaturbereich nicht ändern

Nach Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k für eine Temperatur von 25°C (entspricht der Lagertemperatur bei den Langzeituntersuchungen), lässt sich eine

Laufzeitprognose für den Wirkstoff, dessen Gehalt um maximal 10 % abnehmen darf, errechnen. Eine Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k erfolgte in vorliegender Arbeit nicht, da zum einen keine absoluten Flavonoidmengen erfaßt wurden, zum anderen ohnehin umfassende Langzeitstabilitätsuntersuchungen bei 25°C durchgeführt wurden.

Die vorliegenden Daten zu Streßversuchen dienen somit in erster Linie dazu, Erkenntnisse über die Stabilität der Flavonoide bei erhöhter Temperatur und Luftfeuchtigkeit zu dokumentieren.

3.1.11.1 Accelerated testing bei 40°C / 75 % rF (gemäß ICH-guideline)

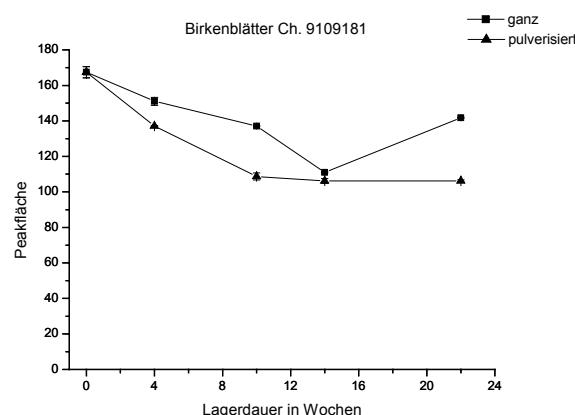
Um die Bedingungen von 40°C / 75 % rF zur erhalten, wurden die Drogenmuster in Exsikkatoren gelagert, in dem sich gesättigte NaNO₃-Lösungen befinden. Es stellt sich eine Gleichgewichtsfeuchte ein, die bei 75 % +/-3 % liegt. Die erforderliche Temperatur von 40°C wird durch Einstellen des Exsikkators in einen Trockenschrank erreicht.

Für Streßuntersuchungen bei 80°C und 100°C wird das Drogenmaterial in handelsüblichen Teetüten in Trockenschränken entsprechender Temperatur aufbewahrt; die herrschende relative Luftfeuchtigkeit bleibt hier unberücksichtigt.

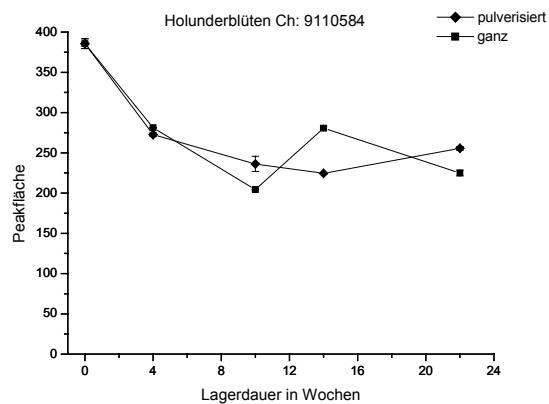
Abb. 56 (1-3) zeigt den Verlauf der Flavonoidpeakflächensummen während eines sechsmonatigen „accelerating testing“ bei 40°C / 75 % rF. Es ist eine signifikante Abnahme der Peakflächensummen während der Lagerperiode zu erkennen. Die Abnahme des Flavonoidgehaltes erfolgt zu Beginn des accelerating testing rasch und setzt sich nach einer Lagerdauer von drei Monaten nicht weiter fort. Nach ca. drei Monaten erreichen die Peakflächen einen Plateau-Wert, der um 30 – 50 % niedriger als der Ausgangswert zu Beginn der Einlagerung liegt. Bei den eingesetzten Beispielen wurden jeweils Drogemuster in pulverisiertem bzw. ganzen Zustand untersucht, wobei hier, wie bei den Langzeituntersuchungen beobachtet wurde, ein starker schwankender Verlauf bei der Ganzdroge zu beobachten ist. Bei Birkenblättern und Passionsblumenkraut (Abb. 56 1, 3) kann man für die pulverisierten Drogen einen etwas schnelleren Abfall der Peakflächensummen als bei den Ganzdrogen beobachten. Die Peakflächen am Ende der Lagerzeit liegen für die Ganzdrogen deutlich höher als für die pulverisiert gelagerten Drogen. Dies kann zum einen an bereits erwähnten Unterschieden im Freisetzungsvorverhalten und Zerkleinerungsproblemen liegen, zum anderen ist eine tatsächliche geringere Stabilität der Flavonoide in pulverisiertem Drogenmaterial denkbar. Die größere Oberfläche und damit

größere Angriffsfläche gegenüber Umwelteinflüssen (hier v.a. Feuchtigkeit) sind eine mögliche Erklärung. Bei Holunderblüten (Abb. 56, 2) ist kein signifikanter Unterschied zwischen Ganz- und Pulverdroge zu erkennen; eine Aussage, welcher Zerkleinerungsgrad des Drogenmaterials der günstigere ist, ist deshalb schwer möglich.

1



2



3

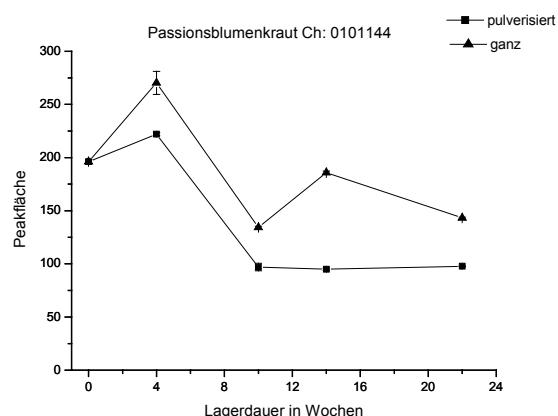


Abb. 56: Verlauf der Gesamtpeakflächen von Birkenblättern, Holunderblüten und Passionsblumenkraut Flavonoid-Stabilität während eines sechsmonatigen „accelerated testing“

Die Veränderung der Peakflächen von Einzelkomponenten in Birkenblättern, ist in Abb. 57 dargestellt. Deutlich zu sehen ist die Abnahme der Flavonoid-Glykoside (Peaks 1-8) und die Zunahme des Aglykons Quercetin. Es ist auch zu erkennen, daß alle Flavonoide von dieser Glykosidspaltung betroffen sind. Aussagen, ob bestimmte Flavonoide empfindlicher sind als andere, lassen sich mit vorliegenden Befunden nicht treffen. Dies dürfte daran liegen, daß es sich bei den Birkenblätter-Flavonoiden fast ausschließlich um Flavon-3-O-glykosid-Derivate des Quercetins handelt, die relativ ähnlich auf die angewandten Stressbedingungen reagieren.

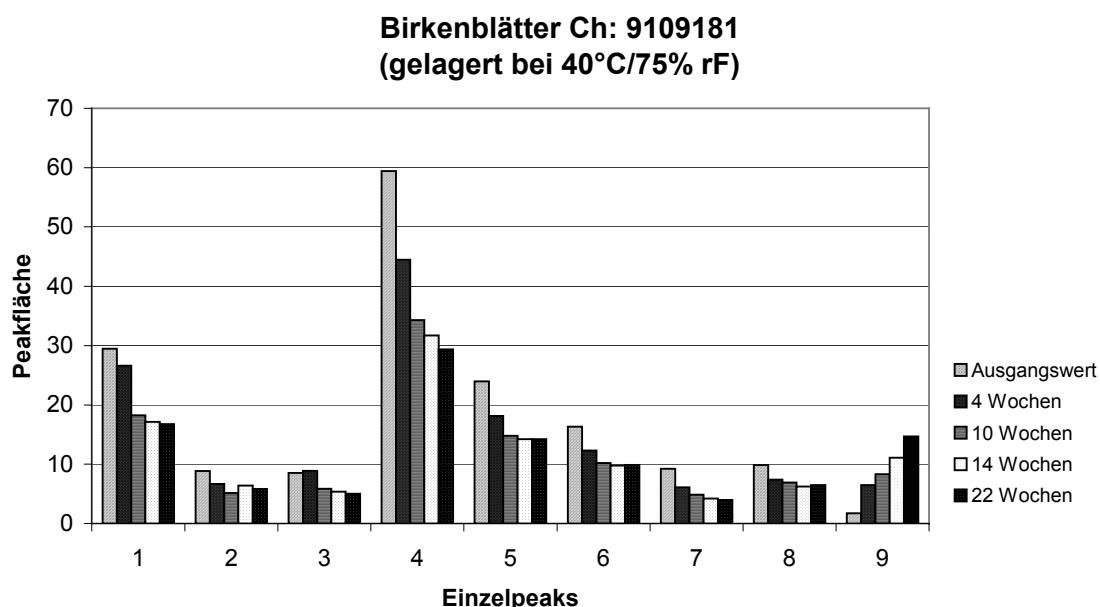


Abb. 57: Veränderungen der Peakflächen von Einzelkomponenten (Flavonoide) in Birkenblättern während der Lagerdauer

Peakzuordnung: 1,2=n. b.; 3=Myricitrin; 4=Hyperosid; 5=Isoquercitrin; 6=Avicularin; 7=n. b.; 8=Quercitrin; 9=Quercetin

Bei den in Passionsblumenkraut (Abb. 58) hauptsächlich enthaltenen C-Glykosiden ist die Abbaukinetik relativ sprunghaft, d. h. zwischen dem vierten und zehnten Monat nimmt die Peakfläche nahezu aller Flavonoide auf ca. die Hälfte ab und bleibt während der restlichen Lagerdauer auf diesem Niveau. Die abrupte Abnahme der Flavonoid-Peakflächen kommt möglicherweise dadurch zustande, daß die Meßintervalle zu lang gewählt wurden. Ein zusätzlicher Prüfzeitpunkt zwischen dem vier- bzw. zehn-Wochen Wert hätte vermutlich eine kontinuierlichere Abnahme erkennen lassen. Wie bei O-glykosidischen Verbindungen tritt auch bei den C-Glykosiden, die wesentlich stabiler sein sollten und als Reinsubstanzen nur unter oxidativen Bedingungen gespalten werden können, ein Abbau auf. Denkbar wäre, daß die Abspaltung von Zuckern zumindest zum Teil enzymatisch erfolgt und diese Enzyme unter den Bedingungen von 40°C / 75 % rF eine relativ hohe Aktivität zeigen. DUPONT et al. (2000) konnte an verschiedenen Sorten Kopfsalat zeigen, daß eine Abnahme des Flavonoidgehalts und eine Veränderung im Flavonoidmuster während Lagerung und Zubereitung durch enzymatische Prozesse verursacht wird. So führte eine Mazeration der Blätter in kaltem Wasser zu einem deutlichen Verlust an Flavonoiden, während nach Mazeration in kochendem Wasser keine Verluste gefunden wurden. Eine Inaktivierung von Enzymen in kochendem

Wasser dürfte der Grund für den nicht abnehmenden Flavonoidgehalt sein. In gelagertem Salat zeigte sich nach DUPONT et al. (2002) ebenfalls ein Abbau von Flavonoidglykosiden, wobei jedoch exakte Angaben zu Lagerbedingungen nicht gemacht werden.

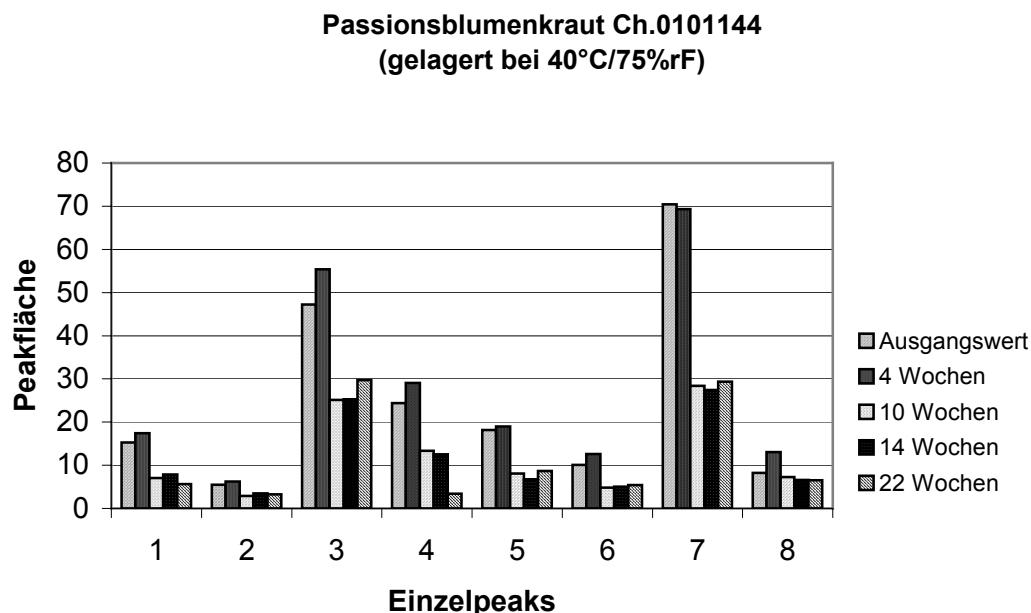


Abb. 58: Veränderungen der Peakflächen von Einzelkomponenten (Flavonoiden) in Passionsblumenkraut während der Lagerdauer

Peakzuordnung: 1,2=n.b.; 3= Schaftosid, Isoschaftosid (Koelution); 4=Isoorientin; 5=Orientin; 6= Isoviteinx-2“-O-glu; 7=Vitexin; 8= Isoviteinx; 9=n.b.

Die Gehaltswerte der untersuchten Drogenchargen - bestimmt nach der Arzneibuchmethode - zu Beginn und nach Abschluß eines „accelerated testing“ sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Die Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes wird durch die HPLC-Resultate bestätigt. Bei allen eingelagerten Mustern nahm der Flavonoidgehalt nach sechsmonatiger Lagerdauer mehr oder weniger stark ab. Der deutlichste Rückgang des Flavonoidgehaltes ist in Birkenblättern zu beobachten (> 50 %), wobei hier zwischen dem ganzen und pulverisierten Drogenmaterial kein deutlicher Unterschied besteht. Holunderblüten zeigten ebenfalls eine Gehaltsabnahme während der Lagerung; bei der Pulverdroge nahm der Gehalt signifikant stärker ab (ca. 40 %) als bei der Ganzdroge (ca. 10 %). Auch bei Passionsblumenkraut bestätigte sich eine Abnahme der enthaltenen Flavonoide, die hier bei etwa 25 % liegt.

Die gefundenen Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß als Abbaureaktionen neben Spaltung glykosidischer Bindungen vermutlich ein noch weitergehender Abbau der Aglyka stattfindet. Dies würde die Abnahme des nach der Arzneibuchmethodik bestimmten Gehaltes erklären,

bei der ohnehin die Aglyka selbst photometrisch erfaßt werden. Würden nur Glykosidspaltungen stattfinden, so sollte der Flavonoidgehalt annähernd konstant bleiben.

Droge	Flavonoidgehalt [%] vor „accelerated testing“	Flavonoidgehalt [%] nach 6 Monaten „accelerated testing“
Birkenblätter Ch. 9109181	1,87	0,84 (ga) 0,80 (pu)
Birkenblätter Ch. 9106821	1,84	0,87 (ga) 0,82 (pu)
Holunderblüten Ch. 9110584	1,63	1,53 (ga) 0,99 (pu)
Holunderblüten Ch. 9211644	2,36	2,02 (ga) 1,31 (pu)
Passionsblumenkraut Ch. 0101144	0,78	0,57 (pu)

Tab. 7: Vergleich der Gesamtflavonoidgehalte verschiedener Drogenmaterialien zu Beginn und am Ende eines „accelerated testing“

3.1.11.2 Stresstests bei erhöhten Temperaturen

Neben den unter 3.1.11.1 erläuterten Versuchen zum ICH-konformen „accelerated testing“, bei dem nachweisbare Abbaureaktionen vor allem auf den Einfluß der Luftfeuchtigkeit zurückzuführen sein dürften, wurden Drogenmuster bei relativ hohen Temperaturen (80°C / 100°C) gelagert, um ausschließlich den Einfluß des Parameters Temperatur auf das Pflanzenmaterial untersuchen zu können.

Birkenblätter, die als Ganzdroge bei 80°C und 100°C in Trockenschränken aufbewahrt wurden, zeigen temperaturabhängige Abbaureaktionen. Dabei handelt es sich ebenfalls um Spaltung glykosidischer Bindungen mit Zunahme des Aglykons Quercetin. (Abb. 59)

Die Gesamtpeakfläche (Abb. 59 A) der bei 100°C gelagerten Birkenblätter nimmt deutlich stärker ab als bei den bei 80°C gelagerten Drogenmaterialien und erreicht nach siebenmonatiger Lagerdauer einen Wert, der um ca. 60 % (100°C) im Vergleich zu 20 % (80°C) niedriger liegt als der Ausgangswert. Beim Aglykon Quercetin (Abb. 59 B) beobachtet

man das umgekehrte Verhalten, d.h. eine stärkere Zunahme von Quercetin bei einer Lagertemperatur von 100°C.

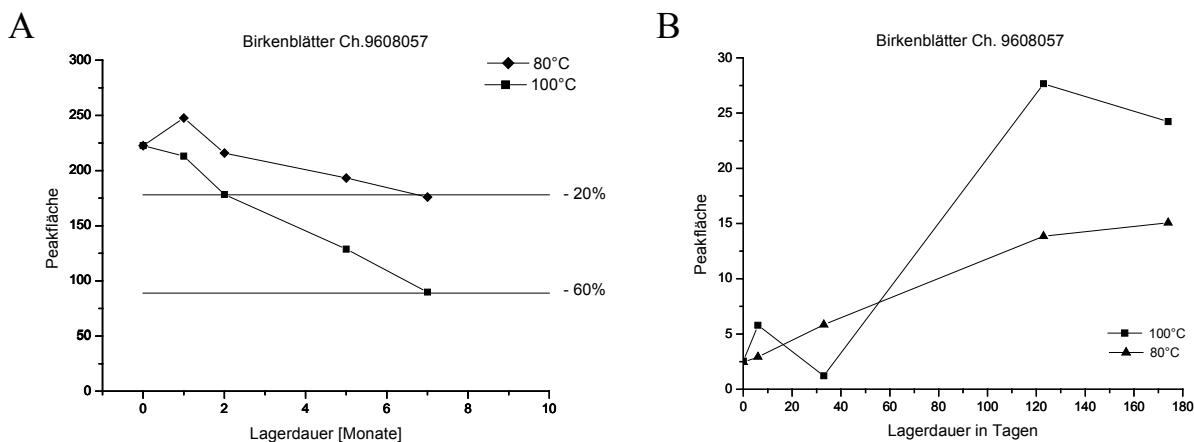


Abb. 59: Einfluß erhöhter Temperaturen auf Veränderungen des Flavonoidgehaltes gemessen als Gesamtpeakfläche (A) und die Peakfläche von Quercetin (B) in Birkenblättern

Abb. 60 zeigt die Abnahme des Flavonoidgehaltes nach sechsmonatiger Lagerung für weitere Drogen. Diese Untersuchungen zeigen, daß Flavonoide zwar hitzelabil sind, jedoch ziemlich hohe Temperaturen (80°C – 100°C) erforderlich sind, um nachweisbare Abbaureaktionen hervorzurufen.

Weiterführende Untersuchungen in mittleren Temperaturbereichen (50°C / 60°C) könnten Aufschluß über den kritischen Bereich der Flavonoidstabilität geben.

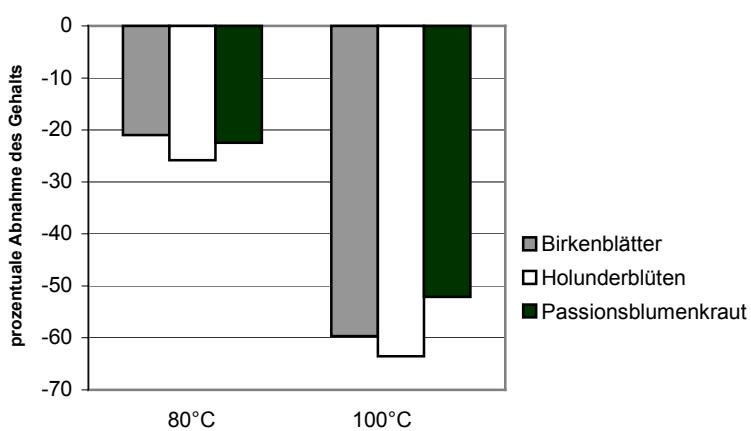


Abb. 60: Abnahme des Flavonoidgehaltes von Birkenblättern, Holunderblüten und Passionsblumenkraut nach sechs Monaten Lagerzeit bei 80°C und 100°C

3.2 Gerbstoffhaltige Drogen

3.2.1 Analytik von Polyphenolen (Gerbstoffe)

Für die quantitative Erfassung von Gerbstoffen existieren derzeit mehr oder weniger unbefriedigende Methoden. Die in der PH. EUR (2002) (2) enthaltene Hautpulvermethode ermöglicht eine Erfassung des Gesamtpolyphenolgehaltes, als Konventionalmethode ist sie jedoch relativ unspezifisch und störanfällig. In der Literatur sind eine Vielzahl analytischer Verfahren beschrieben, die eine qualitative und - wenn möglich - quantitative Bestimmung dieser relativ komplexen Substanzen ermöglichen [WATERMAN, MOLE (1994)]. Die Schwierigkeiten bei der analytischen Charakterisierung liegen in den chemischen Eigenschaften resp. dem aufgrund der zahlreichen Hydroxylgruppen recht hydrophilen Charakters des Moleküls, wobei sich ein reaktives ortho-chinoides System im B-Ring leicht ausbilden kann [vgl. ROHR (1999)]. Die Ausbildung komplexer Strukturen mit hohen Molekulargewichten erschwert die Entwicklung einer universell einsetzbaren Analytik erheblich, da v.a. bei photometrischen Bestimmungsmethoden diese einer Quantifizierung entgehen können [MUELLER-HARVEY (2001), SCHOFIELD et al. (2001)]. Des Weiteren stellt die geringe Stabilität der Verbindungen ein Problem dar. So kann bei den hydrolysierbaren Gerbstoffen in wässriger oder methanolischer Lösung v.a. bei erhöhter Temperatur relativ rasch Hydrolyse bzw. Methanolysis auftreten. Bei manchen labilen oligomeren Tanninen* wurden während der säulenchromatographischen Aufreinigungsprozesse Abbaureaktionen beobachtet [OKUDA et al. (1989)].

Eine umfassende Übersicht und Diskussion verschiedener Methoden zur Gerbstoffbestimmung ist bei ROHR (1999) und WATERMAN AND MOLE (1994) dokumentiert. Danach lassen sich die analytischen Methoden einteilen in

- Photometrische
- Gravimetrische
- Chromatographische
- Proteinpräzipitation
- Biologische Effekte

*Der im englischen Sprachgebrauch häufig gebrauchte Begriff „tannins“ wird in der Folge mit dem Begriff „Gerbstoffe“ synonym verwendet

Man sollte sich bewußt sein, daß derzeit keine optimale oder spezifische Methode zur Bestimmung von hydrolysierbaren bzw. kondensierten Gerbstoffen existiert und Meßergebnisse in unterschiedlichem Ausmaß durch Begleitstoffe beeinflußt werden können. So merkt ROHR (1999) an, daß es „in Anbetracht von heterogenen Matrixeffekten, der strukturellen Vielfalt der analysierten phenolischen Komponenten und der zahlreichen Untersuchungsansätze eher angebracht ist, von Polyphenolabschätzung anstatt von Polyphenolgehalten zu sprechen.“

In den folgenden Abschnitten werden Untersuchungen an gerbstoffhaltigen Drogen mit unterschiedlichen analytischen Methoden vorgestellt. Ziel der Arbeiten war es, eine analytische Methode zu finden, mit der mögliche Veränderungen der Gerbstoffe im Pflanzenmaterial gut erfaßt werden können. Dabei wäre eine Bestimmung durch HPLC von definierten Polyphenolen wünschenswert. Dies scheitert jedoch an fehlenden Referenzsubstanzen. Um relevante Aussagen zur Stabilität von Gerbstoffen zu treffen, sollte es ausreichend sein, Molekulargewichtsveränderungen d.h. möglicherweise auftretende Polymerisationsreaktionen zu dokumentieren. An ausgewählten Beispielen sollen Möglichkeiten und Grenzen verschiedener Methoden für Stabilitätsuntersuchungen diskutiert werden. In der Praxis häufig verwendete Drogen wurden in die Untersuchungen einbezogen:

Droge	Monographie	Mindestgehalt an Gerbstoffen*
Eichenrinde (<i>Quercus cortex</i>)	Ph. Eur. 2002	3 %
Gänsefingerkraut (<i>Anserinae herba</i>)	DAC 1998	2 %
Hamamelisblätter (<i>Hamamelidis folium</i>)	Ph. Eur. 2002	3 %
Hamamelisrinde (<i>Hamamelidis cortex</i>)	DAC 1998	4 %
Odermennigkraut (<i>Agrimoniae herba</i>)	Ph. Eur. 2002	2 %
Ratanhiawurzel (<i>Ratanhiae radix</i>)	Ph. Eur. 2002	5 %

* Wertangaben entsprechend den Monographie-Angaben

Tomentillwurzelstock (<i>Tomentillae rhizoma</i>)	Ph. Eur. 2002	7 %
Walnußblätter (<i>Juglandis folium</i>)	DAC 1986	6 %

Tab. 8: Auflistung der gerbstoffhaltigen Drogen

3.2.2 Photometrische Methoden (Konventionalmethoden)

3.2.2.1 Hautpulvermethode

Bei der in PH. EUR. 2002 enthaltenen Methode zur Gerbstoffbestimmung wird eine photometrische Bestimmung (Reduktion von Folins Reagenz (Wolfram-Molybdän-Phosphorsäure) zu Polywolframaten (Wolframblau)) mit einer Bindung an Hautpulver-Proteine kombiniert.

Um die Probleme dieser Methode aufzuzeigen, soll die Vorgehensweise skizziert werden:

- Nach der Heißwasserextraktion erfolgt die Bestimmung der Gesamtpolyphenole durch Reduktion von Wolfram-Molybdän-Phosphorsäure (Folins Reagenz) zu blauen Polywolframaten
- Nach der Behandlung mit Hautpulver (Adsorption der Gerbstoffe) wird die Bestimmung der nicht gebundenen Phenole (Flavonoide, Polyhydroxysäuren) mit Folins Reagenz durchgeführt
- Die eigentlichen Gerbstoffpolyphenole ergeben sich aus der Differenz der beiden Bestimmungen
- Pyrogallol dient als Referenzsubstanz, auf die die Färbung bezogen wird

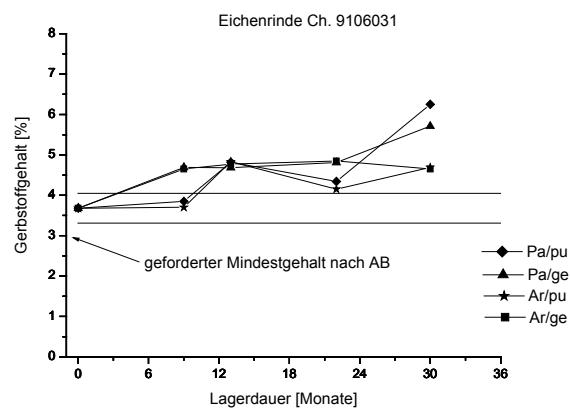
Diese Methode ist in PH. EUR., DAB und DAC als Gehaltsbestimmung für gerbstoffhaltige Drogen vorgesehen. Im Kommentar zur Ph. Eur. [WICHTL (2001)] und von GLASL (1983) und APPEL (2001) werden folgende Probleme diskutiert:

- es liegt eine Konventionalmethode vor, mit der keine absolut richtigen, jedoch reproduzierbare Werte erhalten werden.

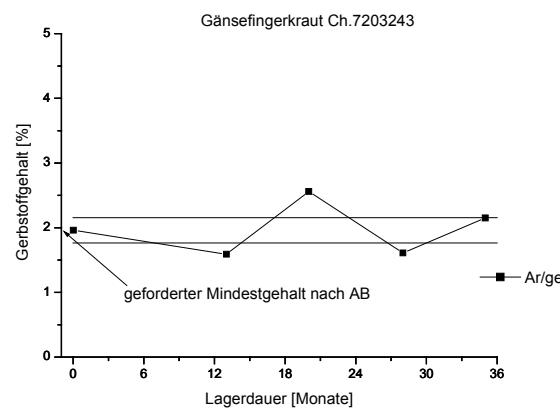
- mit dem verwendeten Reagenz werden neben Gerbstoffen auch andere Phenole wie Flavonole oder Polyhydroxycarbonsäuren erfaßt
- der gebildete Farbstoff ist nicht stabil; ein genaues Einhalten von Reaktionszeiten ist erforderlich
- der verwendete Standard Pyrogallol ist in Lösung licht- und oxidationsempfindlich

In den folgenden Diagrammen (Abb. 61, 1-14) sind die nach der Hautpulvermethode ermittelten Polyphenolgehalte für verschiedene Drogen resp. Chargen dargestellt. Die Gehaltswerte für Proben mit unterschiedlichem Schnittgrad und Verpackungsmaterial sind jeweils innerhalb eines Diagramms enthalten. Die eingezeichneten Parallelen zur Abszisse geben den $\pm 10\%$ Toleranzbereich an, den der Gerbstoffgehalt das Drogenmaterials während der Verwendungsdauer nicht überschreiten sollte. Der geforderte Mindestgehalt der aktuellen Arzneibuchmonographien ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

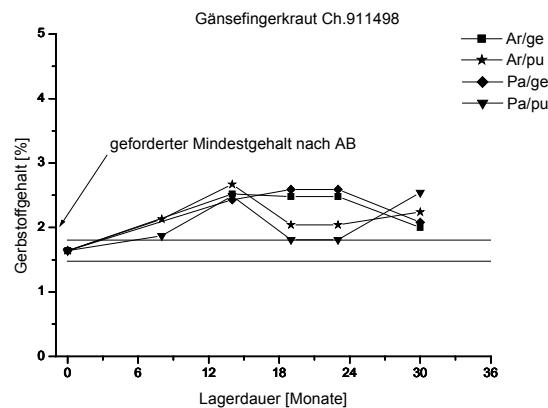
1



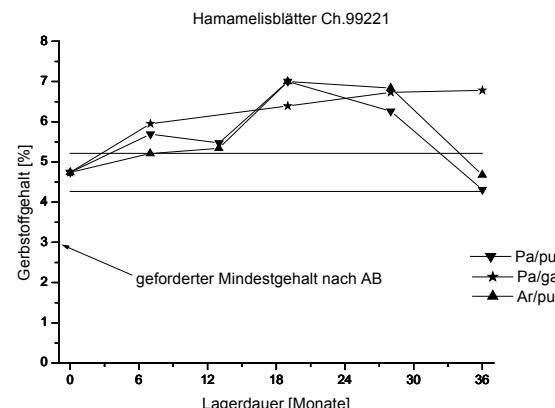
2



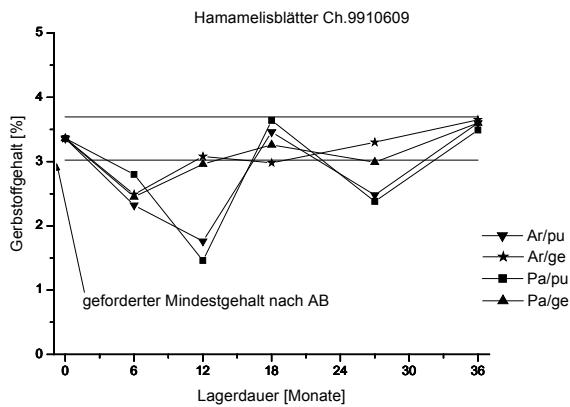
3



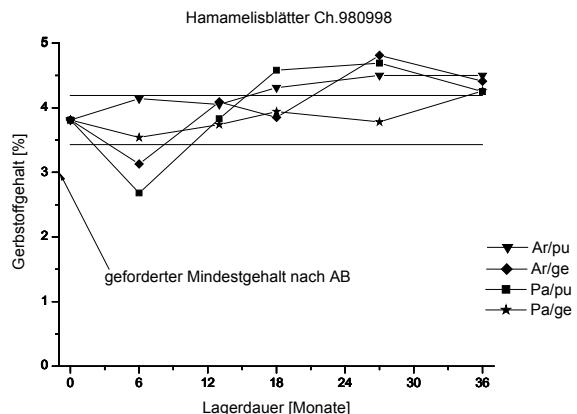
4



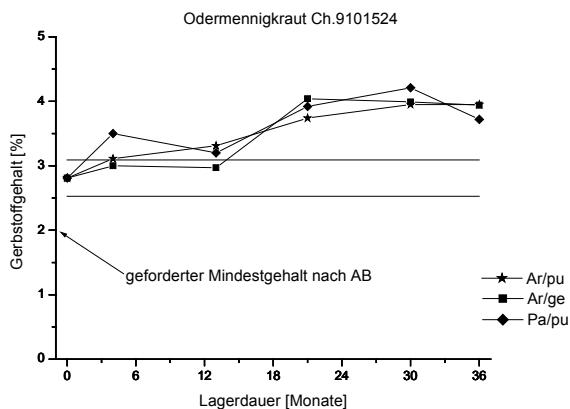
5



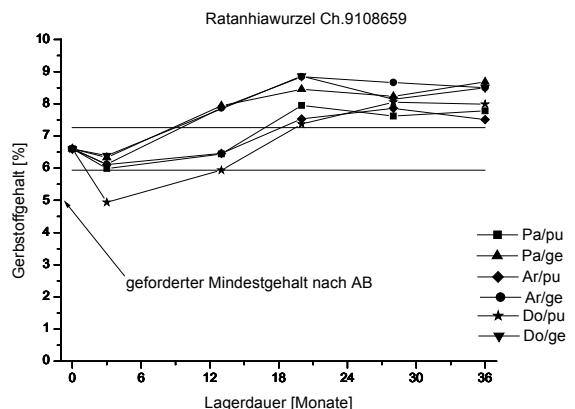
6



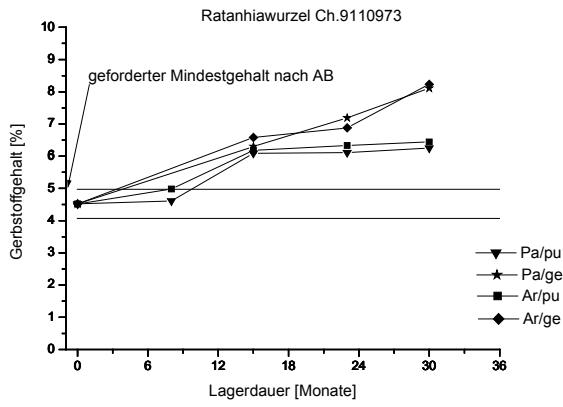
7



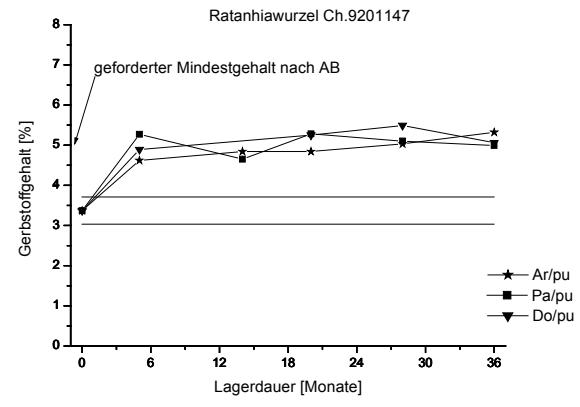
8



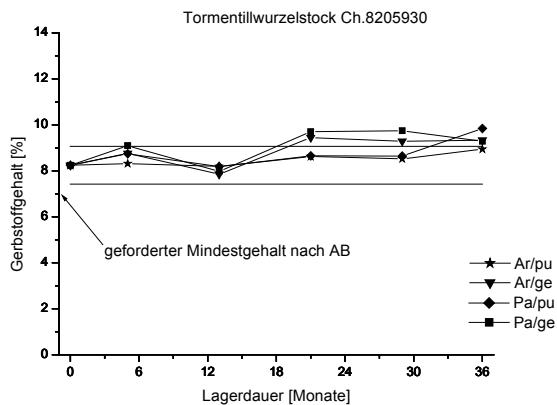
9



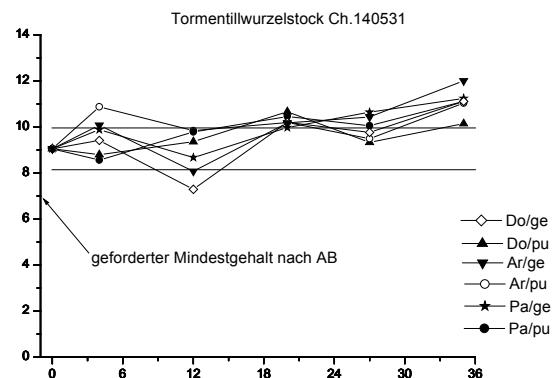
10



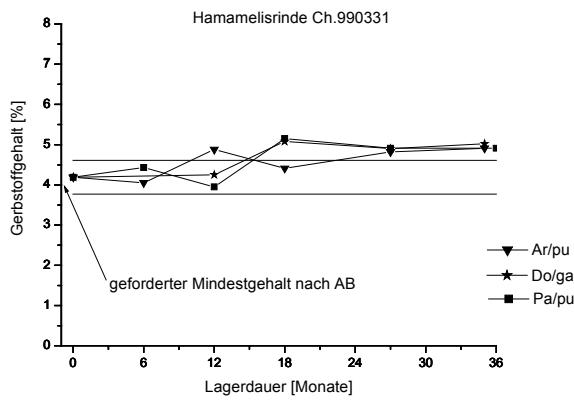
11



12



13



14

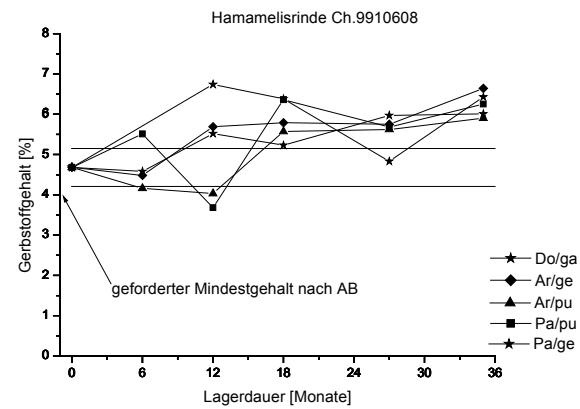


Abb. 61 (1-14): Veränderungen des Polyphenolgehaltes (Bestimmung durch Hautpulvermethode) von verschiedenen Gerbstoffdrogen während der Lagerung

Die dargestellten Diagramme lassen sich wie folgt interpretieren:

Die untersuchten Proben wurden unter den Bedingungen des „long term testing“ in einem klimatisierten Raum bei 25°C und 60 % rF gelagert. Auffallend ist, daß bei allen untersuchten Drogen die Gesamt-Polyphenol Gehaltswerte zu den einzelnen Prüfzeitpunkten relativ stark schwanken, und zum Teil weit außerhalb des Intervalls von $\pm 10\%$ um den Ausgangswert liegen. Desweiteren ist zu beobachten, daß die nach dieser Methode bestimmbaren Gerbstoffgehalte nach etwa dreijähriger Lagerdauer bei einem Großteil der Proben um mehr als 10 % zugenommen haben. Diese Zunahme könnte einerseits damit erklärt werden, daß im Lauf der Zeit Gerbstoffe in der Pflanzenmatrix (Zellwände, verholzte Strukturen, Fasern u. ä.) weniger stark gebunden sind und damit besser extrahiert und quantifiziert werden können. Andererseits sind auch Veränderungen der komplexen, heterogenen Gerbstoffmoleküle denkbar, deren Um- oder Abbauprodukte ebenfalls mit Folins Reagenz reagieren können. Um

beurteilen zu können, ob die Gehaltszunahmen nur bei den eingelagerten Mustern auftreten und somit von den Faktoren Temperatur und Luftfeuchte abhängen oder generell bei alternden Gerbstoffdrogen auftreten, wurden die Endwerte nach ca. 36 Monaten mit denen der Rückstellmuster verglichen, die in einem dunklen Raum von ca. 18°C aufbewahrt wurden. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 dargestellt. Daraus geht hervor, daß der Gerbstoffgehalt bei kontrolliert gelagerten Drogen sowie bei Rückstellmustern gleichermaßen zugenommen hat. Die erhaltenen Werte liegen vielfach um mehr als 20% über den Ausgangswerten. Dies läßt den Schluß zu, daß die beobachtete Gehaltszunahme primär nicht durch besondere Lagerbedingungen bedingt sein dürfte.

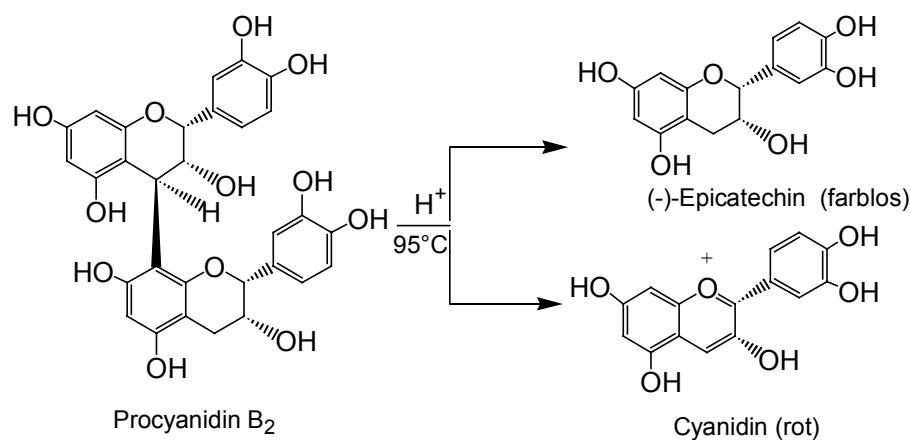
Droge	Ausgangswert		<i>Gerbstoffgehalt [%] A: Lagerung bei 25°C / B: Rückstellmuster 60% rF</i>	
Eichenrinde	3,68	5,5	4,31	
Ch. 9106031				
Gänsefingerkraut	1,96	2,15	2,16	
Ch. 7203243				
Gänsefingerkraut	1,64	2,30	2,38	
Ch. 9111498				
Hamamelisblätter	4,74	5,60	6,58	
Ch. 99221				
Hamamelisblätter	3,81	4,30	4,24	
Ch. 980998				
Hamamelisblätter	3,36	3,55	3,24	
Ch. 9910609				
Hamamelisblätter	1,59	2,51	2,42	
Ch. „Salus“				
Hamamelisrinde	4,68	6,30	5,02	
Ch. 9910608				
Hamamelisrinde	4,19	4,91	4,79	
Ch. 990331				
Odermennigkraut	2,81	3,88	3,49	
Ch. 9101524				
Ratanhiawurzel	4,52	7,20	6,55	

Ch. 9110973			
Ratanhiawurzel	3,37	5,15	5,27
Ch. 9201147			
Ratanhiawurzel	6,60	8,10	8,09
Ch. 9108659			
Tormentillwurzel	8,24	9,40	8,66
Ch. 8205930			
Tormentillwurzel	9,05	11,40	11,69
Ch. 140531			

Tab. 9: Vergleich von Rückstellmustern (B) und gelagerten Drogen (A) nach 36-monatiger Lagerdauer

3.2.2.2 Butanol-HCl-Methode (*Proanthocyanidin-Bestimmung*)

Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf einer säurekatalysierten, C-C Bindungen zwischen Catechin- bzw. Epicatechinmolekülen spaltenden Methode. Es entstehen rot gefärbte Cyanidine, die bei 550 nm photometrisch vermessen werden können.

Abb. 62: Säurekatalysierte Spaltung von kondensierten Gerbstoffen am Beispiel von Procyandin B₂

In Butanol / HCl kommt es zur Spaltung der säurelabilen C4-C8 Bindung, woraus zunächst Epicatechin und ein 3-Flaven-3-ol entsteht. In Anwesenheit von Luftsauerstoff bildet sich unter Abgabe eines Hydrid-Ions ein farbiges Anthocyanidin (Cyanidin) [STEINEGGER et al. (1999 F)].

Um abzuschätzen, ob nach der Hautpulvermethode hergestellte Drogenextrakte direkt mit dieser Methode analysierbar sind, d.h. für die angewandte Methode brauchbare Extrakt-

konzentrationen besitzen, wurden die jeweiligen Extrakte direkt (entspricht dem 500 μ l Wert) oder nach Verdünnen mit Wasser (100 – 400 μ l ad 500 μ l) eingesetzt (Abb. 63). Bei dieser Methode werden 500 μ l Extrakt mit BuOH / HCl-Reagenz versetzt und die sich nach Erhitzen bildende Rotfärbung photometrisch vermessen (s. Abschnitt 5.2.3.5). Bei den Beispielen in Abb. 63 zeigt sich eine weitgehend linear Beziehung zwischen der Menge des eingesetzten Extraktes (in μ l) und der gemessenen Extinktion. Unter der Voraussetzung, daß die Extinktion dem Gehalt an kondensierten Gerbstoffen proportional ist, wird ein deutlicher Unterschied in der Menge der nachgewiesenen Procyanidine in Eichenrinde und Hamamelisblättern sichtbar. Dieser Befund deckt sich mit Literaturangaben [RIMPLER (1999 C)], wonach in Eichenrinde ein relativ hoher Anteil an kondensierten Polyphenolen vorhanden ist, während Hamamelisblätter eher reich an hydrolysierbaren Gerbstoffen sind. Die Rotfärbung wird durch entstehende Anthocyan-Verbindungen hervorgerufen, wobei je nach Konfiguration der gespaltenen Catechineinheiten Anthocyanidine mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima entstehen.

Der Assay ist relativ einfach und schnell durchzuführen, jedoch sollte man sich der im folgenden diskutierten Schwachpunkte bewußt sein. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob damit mögliche Veränderungen im Polymerisationsgrad von kondensierten Gerbstoffen nachweisbar sind.

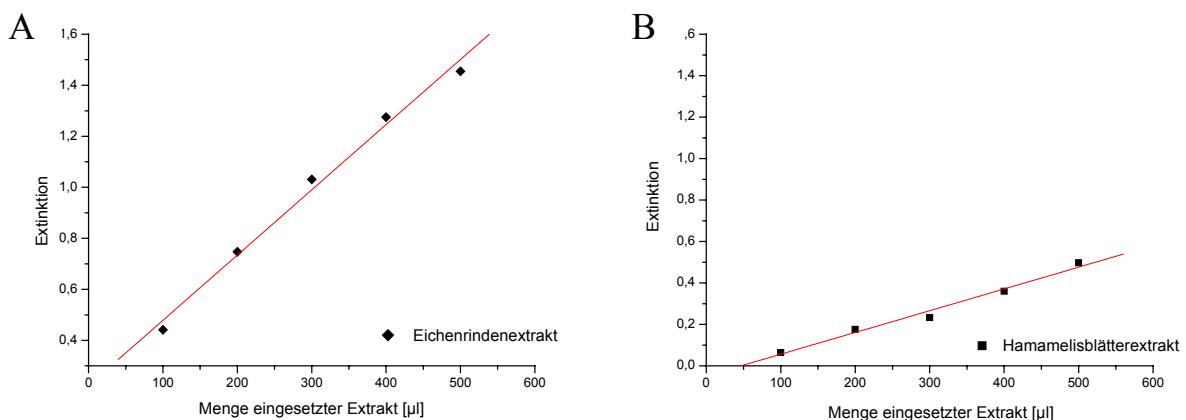


Abb. 63: Evaluation des Linearitätsbereiches für die BuOH / HCl -Methode von Eichenrinden- (A) und Hamamelisblätterextrakt (B)

Durch diese Bestimmungsmethode werden spezifisch kondensierte Gerbstoffe erfaßt. Sie ist auch dazu geeignet, um den Gehalt an unlöslichen Gerbstoffen in extrahierten Pflanzenrückständen abzuschätzen.

Von SCHOFIELD (2001) und WATERMAN (1994) werden die Schwachpunkte und Grenzen dieser Methode diskutiert. So zeigen verschiedene Substituenten an Ring A und B Auswirkungen auf das Absorptionsmaximum der entstehenden Anthocyanidine [HEMINGWAY et al. (1989)]. Der Einfluß verschiedener Reaktionsbedingungen wie die Reaktionsdauer und Temperatur, Verhältnis von Reagenz zu Probe und Wassergehalt der Probe werden unterschiedlich beurteilt [PORTER et al. (1986)]. Aufgrund der Heterogenität der kondensierten Gerbstoffe ist auch die Festlegung auf einen geeigneten Standard problematisch [SCHOFIELD et al. (2001)]. Gerbstoffpolymere werden nicht quantitativ in Monomere gespalten, sondern bevorzugt in di- oder trimere Procyandine, so daß die Farbstoffbildung unterschiedlich verläuft [ROHR (1999)].

Trotz der genannten Schwächen wird der BuOH / HCl-assay wegen seiner Spezifität für kondensierte Procyandine in der Praxis, jedoch nicht in den Arzneibüchern, häufig eingesetzt. Für exakte quantitative Bestimmungen und somit auch für Stabilitätsprüfungen scheint er jedoch nicht geeignet zu sein, da die Reproduzierbarkeit von vielen Faktoren, die nicht immer standardisiert werden können, beeinflußt wird.

3.2.2.3 Vanillin-Methode

Das Prinzip der Vanillin-Methode beruht auf der Fähigkeit der Aldehydgruppe des Vanillins in saurem Milieu mit kondensierten Gerbstoffen zu gefärbten Verbindungen zu reagieren (Abb. 64). Bevorzugte Bindungsstelle von Vanillin am Catechinmolekül ist dabei die Position C 6.

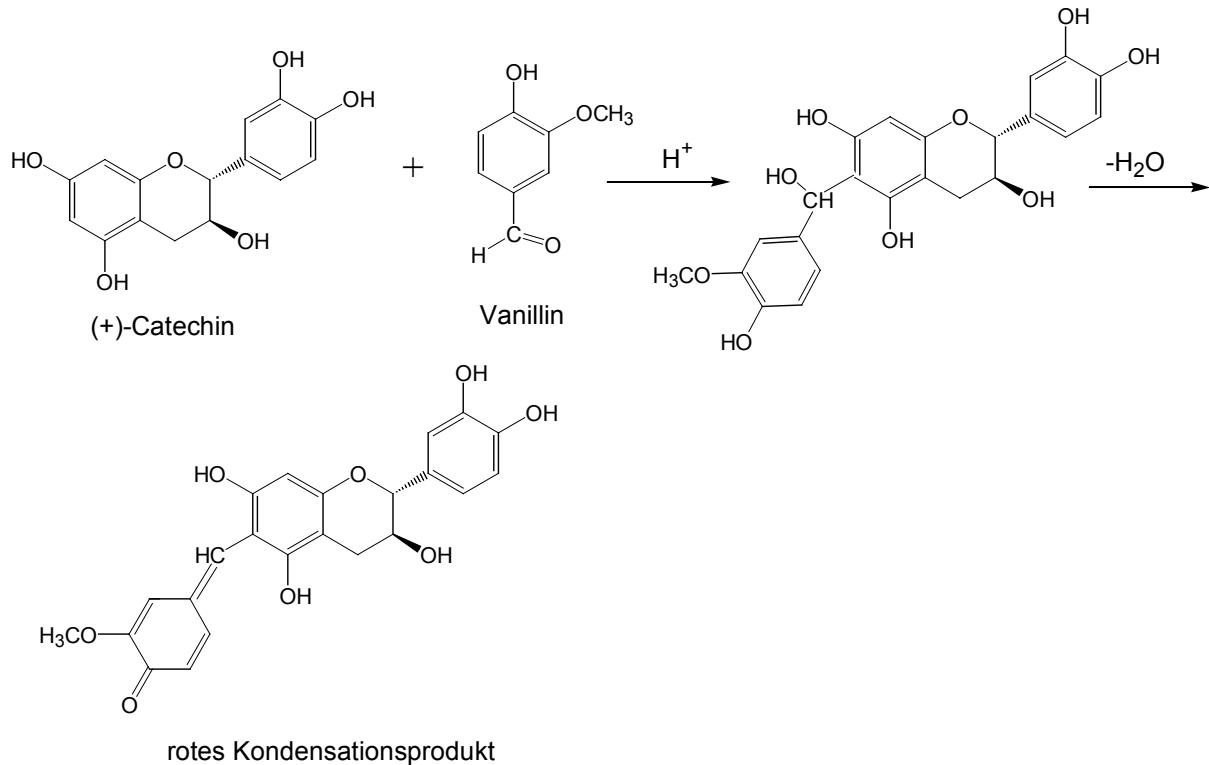


Abb. 64: Reaktion von Catechin mit Vanillin / HCl zu gefärbten Verbindungen [SCHOFIELD et al (2001)]

In Abb. 65 sind unterschiedliche Konzentrationen an Catechin gegen die Absorption aufgetragen. Damit soll überprüft werden, welcher Zusammenhang zwischen steigenden Konzentrationen des Analyten und der resultierenden Extinktion besteht. Bis zu einer Extinktion von ca. 0.8, was einer Catechinkonzentration von ca. 35 µg/ml entspricht, besteht ein linearer Zusammenhang. Bei höheren Catechinkonzentrationen sinken die Kurven etwas ab. Ein linearer Zusammenhang scheint oberhalb einer Catechinkonzentration von 35 µg/ml nicht mehr gegeben zu sein. Bei der Vanillin-Methode werden neben Catechin auch höhermolekulare Procyanidine (dimere, trimere, usw.) erfaßt, die sich in ihren Extinktionskoeffizienten unterscheiden. Da isolierte oligomere Procyanidine nicht zur Verfügung standen, können keine Angaben zu deren Extinktionskoeffizienten gemacht werden [vgl. LANG (1996)].

Catechin wird in der Regel als Standard benutzt und gibt die höchsten Absorptionswerte. Größere Moleküle reagieren schlechter und werden mit dieser Methode nicht quantitativ erfaßt [SUN et al. (1998)]. Aus diesen Gründen wurde auf eine Umrechnung der ermittelten Extinktionswerte in Catechin [$\mu\text{g}/\text{ml}$] verzichtet und direkt die Extinktionen angegeben.

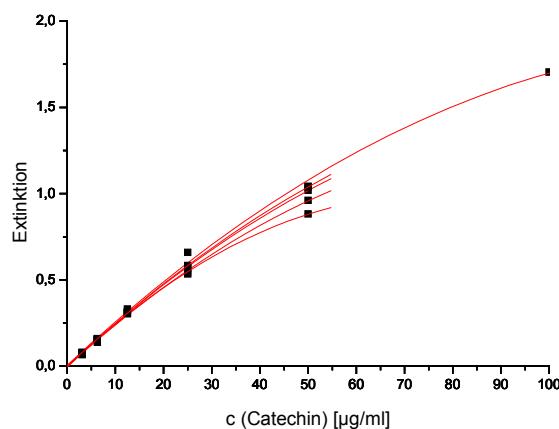


Abb. 65: Evaluation des Linearitätsbereiches von Catechin mit der Vanillin-Methode (Catechin-Stammlösungen wurden vermessen)

Ein Ziel der Gerbstoffbestimmung war die Validität der Methoden daraufhin zu untersuchen, ob diese hinreichend empfindlich und geeignet sind, um mögliche Instabilitäten der wertgebenden Drogeninhaltsstoffe zu dokumentieren. Dazu wurde Drogenmaterial bei 70°C in Trockenschränken vier Wochen gelagert. Die Resultate wurden mit den Analysenergebnissen des entsprechenden Drogenmaterials verglichen, das bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde (Abb. 66). Es wird deutlich, daß nach Lagerung bei erhöhter Temperatur weniger (< 50 %) kondensierte Gerbstoffe nachweisbar sind. Eine Erklärung dafür ist zum einen, daß Monomere (Catechin, Epicatechin) bzw. Oligomere zu höhermolekularen Molekülverbänden polymerisieren und diese mit der Vanillin-Methode eine reduzierte Farbreaktion zeigen. Zum anderen wäre denkbar, daß ein Teil der Catechine und Procyanidine zu Verbindungen abgebaut wurden, die nicht mit Vanillin reagieren. Die nach der Methode der Ph. Eur. (2002) (2) hergestellten wäßrigen Gerbstoffextrakte wurden nochmals bei 70°C bzw. Raumtemperatur aufbewahrt und an den Tagen zwei und drei mit der Vanillinmethode analysiert. Dabei verringerten sich die Extinktionswerte der bei 70°C aufbewahrten Proben, während eine Abnahme bei den bei Raumtemperatur gelagerten Extrakten nicht zu erkennen war.

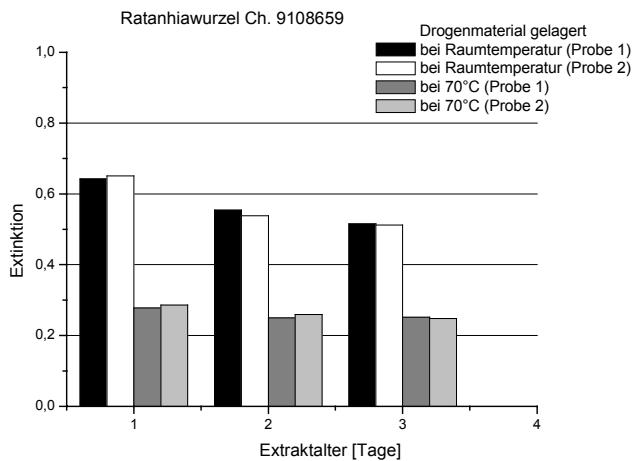


Abb. 66: Einfluß erhöhter Temperatur (70°C) auf die in Ratanhiawurzel enthaltenen Procyanoiline

In den Abb. 67 und Abb. 68 sind Veränderungen verschiedener Extrakt-Chargen dargestellt, die bei 20°C, 50°C und 70°C gelagert wurden.

Nach Extrakterstellung wurde der Anteil an kondensierten Gerbstoffen an Tag 0 bestimmt. Danach wurden die Extrakte bei den entsprechenden Temperaturen gelagert. Bei den Extrakten, die erhöhte Temperatur ausgesetzt waren, ist bereits nach 24 h eine deutliche Abnahme der Procyanoiline sichtbar, die sich nach 2-3 Tagen weiter fortsetzt.

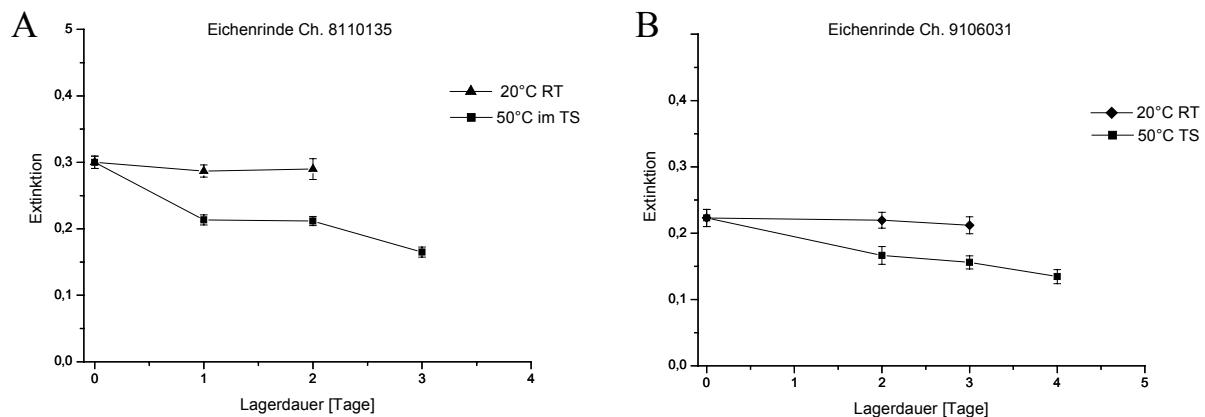


Abb. 67: Einfluß erhöhter Temperatur (50°C) auf die in zwei unterschiedlichen Chargen (A u. B) Eichenrindenextrakt enthaltenen Procyanoiline

Extrakte von Walnußblättern (Abb. 68 B) wurden zusätzlich bei 70°C gelagert. Im Vergleich zu einer Temperatur von 20°C bzw. 50°C ergab sich ein noch stärkerer Abfall der Absorptionswerte während des untersuchten Zeitraumes von 3 Tagen.

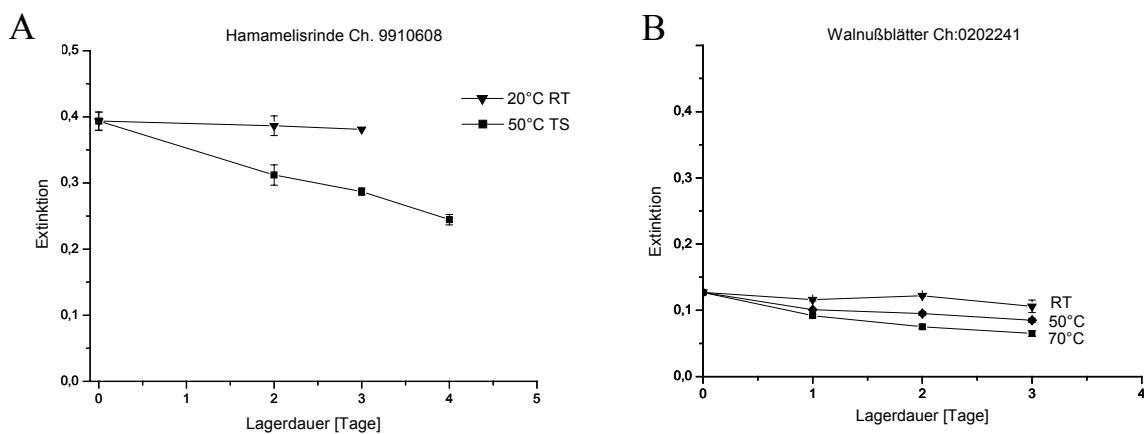


Abb. 68: Einfluß erhöhter Temperaturen (50°C, 70°C) auf die in Hamamelisrinden (A)- und Walnußblätterextrakt (B) enthaltenen Procyanidine

Vergleicht man die Hautpulvermethode mit der Vanillin-Methode, wird deutlich, daß mit dem Vanillin-assay Veränderungen in der Gerbstoffzusammensetzung empfindlicher nachgewiesen werden können. Um dies zu belegen, wurden Eichenrinde bzw. Tormentillwurzel in einem Trockenschrank bei 70°C gelagert und nach 4, 12 und 16 Monaten Extrakte daraus vergleichend im Vanillin-assay bzw. mit der arzneibuchkonformen Hautpulvermethode untersucht. Für Eichenrinde (Abb. 69) ergab sich sowohl für die ganze als auch die pulverisierte Droge eine stetige Abnahme der Extinktionswerte nach der Vanillin-Methode. Der Gerbstoffgehalt (B) blieb nach einer anfänglichen Abnahme während der übrigen Lagerzeit annähernd konstant.

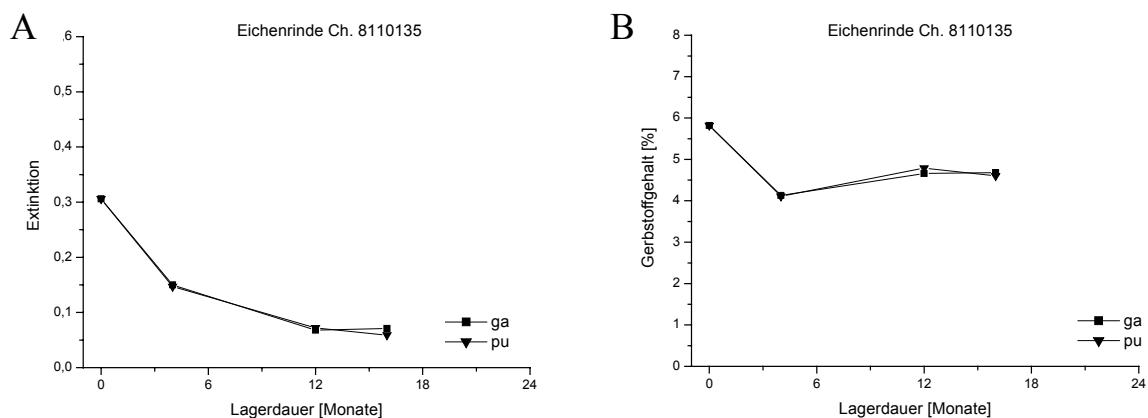


Abb. 69: Veränderung der Extinktion im Vanillin-assay (A) bzw. des Gerbstoffgehalts (B) von Eichenrindenextrakt nach Lagerung bei 70°C

Bei den Gerbstoffen der Tormentillwurzel konnten ähnliche Veränderungen festgestellt werden (Abb. 70). Die Extinktionswerte im Vanillin-assay (A) lagen nach einer Lagerdauer von 16 Monaten bei nur noch 20 % des Ausgangswertes, wobei die Werte für die pulverisierte Droge niedriger lagen als für die Ganzdroge. Bei der Analytik nach Arzneibuch (B) fielen Veränderungen weniger deutlich aus; der Gerbstoffgehalt der Ganzdroge blieb während ca. 18 Monaten bei ca. 12 %. Bei der pulverisierten Droge blieben die Werte nach einer anfänglichen Abnahme konstant.

Dieses Beispiel macht deutlich, wie unterschiedlich die Angaben verschiedener analytischer Methoden zu bewerten sind. Während es scheinbar im Bereich der kondensierten Gerbstoffe zu Veränderungen kommt, können diese im Vanillin-assay empfindlich genug nachgewiesen werden. Nach den Resultaten der Hautpulvermethode würde man nicht von signifikanten qualitativen und quantitativen Veränderungen der Gerbstoffe im Drogenmaterial ausgehen.

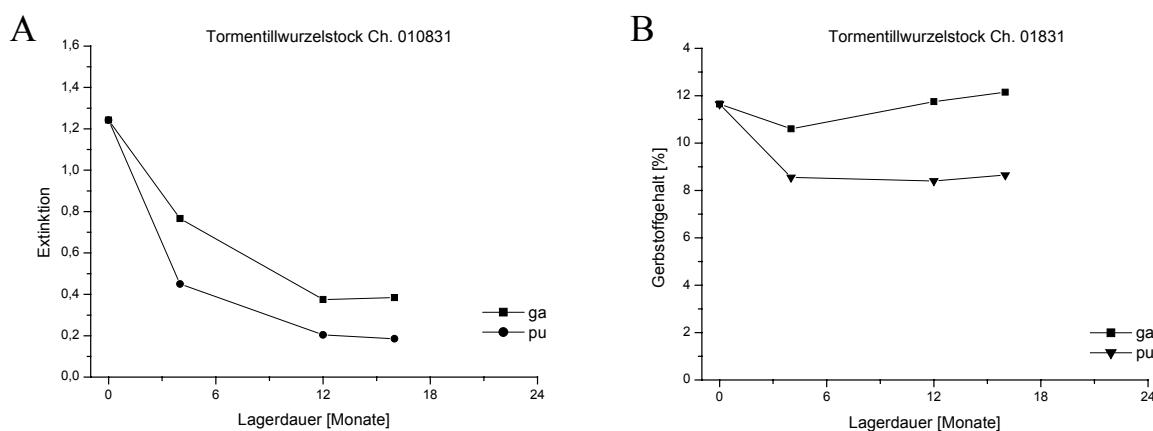


Abb. 70: Veränderung der Extinktion im Vanillin-assay (A) bzw. des Gerbstoffgehalts (B) von Tormentilla-wurzel-extrakt nach Lagerung bei 70°C

Die Vanillin-Methode scheint empfindlich genug zu sein, um Veränderungen von Gerbstoffen in gelagerten Extrakten zu erfassen. Doch auch diese Methodik ist mit einer Reihe von Problemen verbunden, auf die in der Literatur hingewiesen wird [SUN et al. (1998)]. Man sollte sich der beschränkten Aussagekraft der damit erhaltenen Ergebnisse bewußt sein und diese entsprechend interpretieren.

Die Schwachpunkte der Methode sind ähnlicher Art wie für die BuOH / HCl-Methode beschrieben und liegen u. a. in der Komplexizität und chemischen Verschiedenartigkeit der Gerbstoffstrukturen begründet. Die Art der verwendeten Säure und der prozentuale Wasseranteil üben entscheidenden Einfluß auf die Intensität der Farbstoffbildung und damit

auf den Absorptionskoeffizienten aus. Die Verwendung von Schwefelsäure und ein möglichst geringer Wasseranteil führen nach SUN et al. (1998) zu höheren Absorptionswerten. BUTLER et al. (1982) sieht in Eisessig statt Methanol ein optimales Reaktionsmedium, mit dem höhere Extinktionen erhalten werden und mit dem eine Reaktion nur an den Endgruppen von Procyanidinen erfolgen soll. Die Reaktionstemperatur und Reaktionszeit dagegen haben wenig Einfluß auf den Reaktionsablauf, so daß von SUN et al. (1998) Raumtemperatur und eine Reaktionsdauer von 15 min. empfohlen werden.

Die schnelle und einfache Durchführbarkeit dieser Methode, ihre Spezifität für eine relativ kleine Gruppe an phenolischen Verbindungen (Flavan-3-ol-Mono-und Polymere) macht sie zu einem für qualitative bzw. quantitative Nachweisreaktionen häufig verwendeten, analytischen Verfahren.

LANG (1996) vergleicht am Beispiel von *Ginkgo biloba* die bisher beschriebenen photometrischen Methoden, mit dem Ergebnis, daß nach der Vanillin bzw. BuOH / HCl-Methode die absoluten Gerbstoff-Gehaltswerte deutlich niedriger liegen als die entsprechenden Hautpulvermethode-Werte. Dies wird mit störenden Einflüssen anderer Phenole (z.B. Flavonoide) auf Folins Reagenz erklärt. Den spezifischeren Methoden Vanillin und BuOH / HCl sollte nach LANG (1996) der Vorzug gegeben werden.

3.2.3 Fällungsreaktionen

3.2.3.1 Proteinfällungen

Aufgrund ihrer chemischen Struktur sind Gerbstoffe in der Lage, mit Proteinen Wechselwirkungen einzugehen. Dies kann über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen (reversibel) oder über kovalente Bindungen erfolgen (irreversibel) [WAGNER (1999 C), HAGERMANN et al. (1998)]. Auf diesen Wechselwirkungen von Proteinen mit Gerbstoffen beruhen die Hauptanwendungsgebiete als Antidiarrhoikum und Adstringens [SCHOLZ (1989)]. Die adstringierenden Eigenschaften von Gerbstoffextrakten [PORTER et al. (1984)] mit vorwiegend kondensierten Verbindungen sind bei einem Polymerisationsgrad von $n = 5 - 12$ Catechineinheiten besonders ausgeprägt und fehlen bei den Monomeren bzw. Polymeren völlig [WATERMAN et al. (1994 B)]. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, mit entsprechenden Methoden die Proteinfällungseigenschaften von Gerbstoffextrakten [DAWRA et al. (1988), CALDERON et al. (1968)] und mögliche qualitative und quantitative Veränderungen von diesen während der Lagerung des entsprechenden Drogenmaterials zu untersuchen.

Als Möglichkeit dazu bieten sich Proteinfällungsreaktionen an [ASQUIT et al. (1985)].

Prinzip: [WATERMAN, MOLE (1994 C)]

- Es wird eine BSA-Lösung hergestellt, die mit Remazolblau angefärbt wird
- Um Proteine in einem definierten Molmassenbereich zu erhalten, wird die Lösung dialysiert
- Die erhaltene BSA-Lösung wird durch Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Lowry) standardisiert
- Es erfolgt die eigentliche Präzipitationsreaktion zwischen angefärbtem BSA und gerbstoffhaltigem Pflanzenextrakt
- Der gefällte Protein-Pellet wird mittels SDS aufgelöst und anschließend die Extinktion der blau gefärbten Lösung photometrisch bestimmt

Die Methode erlaubt es, die ausgefällte Menge an Protein (BSA) photometrisch zu bestimmen und dabei Rückschlüsse auf die Interaktionsfähigkeit der Gerbstoffe mit Proteinen zu ziehen. Abb. 71 gibt für verschiedene Drogenextrakte deren BSA-Fällungsvermögen an. Als Ordinate

sind die Extinktionen der aufgelösten, blau gefärbten Protein-Pellets aufgetragen, die proportional zur gefällten Proteinmenge sind. Drogen mit relativ hohen Gerbstoffgehalten wie Eichenrinde, Ratanhiawurzel und Tormentillwurzelstock zeigen erwartungsgemäß höhere Werte verglichen mit Drogen die einen niedrigen Gerbstoffgehalt aufweisen (z. B. Walnußblätter). Hamamelisblätter, die vorwiegend hydroly-sierbare Gerbstoffe enthalten und bei anderen Methoden (Vanillin, Hautpulvermethode) verhältnismäßig niedrige Gehaltswerte ergeben, zeigen hier ähnliche Proteinfällungseigenschaften wie Ratanhiawurzel. Die Standardabweichungen ($n = 4$) der Methode sind bei einigen der untersuchten Drogenextrakte relativ groß. Durch weitere Optimierung bzw. Validierung der Methode sollten sich die Schwankungsbreiten verringern lassen.

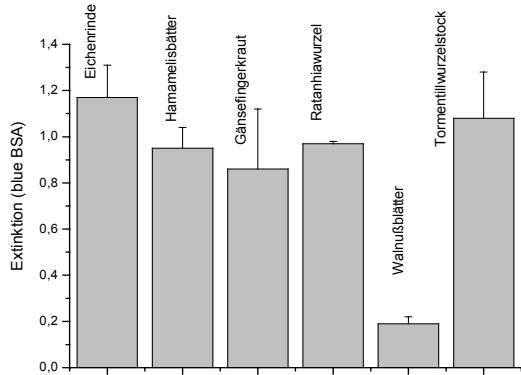


Abb. 71: Vergleich der Proteinfällungseigenschaften verschiedener Gerbstoffdrogen

In Abb. 72 (A-C) sind für Hamamelisblätter, Ratanhiawurzel und Tormentillwurzelstock die Ergebnisse der Fällungsreaktionen für die im Trockenschrank bei 70°C gelagerte Drogen (Lagerdauer vier Wochen) im Vergleich zu Rückstellmustern dargestellt. Aufgetragen sind Verdünnungsreihen (400-1000 µl) wässriger Gerbstoffextrakte gegen die gefällte Menge an BSA. Für die Präzipitationsmethode war der Einsatz von höher konzentrierten Extrakten erforderlich, da sich mit den nach Ph. Eur. hergestellten Extrakten keine ausreichenden Fällungen ergaben. (s. 5.2.3.4). Es zeigt sich bei allen drei Drogen eine weitgehend lineare Konzentrations-Proteinfällungs-Beziehung. Bei Tormentillwurzelstock und Ratanhiawurzel wird durch die jeweiligen wässrigen Extrakte aus Rückstellmustern signifikant mehr BSA gefällt als durch die im Trockenschrank gelagerten Proben. Für Hamamelisblätter (Abb. 72 C), deren Extrakte sich in den Proteinfällungseigenschaften nicht erheblich von Ratanhiawurzel und Tormentillwurzelstock unterscheiden (vgl. Abb. 71) ist kein signifikanter Unterschied zwischen gelagerter Droge und Rückstellschema zu erkennen.

Dies liegt möglicherweise am überwiegenden Vorkommen hydrolysierbarer Gerbstoffe, während Tormentillwurzelstock und Ratanhiawurzel einen hohen Anteil des kondensierten Gerbstoff-Typs aufweisen. Bei den kondensierten Gerbstoffen ist aufgrund ihrer chemischen Struktur eher davon auszugehen, daß es zu Polymerisationsreaktionen kommt, wodurch möglicherweise ihre Affinität zu Proteinen wie BSA verringert wird.

Ein Vorteil der Methode liegt darin, daß man von den analytischen Ergebnissen direkt auf physiologische Effekte der untersuchten Extrakte schließen kann. Die im Vergleich zu anderen Methoden nicht optimale Linearität der gefällten Menge an Protein in Abhängigkeit von der eingesetzten Gerbstoffmenge und die Tatsache, daß relativ hochkonzentrierte Gerbstofflösungen zur Proteinpräzipitation erforderlich sind, sind als Nachteile zu nennen. Ob diese Methode ausreichend empfindlich ist, um auch bei Langzeituntersuchungen aussagekräftige Resultate zu liefern, müßten weitere Untersuchungen zeigen.

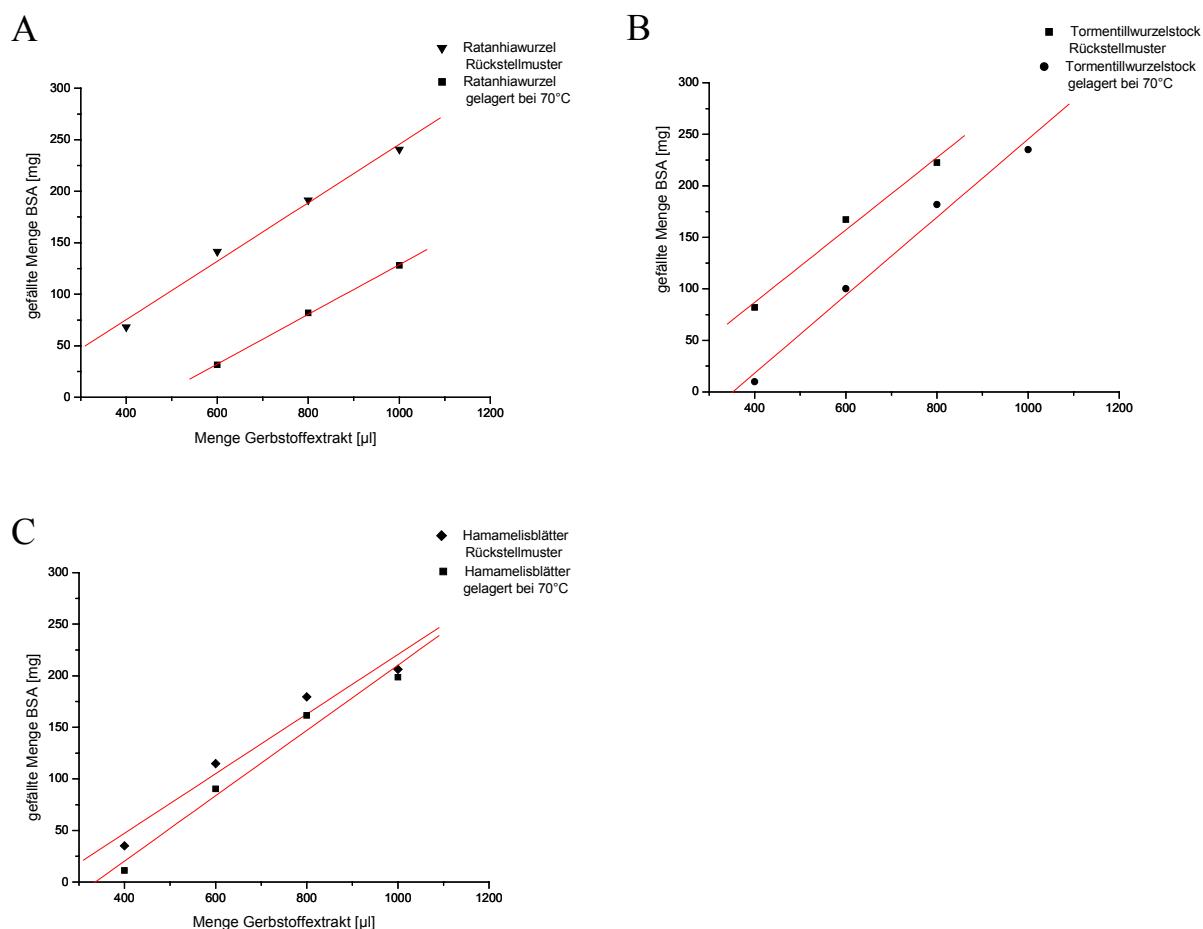


Abb. 72: Präzipitation von BSA in Abhängigkeit unterschiedlich gelagerter Ratanhiawurzel-(A)- Tormentillwurzel-(B)- und Hamamelisblätterextrakte (C)

3.2.3.2 Trübungsmessung von Gerbstoff-PVP-Komplexen mit der Tannometer-Methode

Im Bereich der Lebensmittelanalytik vor allem bei flüssigen Zubereitungen wird die sog. Trübungsmessung eingesetzt, um die in Getränken enthaltenen Gerbstoffe zu quantifizieren. Das Prinzip der Trübungsmessung beruht darauf, daß gerbstoffhaltige Lösungen mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) Trübungen ergeben, die sich im Überschuß von PVP zu größeren Aggregaten zusammenlagern. Bei den entwickelten nephelometrischen Methoden resultiert eine Trübungskurve, deren Maximum dem Gerbstoffgehalt proportional ist. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff der sog. „Tannoide“ geprägt, worunter man in der Lebensmittelchemie den Anteil an Polyphenolen versteht, der mit PVP (durchschnittliches MG 700000 Da) fällbar ist [CHAPON (1993)]. Für diese Trübungsmessungen werden sogenannte Nephelometer (Tannometer) eingesetzt, die eine rasche und gut reproduzierbare Bestimmung von Gerbstoffen, die mit PVP fällbar sind, ermöglichen.

Bisher wurden derartige Tannometer ausschließlich im Lebensmittelbereich eingesetzt. Es existieren bislang nur wenige Erfahrungen über Verwendungen im Bereich der Drogenanalytik [CHAPON (1996 A)]. Daher sollte die Möglichkeit der Gerbstoffbestimmung durch Trübungsmessung bei entsprechenden Drogen im Vergleich zur arzneibuchkonformen Methodik untersucht werden

Chemisch-physikalische Grundlagen der Interaktion zwischen Polyphenolen und PVP

Polyvinylpyrrolidon (PVP) ist eine polymere, gut wasserlösliche Verbindung, bei der die Stickstoffatome der Pyrrolidon-Ringe an eine Polymethylen-Kette kovalent gebunden sind (Abb. 73). Die enthaltenen Carbonylgruppen stellen die funktionellen Einheiten dar, die als Elektronendonatoren Wasserstoffbrücken zu Polyphenolen ausbilden können und Interaktionen mit phenolischen OH-Gruppen ergeben [MAKKAR et al (1995)].

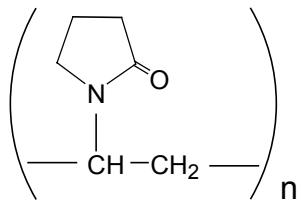


Abb. 73: Formelausschnitt von PVP

In Abb. 74 (a-c) ist das Prinzip der Interaktion von Gerbstoffmolekülen mit den PVP-Strängen schematisch dargestellt.

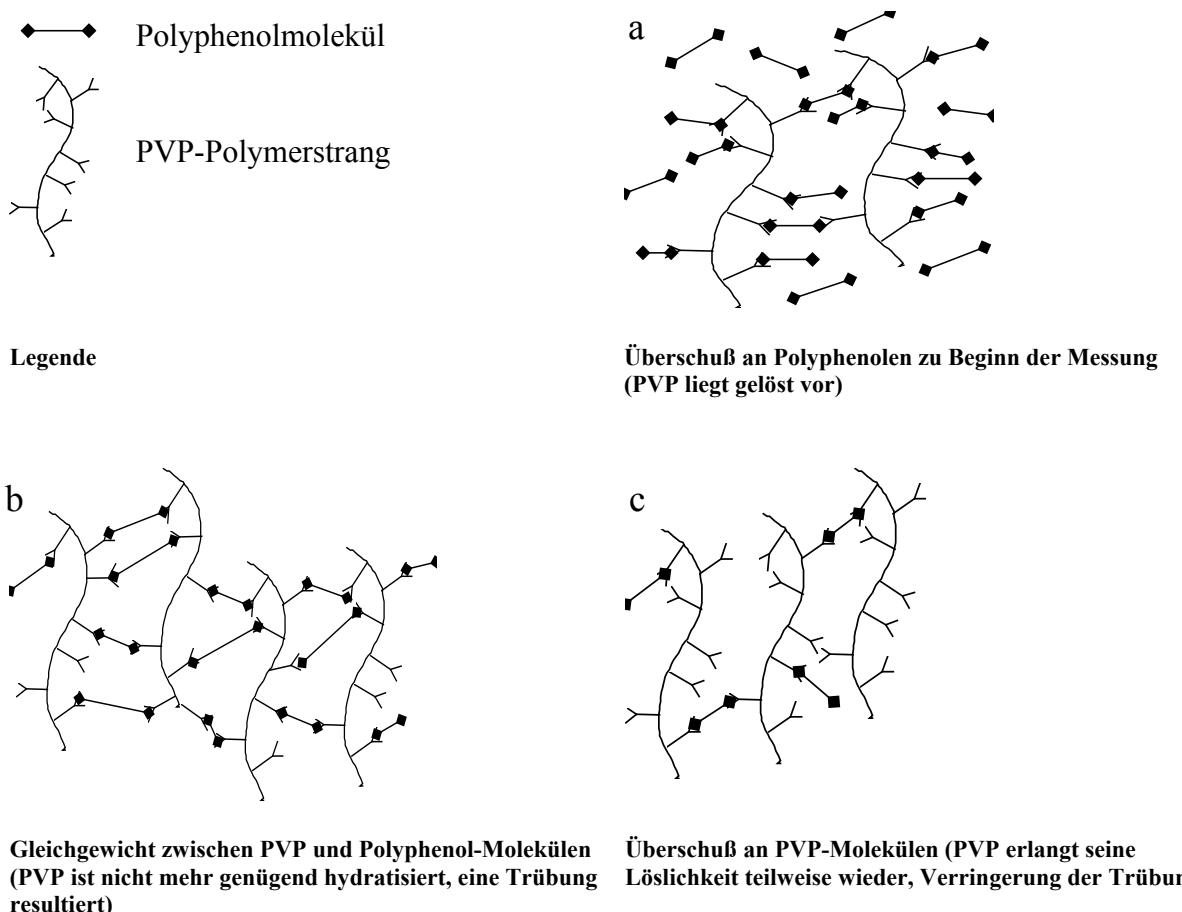


Abb. 74 (a-c): Schematische Darstellung der Interaktion von Polyphenolen mit Polyvinylpyrrolidon

Zu Beginn der Messung liegt ein Überschuß von Polyphenolen im Vergleich zu PVP vor, so daß alle PVP-Moleküle von gelösten Polyphenol-Molekülen umgeben sind (Abb. 74 A). Dies führt zu einer Verdrängung von Wassermolekülen und damit zu einer verringerten Löslichkeit des PVP, woraus eine Trübung resultiert (Abb. 74 B).

Im Zustand des Gleichgewichtes zwischen Tannin- und PVP-Molekülen erlangt das PVP schrittweise seine Löslichkeit wieder, da nicht mehr alles PVP mit gebundenen Gerbstoffmolekülen gesättigt ist. (Abb. 74 C) [SIEBERT (1999)].

Die PVP-Konzentration im Maximum der Meßkurve (Abb. 75) entspricht somit der Tanninkonzentration, die mit einem entsprechenden Rechenprogramm ermittelt wird.

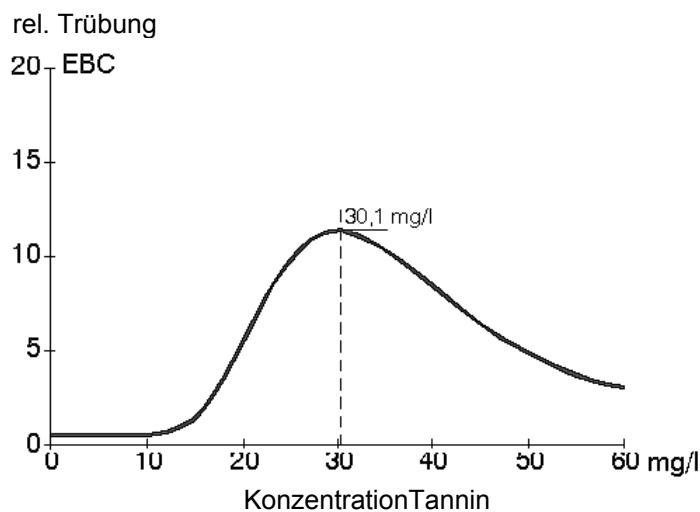


Abb. 75: Modellverlauf einer Trübungskurve im Tannometer

Meßprinzip

Das Tannometer (Abb. 76) besteht aus einer automatischen Perfusorspritze, mit der PVP-Lösung exakt zudosiert werden kann und einer temperaturkontrollierten Meßzelle.

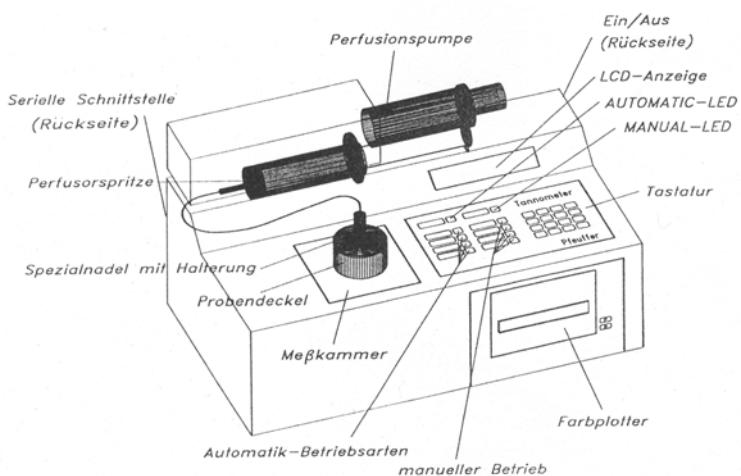
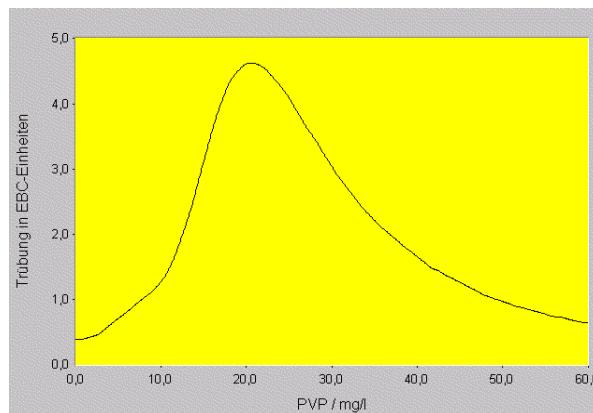


Abb. 76: Schematischer Aufbau des Tannometers

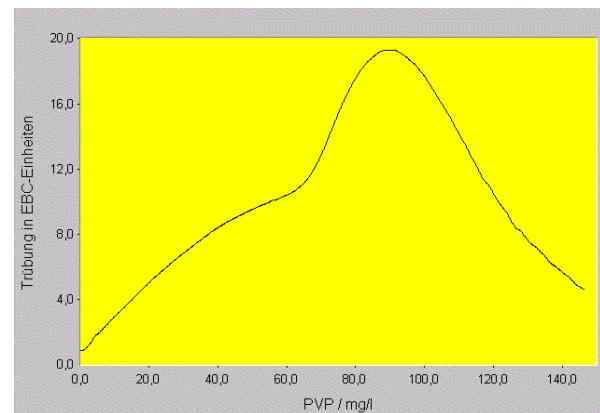
In einer Küvette werden die Probenlösung (in der Regel wäßrige Extrakte), gesättigte Ammoniumsulfatlösung und Wasser mit dem integrierten Magnetrührer gemischt und in die thermostatierte Meßzelle gebracht. Nach der automatischen Zugabe von PVP-Lösung wird die Intensität des durch ungelöste PVP / Tannin Verbindungen gestreuten Lichtes erfaßt. Dies erfolgt im Tannometer zum einen durch einen Empfänger, der das Durchlicht durch die Küvette bei einer Wellenlänge von 510 nm mißt, zum anderen durch einen Empfänger, der das in einem Winkel von 90° gestreute Licht erfaßt. Die resultierende Trübungskurve wird

von einem angeschlossenen Datenverarbeitungssystem aufgezeichnet. Man erhält eine Glockenkurve mit einem deutlichen Maximum, die extraktspezifisch mehr oder weniger symmetrisch verläuft.

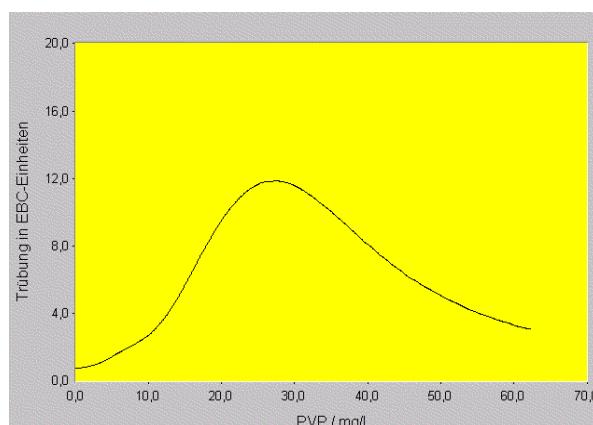
Die Trübungskurven von unterschiedlichen Drogenextrakten sind in Abb. 77 (1-6) gegenübergestellt. Der Verlauf der Kurven ist für die Drogenextrakte charakteristisch und bei Untersuchung von verschiedenen Drogenchargen relativ konstant.



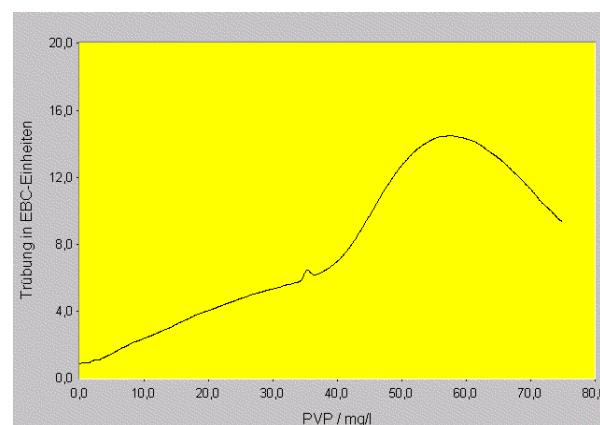
1: Hamamelisblätterextrakt



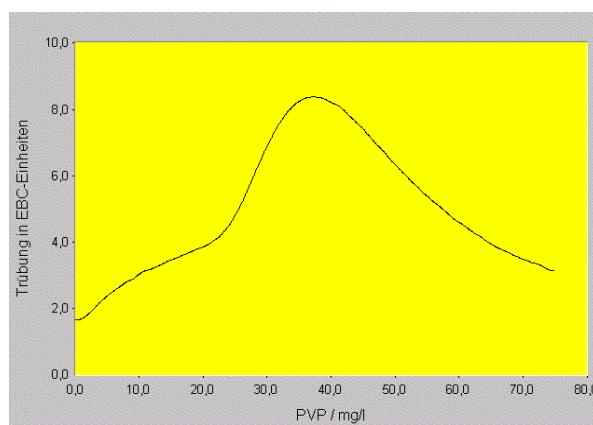
2: Eichenrindenextrakt



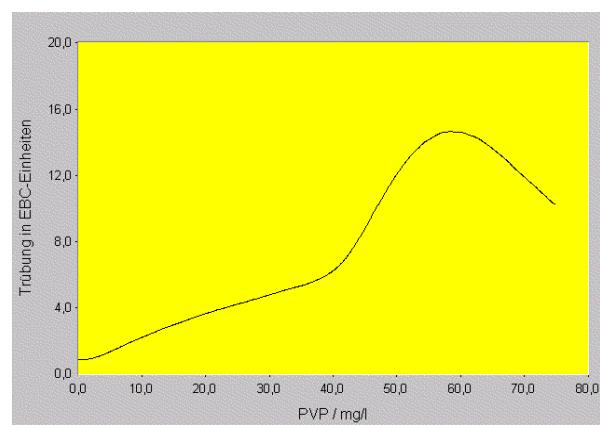
3: Walnußblätterextrakt



4: Tormentillawurzelstockextrakt



5: Ratanhiawurzelextrakt



6: Odermennigkrautextrakt

Abb. 77 (1-6): PVP / Tannoid- Trübungskurven von unterschiedlichen gerbstoffhaltigen Drogen

Die untersuchten Extrakte waren wässrige Gerbstofflösungen, die gemäß PH. EUR. (2002) (2) hergestellt wurden. Es ist zu erkennen, daß die Trübungskurve von Hamamelisblätterextrakt symmetrischer verläuft als die Kurve von Eichenrinde- oder Ratanhiawurzelextrakt. Nach CHAPON (1993) deutet eine symmetrische Form des Kurvenverlaufs eher auf wenig oder mittelkondensierte Gerbstoffe hin, während ein asymmetrischer Kurvenverlauf auf einen hohen Anteil an hoch kondensierten Polyphenolen hindeutet. Diese Aussage stimmt mit erhaltenen Daten der untersuchten Drogen überein. Hamamelisblätter und Walnußblätter beispielsweise enthalten nach HAGER (2002) einen relativ hohen Anteil an hydrolysierbaren bzw. niedrig kondensierten Gerbstoffen, woraus relativ symmetrische Kurvenverläufe resultieren (Abb. 77 (1, 3)).

Tomentillwurzelstock oder Eichenrinde, mit einem hohen Anteil an kondensierten Gerbstoffen zeigen dagegen einen relativ unsymmetrischen Kurvenverlauf. (Abb. 77 (2, 4))

Überprüfung der Meßparameter

Die Reproduzierbarkeit der Tannometer-Methode kann bei geringen Standardabweichungen der Meßwerte als gut bezeichnet werden. Die Variationskoeffizienten liegen bei < 5 %.

Die Meßwerte verlaufen über einen weiten Konzentrationsbereich streng linear, die Abweichungen von einer Idealgerade liegen bei $r^2=0.9988$ für Ratanhiawurzel bzw. $r^2=0.9997$ für Eichrindenextrakt (Abb. 78). Praktisch wurde dabei nicht ein höher konzentrierter Extrakt eingesetzt, sondern eine steigende Extraktmenge, d.h. die ursprünglich vorgegebenen 3 ml Wasser ersetzt man entsprechend durch steigende Mengen an wässrigem Drogenextrakt.

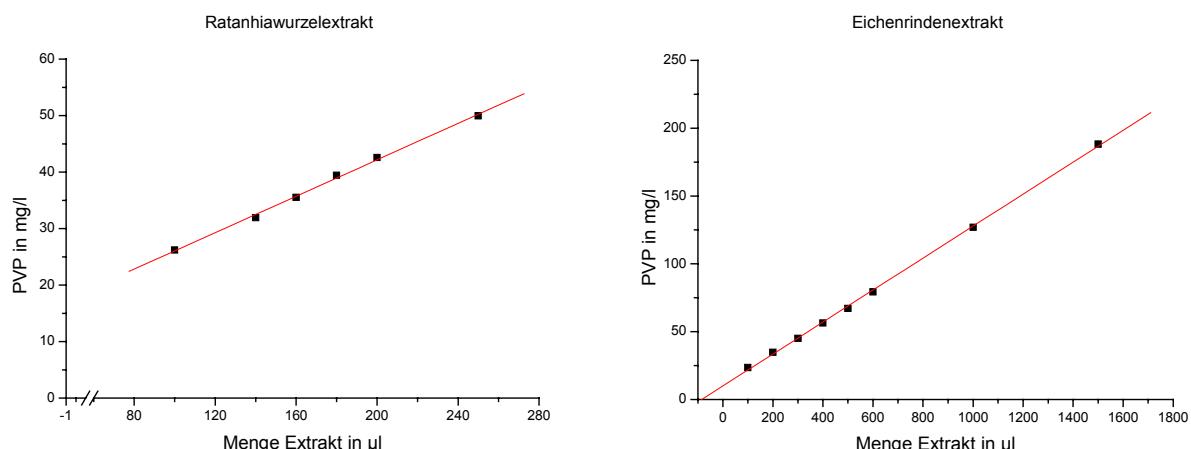


Abb. 78: Evaluation des Linearitätsbereiches von Ratanhiawurzel- bzw. Eichenrindenextrakt in der Tannometer-Methode

Die entstehende Trübung ist vor allem von den Parametern Meßtemperatur und Dosiergeschwindigkeit von PVP abhängig. Es wurden daher die Auswirkungen dieser Parameter auf das Meßergebnis untersucht.

Das Vermessen eines Gänsefingerkrautextraktes bei einer konstanten Dosiergeschwindigkeit von 2,5 mg/l, jedoch **unterschiedlichen Temperaturen** ergab folgendes:

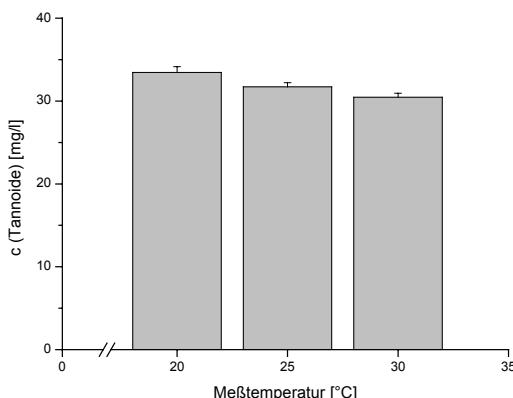


Abb. 79: Temperaturabhängigkeit der Meßergebnisse bei Gänsefingerkrautextrakt (3-fach Bestimmung, Variationskoeffizient < 4%)

Mit steigender Reaktionstemperatur sinkt die gemessene Tannoidkonzentration, das Trübungsmaximum wird scheinbar schneller erreicht.

Bei Konstanthalten der Meßtemperatur bei 25 °C ergaben sich bei **Variation der Dosiergeschwindigkeit** folgende Werte:

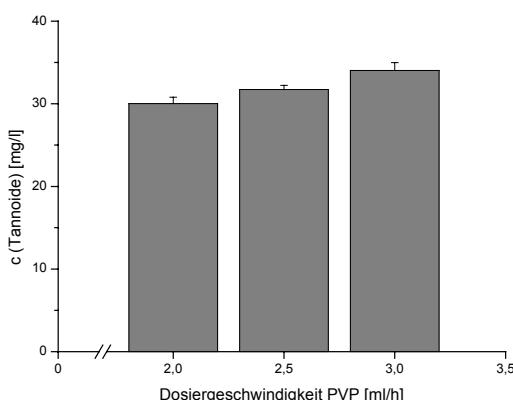


Abb. 80: Dosiergeschwindigkeitsabhängigkeit der Meßergebnisse bei Gänsefingerkrautextrakt (jeweils 3-fach Bestimmung, Variationskoeffizient < 4%)

Bei schnellerem Zugeben von PVP-Lösung steigt die gemessene Tannoidkonzentration an. Die bereits früher [DONHAUSER (o. Jahresangabe)] beobachteten Veränderungen der Tannoidkonzentration bei sinkender Meßtemperatur und steigender Dosiergeschwindigkeit konnten bei der Messung von Drogenextrakten bestätigt werden. Die ermittelten Unterschiede im Tannidgehalt sind jedoch relativ gering. Für reproduzierbare Ergebnisse sollten somit die Reaktionsparameter Temperatur und Dosiergeschwindigkeit genau definiert werden.

Ein Vergleich der Tannometer-Werte mit den nach der Hautpulvermethode der Ph. Eur. ermittelten Gerbstoffwerten lässt erkennen, daß eine Korrelation der Ergebnisse beider Methoden vorhanden ist; der Zusammenhang ist jedoch nicht streng linear. (Tab. 10)

Beide Methoden beruhen auf unterschiedlichen Bestimmungsverfahren, wobei unterschiedliche chemische und strukturelle Eigenschaften der Verbindungen berücksichtigt werden.

<i>untersuchte Droge (Ph. Eur.)</i>	<i>Tannometer</i>	<i>Hautpulvermethode (Ph. Eur.)</i>
Hamamelisblätter	32 mg/l	2,80 %
Gänsefingerkraut	20 mg/l	1,63 %
Tormentillwurzelstock	70 mg/l	9,00 %
Walnußblätter	29 mg/l	1,50 %
Eichenrinde	37 mg/l	5,00 %
Ratanhiawurzel	43 mg/l	4,80 %

Tab. 10: Vergleich der ermittelten Gerbstoffgehalte (Tannometer vs. Hautpulvermethode)

Bei Extrakten von Drogenmaterialien, die acht Wochen bei 70°C gelagert waren, lagen die nach der Tannometer-Methode ermittelten Werte signifikant niedriger (mehr als 20 %) als die Tannidgehalte von entsprechenden Rückstellmustern (Tab. 11). Damit ließ sich nachweisen, daß die Fähigkeit von Gerbstoffextrakten, mit PVP zu interagieren abnimmt, wenn hohe Temperaturen auf das Drogenmaterial einwirken. Ähnliche Beobachtungen wurden bei den Untersuchungen zur Gerbstofffällung mit Proteinen gemacht. (vgl. 3.2.3.1)

<i>Droge</i>	<i>Tannoidgehalt [mg/l]</i>	<i>Tannoidgehalt [mg/l]</i>
	<i>Rückstellmuster</i>	<i>bei 70°C gelagerte Droge</i>
Ratanhiawurzel	42,39 ($c_v=2,40\%$)	31,03 ($c_v=4,02\%$)
Walnußblätter	30,89 ($c_v=4,69\%$)	25,46 ($c_v=3,67\%$)
Eichenrinde	36,02 ($c_v=5,24\%$)	28,69 ($c_v=2,99\%$)

Tab. 11: Vergleich der Tannoidgehalte nach der Tannometer-Methode von gelagerter Droge und Rückstellmustern (c_v = Variationskoeffizient)

Die PVP-Trübungsmethode mit Hilfe des Tannometers bietet die Möglichkeit, ohne weitere Probenvorbereitung den Polyphenolgehalt gerbstoffhaltiger Drogenextrakte (hergestellt gemäß Hautpulvermethode Ph. Eur.) relativ schnell zu bestimmen. Mit der Trübungsmethode werden im Gegensatz zu den üblichen photometrischen Bestimmungen mit Vanillin bzw. BuOH / HCl die adsorptiven Eigenschaften von Gerbstoffen an Makromoleküle bestimmt. Auch hier werden nur Informationen über den Gesamtgehalt und keine Hinweise zur Zusammensetzung bzw. chemischen Grundstruktur der Gerbstoffe erhalten.

3.2.4 Chromatographische Verfahren

Der Einsatz von geeigneten HPLC-Methoden bei Stabilitätsuntersuchungen, mit denen Fingerprintchromatogramme der enthaltenen Polyphenol-Fraktion aufgezeichnet werden können, wäre von großem praktischen Interesse. Viele Ansätze dazu sind in der Literatur beschrieben [ESCARPA et al. (2002), LAZARUS et al. (1999), SUN et al. (1998), VENNAT et al. (1988), ESCRIBANO-BAILÓN et al. (1992)], jedoch existieren bis heute wenig zufriedenstellende Methoden zur chromatographischen Trennung von Gerbstoffgemischen. Die Detektion von Gerbstoffen kann durch Diode array Detektoren (DAD), elektrochemische Detektoren [ROHR et al. (2000 A)] oder massenselektive Detektoren (MS) [ROHR et al. (2000 B), CHEYNIER et al. (1997)] erfolgen. Die größten Schwierigkeiten, die bei der Entwicklung neuer HPLC-Methoden für diese Substanzgruppe auftreten sind

- Mangel an geeigneten Referenzsubstanzen
- Komplexe Zusammensetzung der genuinen Extrakte, die die Auswahl eines geeigneten Säulenmaterials erschwert (häufig wird Kieselgel [HAMMERSTONE et al. (1999)] oder reversed phase-Material eingesetzt)
- höhermolekulare Verbindungen binden irreversibel am Säulenmaterial

Daraus resultierend ergeben sich Chromatogramme mit schlecht aufgelösten Peaks, die für quantitative Bestimmungen unbrauchbar sind. Bei der Gruppe der Procyanidine lassen sich Catechineinheiten bis zu einem Polymerisationsgrad von $n = 3$ noch befriedigend trennen. In Extrakten vorhandene größere Einheiten bzw. komplexer gebaute Gerbstoffmoleküle wirken sich negativ auf die Trennungen aus. Abb. 81 zeigt die Chromatogramme von zwei verschiedenen wäßrigen Gerbstoffextrakten nach der Methode von HAMMERSTONE et al. (1999). Als Säulenmaterial wurde Kieselgel 5 µm verwendet (250 x 4,6 mm)

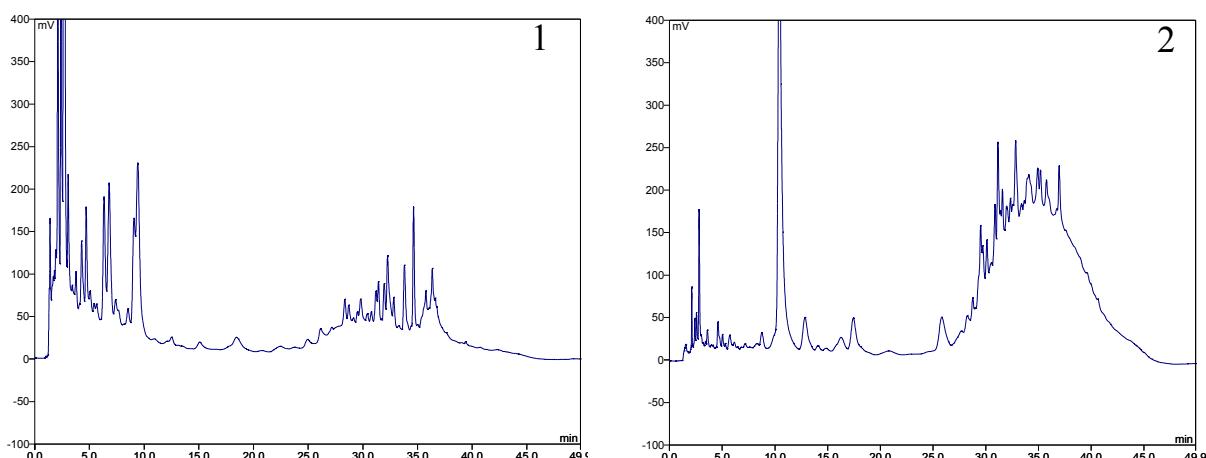


Abb. 81: Beispiel einer chromatographischen Trennung (HPLC) von Hamamelisblättern (1) und Ratanhiawurzel (2)

Um eine höhere Empfindlichkeit bei der Detektion von Procyanidinen zu erreichen, wurden von anderen Autoren die mittels HPLC getrennten Substanzen einer Nachsäulen-Derivatisierung mit 4-Dimethylaminocinnamaldehyd unterzogen und die entstehenden farbigen Verbindungen bei 640 nm detektiert [TREUTTER et al. (1994) TREUTTER (1989)]. Ein Vorteil dieser Derivatisierung liegt darin, daß die Umsetzungsprodukte höhere Absorptionskoeffizienten aufweisen und somit besser von den übrigen phenolischen Extraktbestandteilen unterschieden werden können. Eigene Ergebnisse zu dieser Methodik liegen nicht vor.

Eine weitere Möglichkeit einer chromatographischen Trennung ist die Gelpermeationschromatographie, mit der es möglich wäre, Oligo- bzw. Polymere nach ihrer Molekülgröße aufzutrennen. Dadurch sollte man Aufschluß über Veränderungen der Molekülmassenverteilung in einem Extrakt erhalten. Gerade bei den Gerbstoffen, von denen man annimmt, daß sie im Laufe der Zeit zu größeren Komplexen polymerisieren, scheint dies ein sinnvoller Ansatz zu sein. Als geeignete Säulenmaterialien für Gerbstoffe sind für die GPC Polystyrol-Divinylbenzol [WILLIAMS (1983), UBILLAS (1994), LABARBE (1999)] und Sephadex® LH 20 [HIERMANN (1986)] angegeben.

Trennversuche von wäßrigen Gerbstoffextrakten an Sephadex LH 20 Material wurden durchgeführt. Dieses Material wird häufig zur Isolierung von Polyphenolen eingesetzt. Die Trennung beruht neben einem „Siebeffekt“ auch auf adsorptiven Prozessen am Säulenmaterial. Hochmolekulare Verbindungen wurden jedoch irreversibel an das Säulenmaterial gebunden. Die Trennungen führten zudem zu relativ schlecht aufgelösten Peaks. Eine Zuordnung der erhaltenen Fraktionen zu bestimmten Molekülmassenbereichen war ohne Vergleichssubstanzen nicht möglich. Um brauchbare Erkenntnisse über die genaue Zusammensetzung der gewonnenen Fraktionen zu erhalten, müßten nach weiteren Trennschritten einzelne Verbindungen isoliert und deren Struktur mittels MS und NMR aufgeklärt werden. Während des Chromatographierens sollte wegen der Empfindlichkeit der Substanzen auf Licht- und Sauerstoffausschluß (Argonbegasung) und möglichst niedrige Temperaturen geachtet werden [vgl. ROHR (1999 B)].

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war die Tatsache, daß bislang nur wenige systematische Untersuchungen zur Stabilität von therapierelevanten Pflanzeninhaltsstoffen, im vorliegenden Fall Flavonoide und Gerbstoffe vorliegen.

Es erschien daher notwendig, die Stabilität von verschiedenen, in der pharmazeutischen Praxis häufig verwendeten Flavonoid- bzw. Gerbstoffdrogen bei definierten Schnittgraden und in unterschiedlichen Packmitteln über einen Zeitraum von mindestens 24 Monaten zu untersuchen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten zu Haltbarkeitshinweisen führen, die Eingang in die entsprechenden Standardzulassungen finden sollen. Der Entwicklung, Validierung und praxisrelevanten Beurteilung verschiedener Methoden sollte dabei besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Darüberhinaus war es Ziel dieser Arbeit, Informationen über die Empfindlichkeit einzelner Substanzen bzw. Substanzgruppen unter dem Einfluß von exogenen Streßfaktoren zu erhalten.

Die dabei erzielten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

a) Flavonoidhaltige Drogen

(Birkenblätter, Goldrutenkraut, Holunderblüten, Mädesüßblüten, Passionsblumenkraut, Ringelblumenblüten, Ruhrkrautblüten, Stiefmütterchenkraut)

- Die mit zwei unterschiedlichen analytischen Verfahren (photometrisch und chromatographisch) erhaltenen Resultate zeigten unter den Bedingungen der Klimazone II (25°C/60 % rF) während einer Lagerdauer von 24-30 Monaten keine signifikanten Veränderungen im Flavonoidgehalt bzw. der Peakflächensumme. Von einer mindestens zweijährigen Stabilität der Flavonoide unter diesen Bedingungen ist auszugehen.
- Eine für die Stoffgruppe der Flavonoide universell einsetzbare HPLC-Methode mit einer Laufzeit von ca. 50 min wurde entwickelt und validiert.
- Kritische Parameter, die nachweisbare Effekte auf die Stabilität von Flavonoiden haben, sind hohe Luftfeuchtigkeit (75 % rF) und hohe Temperaturen (80°C bis 100°C). Einsatz dieser Streßfaktoren bewirkt eine Spaltung von Flavonoid-O- bzw. Flavonoid-C-Glykosiden und eine Zunahme der entsprechenden Aglyka.

b) Gerbstoffhaltige Drogen

(Eichenrinde, Gänsefingerkraut, Hamamelisblätter, Hamamelisrinde, Odermennigkraut,, Ratanhiawurzel Tormentillwurzelstock, Walnußblätter)

Das Fehlen empfindlicher und aussagekräftiger Analysenmethoden für Gerbstoffe war Ausgangspunkt für die Stabilitätsprüfung von gerbstoffhaltigen Drogen. Verschiedene Methoden zur Gerbstoffanalytik wurden auf ihre Eignung für Stabilitätsprüfungen an Drogenmaterialien untersucht

- Die Ergebnisse der Hautpulvermethode nach Ph. Eur. ließen aufgrund mangelnder Spezifität der Methode und schlechter Reproduzierbarkeit keine Rückschlüsse auf die Stabilität von Drogen zu.
- Die für kondensierte Gerbstoffe selektive Vanillin-Methode erwies sich als besser geeignet, Instabilitäten im Drogenmaterial zu dokumentieren. Eine Anwendung von Temperaturstreuß führte zu einer deutlichen Abnahme der gemessenen Extinktionen des Procyanidin-Komplexes.
- Bei Proteinfällungsreaktionen (BSA) ließen sich Unterschiede in den Proteinfällungseigenschaften von Drogenextrakten aus gelagertem Material im Vergleich zu Rückstellmustern dokumentieren
- Eine nephelometrische Analysenmethode unter Einsatz von PVP für Tannine (Tannometer) wurde für Drogenextrakte evaluiert.

Wegen der chemischen Komplexizität der heterogenen Gerbstoffgruppe dürfte keine der untersuchten Methoden in der Lage sein, diese Substanzklasse ausreichend zu analysieren. Um qualitative und quantitative Veränderungen dieser Substanzklasse ausreichend dokumentieren zu können, müssen in der pharmazeutischen Praxis verschiedene Methoden miteinander kombiniert werden.

5. Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Loses Drogenmaterial

Das verwendete Drogenmaterial wurde vom Drogengroßhandel bezogen und entsprach den Anforderungen der jeweils gültigen Arzneibücher. Die Drogen wurden zum Teil unzerkleinert eingelagert (Schnittgrad: ga), ein anderer Teil einer weiteren Zerkleinerung unterzogen (Schnittgrad ge bzw. pu) (siehe 5.2.1)

Birkenblätter	Ch.B. 9109181	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Birkenblätter	Ch.B. 9106821	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Birkenblätter	Ch.B. 9108057	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Birkenblätter	Ch.B. 7100442	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Holunderblüten	Ch.B. 9110584	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Holunderblüten	Ch.B. 8102112	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Holunderblüten	Ch.B. 9211644	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Goldrutenkraut (Riesen-)	Ch.B. 9105210	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Goldrutenkraut (Riesen-)	Ch.B. 0101378	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Goldrutenkraut (Riesen-)	Ch.B. 8108372	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Goldrutenkraut (echtes)	Ch.B. 9108919	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Goldrutenkraut (echtes)	Ch.B. 9103375	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Mädesüßblüten	Ch.B. 9211261	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Passionsblumenkraut	Ch.B. 9202211	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Passionsblumenkraut	Ch.B. 0101144	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Passionsblumenkraut	Ch.B. 0101577	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Ringelblumenblüten	Ch.B. 9101938	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Ringelblumenblüten	Ch.B. 9206996	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Ringelblumenblüten	Ch.B. 103771	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Ruhrkrautblüten	Ch.B. 9205380	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Ruhrkrautblüten	Ch.B. 8104496	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Stiefmütterchenkraut	Ch.B. 8206284	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Stiefmütterchenkraut	Ch.B. 9106341	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Stiefmütterchenblüten	Ch.B. 6105497	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>

Eichenrinde	Ch.B. 154286	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Eichenrinde	Ch.B. 9106031	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Gänsefingerkraut	Ch.B. 7203243	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Gänsefingerkraut	Ch.B. 0071.60	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Gänsefingerkraut	Ch.B. 911498	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Hamamelisblätter	Ch.B. 99221	<i>Fa. Schwabe, Karlsruhe</i>
Hamamelisblätter	Ch.B. 9910608	<i>Fa. Müggenburg, Alveslohe</i>
Hamamelisblätter	ohne Ch.B., „Salus“	<i>Fa. Salus, Bruckmühl</i>
Hamamelisblätter	Ch.B. 980998	<i>Fa. Schwabe, Karlsruhe</i>
Hamamelisrinde	Ch.B. 990331	<i>Fa. Schwabe, Karlsruhe</i>
Hamamelisrinde	Ch.B. 9910608	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Odermennig	Ch.B. 9101524	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Ratanhiawurzel	Ch.B. 9201147	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Ratanhiawurzel	Ch.B. 9108659	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Ratanhiawurzel	Ch.B. 9110973	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Tomentillwurzelstock	Ch.B. 140531	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>
Tomentillwurzelstock	Ch.B. 8205930	<i>Martin Bauer, Vestenbergsgreuth</i>

5.1.2 Verpackungsmaterial

Für die Untersuchungen zur Langzeitstabilität wurden folgende Packmaterialien verwendet:

- geklebte Blockbodenbeutel aus einseitig glattem, gebleichtem Natronkraftpapier (50 g/m²), gefüttert mit gebleichtem Pergamyn (40 g/m²), div. Größen (*Fa. Wepa, Amberg*)
- Aromaschutzbeutel aus gebleichtem Kraftpapier (70g/m²), kaschiert gegen Aluminiumfolie 9-10 µm, leimkaschiert gegen Polyethylen 50 µm, div. Größen, *Schröder & Wagner, Rinteln*

Die Beutel wurden wie in der Apotheke üblich nach mehrfachem Umfalten mit einer Metallklammer verschlossen.

5.1.3 Lösungsmittel und Chemikalien

Fließmittel für die HPLC:

Acetonitril (HPLC-Qualität): *Fa. Baker*, Groß-Gerau

Wasser: Über Reinstwasseranlage Milli Q UF plus: *Fa. Millipore*, Eschborn

Phosphorsäure 85% p.a.: *Fa. Merck*, Darmstadt

Referenzsubstanzen:

Reinsubstanzen zur Peakidentifizierung wurden von der *Fa. Roth*, Karlsruhe bezogen.

(+)-Catechin, Chlorogensäure, Epicatechin, Hyperosid, Isoquercitrin, Isoorientin, Isovitexin, Isorhamnetin, Isorhamnetin-3-glucosid, Isorhamnetin-3-rutinosid, Kämpferol-3-glucosid, Kaffeesäure, Myricetin, Myricitrin, Quercetin, Quercitrin, Quercetin-3-arabinosid, Rutin, Vitexin, Vitexin-2“-O-rhamnosid, Saponarin

Weitere verwendete Lösungsmittel und Reagenzien sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

5.1.4 Geräte

HPLC-Anlage: Pumpen Waters 515, *Fa. Waters*, Eschborn

Autosampler Waters 717 plus, *Fa. Waters*, Eschborn

Diodarraydetektor (DAD) 545 V, *Fa. Bio-Tek*, Neufahrn

Säulenofen Typ STH 585, *Fa. Gynkotek*, Germerring

Steuerungs-und Auswertesoftware: Kroma System 2000,

Fa. Bio-Tek, Neufahrn

Säule: *Knauer* Eurosphere-100, C 18, 4,6mm x 250mm, 5µm

Vorsäule: *Knauer* Eurosphere-100, C 18, 4,6mm x 10mm, 5µm

Zerkleinerung: Retsch Mühle SM 1, *Fa. Retsch*, Haan (für große Drogenmengen)

Labormühle IKA A 10, *Fa. Ika Labortechnik*, Staufen (Kleinmengen)

UV/VIS-

Spektroskopie: Ultrospec III, *Pharmacia LKB Biochrom Ltd.*, Cambridge (GB)

Tannometer: Nephelometer mit thermostatisierter Meßkammer und Dosier-einrichtung, *Fa. Pfeuffer*, Kitzingen

Steuerungs- und Auswertesoftware: TannoLab 2.0, *Fa. Pfeuffer*, Kitzingen

Als **Lagerort** für die Langzeituntersuchungen (*long term testing*) wurde ein nach außen dicht abschließender, klimatisierbarer Raum gewählt, der durch Anschluß an das zentrale Heiz-Lüftungs-Netz der Universität bei konstanter **Temperatur** gehalten werden kann. Zur Erzeugung der benötigten **Luftfeuchtigkeit** kamen Ultaschallbefeuchter Aquastar NT (*Fa. Burg / Honeywell Inc.*) und Verdunstungsbefeuchter (*Venta AG, Hünenberg (CH)*) zum Einsatz. Die Wassernachspeisung der Befeuchter wurde durch elektronische Wasserwächter automatisiert. Zur Simulation der Bedingungen des „*accelerated testing*“ (40°C, 75 % rF) wurde ein Exsikkator verwendet, der in seinem unteren Bereich eine gesättigte Natriumnitratlösung enthält. Darin stellt sich innerhalb einer Woche eine Gleichgewichtsfeuchte von ca. 75 % rF ein. Das Temperieren des Exsikkators erfolgte durch Einstellen in einen Trockenschrank.

5. 2 Methoden

5.2.1 Zerkleinerung des Drogenmaterials

Vor der Einlagerung wurde das Drogenmaterial, das zum Großteil als Ganzdrogen bezogen wurde, entsprechend zerkleinert, um es neben der Ganzdroge in den Schnittgraden „gepulvert“ (0,18 - 0,71 mm) und „grob geschnitten“ (2,8 – 4,0 mm) einzulagern zu können. Die kontrollierte Zerkleinerung erfolgte mit einer Schneidemühle (*Fa. Retsch*). Es ist darauf zu achten, daß sich das Mahlgut während des Zerkleinerns nicht zu stark erhitzt, um Auswirkungen auf das Drogenmaterial zu verhindern. Durch Auswahl verschiedener Siebeinsätze, die zwischen dem Schneideblock und dem Auffangbehälter lokalisiert sind, kann eine definierte Schnittgröße erreicht werden.

Vor der Durchführung der jeweiligen Analytik war die Zerkleinerung entsprechend kleiner Probenmengen erforderlich. Dies erfolgte in einer IKA-Labormühle, die Zerkleinerungsdauer betrug 2 x 30 sec.

Für die Einwaage wurde einheitlich der Siebdurchgang des Siebes Nr. 5 (Maschenweite 0,315 mm) nach DAB 7 verwendet, auch wenn in entsprechenden Arzneibuchmonographien unterschiedliche Siebfractionen von 0,250 mm bis 0,355 mm verlangt sind.

5.2.2 Methoden zur Stabilitätsuntersuchung von Flavonoiden

5.2.2.1 Bestimmung des Gesamtflavonoididgehaltes nach Ph. Eu. 2002

[entsprechend PH. EUR. (2002), MONOGRAPHIE „BIRKENBLÄTTER“]

Die vorgeschriebene Menge an pulverisierter Droge wird in einem 100 ml Rundkolben mit 1 ml einer Lösung von Methenamin, 20 ml Aceton und 2 ml Salzsäure versetzt und 30 min lang zum Rückfluß erhitzt. Das Gemisch wird durch einen Wattebausch in einen Kolben filtriert. Die verwendete Watte wird zum Rückstand im Rundkolben gegeben und der Inhalt 2 mal 10 min lang mit je 20 ml Aceton zum Rückfluß erhitzt. Die Auszüge werden nach dem Erkaltenlassen jeweils durch einen Wattebausch in den Kolben filtriert. Nach dem Abkühlen werden die vereinigten Acetonauszüge durch ein Papierfilter in einen 100 ml-Meßkolben filtriert. Mit Aceton, das zuvor zum Nachspülen von Kolben und Papierfilter dient, wird aufgefüllt. 20,0 ml Lösung werden in einem Scheidetrichter mit 20 ml Wasser versetzt, 1 mal

mit 15 ml und 3 mal mit je 10 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die in einem Scheidetrichter vereinigten Ethylacetat-Auszüge werden 2 mal mit je 50 ml Wasser gewaschen, anschließend über wasserfreies Natriumsulfat in einen Meßkolben filtriert und mit Ethylacetat zu 50,0 ml verdünnt.

Zu 10,0 ml der erhaltenen Lösung wird 1 ml Aluminiumchlorid-Reagenz R gegeben und mit einer 5-prozentigen Lösung (V/V) von Essigsäure 98 % in Methanol auf 25,0 ml aufgefüllt. Nach 30 Minuten wird die Absorption dieser Lösung bei 425 nm gegen eine Mischung der Reagenzien ohne Aluminiumchloridreagenz photometrisch bestimmt.

Der Prozentgehalt an Flavonoiden, berechnet als Isoquercitrin, errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m}$$

A= gemessene Absorption bei 425 nm

m= Masse der Droge in Gramm

$$A_{1cm}^{1\%} = 500$$

5.2.2.2 Bestimmung des Gesamtflavonidgehaltes nach DAC

[DAC (2002), MONOGRAPHIE „STIEFMÜTTERCHENBLÜTEN“]

Abweichend von oben angegebener Vorschrift des Europäischen Arzneibuches (5.2.2.1), ist bei der **Gehaltsbestimmung von Siefmütterchenblüten** im DAC noch ein zusätzlicher Arbeitsschritt enthalten. So wird hier nach dem Extraktionsschritt und Auffüllen des acetonischen Extraktes auf 100,0 ml, ein Fünftel (20,0 ml) der Lösung in einem Scheidetrichter mit 40,0 ml Wasser versetzt und 3mal mit je 60 ml Hexan ausgeschüttelt. Die Hexanphasen werden verworfen, die wäßrige Phase wird im folgenden mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Ab hier wird wie unter 5.2.2.1 angegeben verfahren.

5.2.2.3 Extraktherstellung für HPLC-Untersuchung

Genau 1,0 g pulverisierte Droge werden in einem 100 ml Rundkolben mit 40 ml MeOH 50% (V/V) versetzt und 30 min zum Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der überstehende Extrakt in einen 100 ml Meßkolben über einen Glastrichter dekantiert. Der

Drogenrückstand wird erneut mit 40 ml MeOH 50% 15 min zum Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Extrakt inklusive des Drogenbreies in den 100 ml Meßkolben überführt. Unter Nachspülen des Rundkolbens und Trichters wird auf 100,0 ml aufgefüllt.

Der erhaltene Extrakt wird über ein 125 mm Faltenfilter (*Fa. Schleicher & Schüll*, Dassel) in ein Braunglasgefäß filtriert, wobei die ersten 25 ml verworfen werden. Falls der gewonnene Extrakt nicht frei von Schwebstoffen ist, wird dieser über einen Spritzenfilter Rotilabo, Nylon 13 mm, Porenweite 0,45 µm (*Fa. Roth*, Karlsruhe) in das Proben-Vial filtriert, wobei die ersten 0,5 ml des Filtrats verworfen werden.

Der so erhaltene Extrakt wird direkt für die HPLC-Analytik verwendet.

5.2.2.4 HPLC-Bedingungen

a) Verwendet zur Analyse aller Flavonoiddrogen-Extrakte (außer Passionsblumenkraut) bei den Langzeituntersuchungen (long term testing)

Flußrate: 1 ml/min

Eluent A: 10% Acetonitril (v/v) in Phosphorsäure 5 % (v/v),

Eluent B: 90% Acetonitril in Phosphorsäure 5 % (v/v)

Detektionswellenlänge: 340 nm

Säulentemperatur: 30°C ± 1°C

Gradientenverlauf [nach SCHNEIDER-LEUKEL (1994)]:

Zeit [min]	% Phase A	% Phase B	
0	90	10	equilibrieren
0 – 25	87,5	12,5	linear
25 – 45	80	20	linear
45 – 55	74	26	linear
55 – 65	57	43	linear
65 – 70	100	0	linear
70 – 73	100	0	spülen
73 – 80	90	10	equilibrieren

b) Verwendet zur Analyse aller Flavonoiddrogen-Extrakte bei den Streßtests (accelerated testing)

Sonstige Bedingungen wie unter a)

Gradientenverlauf:

<i>Zeit [min]</i>	<i>% Phase A</i>	<i>% Phase B</i>	
0	90	10	equilibrieren
0 - 5	90-87,5	12,5	linear
5 - 25	80	20	linear
25 - 35	57	43	linear
35 - 40	0	100	linear
40 - 45	0	100	spülen
45 - 47	90	10	linear
47 - 52	90	10	equilibrieren

c) Verwendet zur Analyse von Passionsblumekraut-Extrakten bei den Langzeituntersuchungen (long term testing)

Flußrate: 1,2 ml/min

Eluent A: Phosphorsäure 5%

Eluent B: Acetonitril mit 5 ml Phosphorsäure / L

Detektionswellenlänge: 340 nm

Säulentemperatur: 30°C ± 1°C

Gradientenverlauf nach KRENN et al. (1995)

<i>Zeit [min]</i>	<i>% Phase A</i>	<i>% Phase B</i>	
0	84	16	equilibrieren
0 – 12	69,5	30,4	linear
12 – 13	100	0	linear
13 – 17	100	0	spülen
17 – 22	84	16	equilibrieren

5.2.3 Methoden zur Stabilitätsuntersuchung von Gerbstoffen

5.2.3.1 Bestimmung des Gerbstoffgehaltes nach Ph. Eur. 2002

[PH. EUR. (2002) (2) ALLG. METHODEN]

Die entsprechende Menge an gepulverter Droge wird in einem Erlenmeyerkolben mit 150 ml Wasser versetzt, zum Sieden erhitzt und 30 Minuten lang im siedenden Wasserbad belassen. Die auf 20 °C abgekühlte Mischung wird in einen Meßkolben überführt und mit Wasser zu 250 ml ergänzt. Nach dem Absetzen wird die Flüssigkeit durch ein Papierfilter von 125 mm Durchmesser filtriert, wobei die ersten 50 ml des Filtrats verworfen werden. Das erhaltene Filtrat wird als Prüflösung verwendet.

Untersuchungslösung 1: 5 ml Prüflösung werden mit Wasser zu 25,0 ml ergänzt. 2,0 ml dieser Lösung werden mit 1,0 ml Molybdat-Wolframat-Reagenz (Folins Reagenz, Fa. Merck, Darmstadt) sowie 10 ml Wasser versetzt und mit einer Lösung von Natriumcarbonat (290 g/l) zu 25,0 ml ergänzt. Die Absorption der Lösung wird nach 30 Minuten bei 760 nm (A_1) gegen Wasser als Kompensationsflüssigkeit gemessen.

Untersuchungslösung 2: 10,0 ml Prüflösung werden mit 0,10 g Hautpulver CRS (*EDQM, European Pharmacopeia*, Strasbourg (F)) versetzt und 1h kräftig geschüttelt. Nach dem Filtrieren werden 5,0 ml des Filtrats mit Wasser zu 25,0 ml ergänzt. 2,0 ml dieser Lösung werden in einem 25-ml-Meßkolben, wie bei *Untersuchungslösung 1* angegeben, weiterbehandelt. (A_2)

Referenzlösung: 50,0 mg Pyrogallol werden unmittelbar vor der Bestimmung in Wasser zu 100,0 ml gelöst. 5,0 ml dieser Lösung werden mit Wasser zu 100,0 ml ergänzt. 2,0 ml dieser Lösung werden in einem 25-ml-Meßkolben, wie bei Untersuchungslösung 1 angegeben, weiterbehandelt. (A_3)

Der Prozentgehalt an Gerbstoffen berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{(A_1 - A_2) * 6250 * E_1}{A_3 * E_2}$$

A_1 = Absorption der Untersuchungslösung 1

A_2 = Absorption der Untersuchungslösung 2

A_3 = Absorption der Referenzlösung

E_1 = Einwaage Pyrogallol in Gramm

E_2 = Drogeneinwaage in Gramm

5.2.3.2 Bestimmung des Gerbstoffgehaltes nach der Vanillin-Methode

[VEIT (2000)]

Zu 0,5 ml einer Lösung des Analyten (Extrakt) gibt man 3,0 ml einer 4-prozentigen methanolischen Vanillin-Lösung (m/m), mischt kräftig und gibt 1,5 ml konzentrierte Salzsäure zu. Nach dem Mischen und Stehenlassen bei $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ wird die Reaktionslösung nach exakt 15 Minuten bei einer Wellenlänge von 500 nm photometrisch vermessen (A_1). Die Messung erfolgt gegen eine Referenzlösung, die 0,5 ml Wasser statt Extrakt enthält. Zur Korrektur der Eigenabsorption des Extraktes dient eine Reaktionslösung, bei der das Vanillin-Reagenz durch MeOH ersetzt ist (A_2).

Die angegebene Absorption A errechnet sich aus der Differenz der Absorptionswerte A_1-A_2 .

5.2.3.3 Bestimmung des Gerbstoffgehaltes mit dem Tannometer

[PFEUFFER (1999)]

Die Herstellung der Untersuchungslösung gerbstoffhaltiger Drogenextrakte erfolgt durch Heißwasserextraktion nach Vorschrift der Ph. Eur. 2002 (2) (Bestimmung des Gerbstoffgehaltes bei pflanzlichen Drogen siehe 5.2.3.1)

Zur Herstellung der PVP-Lösung werden 0,400g PVP in 1.0 L destilliertem Wasser gelöst (0,04 %). Mit dieser Lösung wird eine Perfusorspritze blasenfrei befüllt.

In einer Küvette (Schichtdicke 2 cm) werden 0,200 ml Drogenextrakt, 3,0 ml Wasser und 0,800 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung pipettiert und gemischt. Nach Einstellen der Küvette in die Meßkammer und Erreichen der eingestellten Temperatur von 25°C erfolgt die automatische Zugabe von PVP mittels einer Perfusorspritze mit einer Geschwindigkeit von 1,8 ml/h. Durch den integrierten Magnetrührer erfolgt sofort eine gute Durchmischung in der Küvette.

Der Verlauf der auftretenden Trübung wird gemessen und über einen angeschlossenen Rechner aufgezeichnet, wobei die Intensität der Trübung in EBC (European Brewing Convention) -Einheiten angegeben wird.

Die Resultate werden in mg PVP / L Probe angegeben, wobei die zudosierte Menge PVP dem relativen Tanningehalt proportional ist.

Der Zeitbedarf der Versuchsdurchführung liegt bei ca. 15 min. (ohne Extrakterstellung)

5.2.3.4 Protein-Präzipitations-assay

[ASQUIT, BUTLER (1985)]

Herstellen einer Lösung von angefärbtem BSA („blue BSA“)

2 g bovines Serumalbumin (BSA) werden in 40 ml 1-prozentiger Natriumbicarbonatlösung gelöst. Nach Zugabe von 150 mg Remazolblau (*Fa. Sigma*, Steinheim) lässt man die Lösung bei Raumtemperatur 30 Minuten auf dem Magnetrührer. Die gefärbte BSA-Lösung wird übernacht bei 4°C gegen Acetatpuffer pH 4,8 (1 Liter) dialysiert. Für die Dialyse wurden Dialysierschläuche für einen Molkulargewichtsbereich von 12000-14000 Dalton verwendet. Das Dialysat wird mit Acetatpuffer zu 1000 ml ergänzt.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Bestimmung der nach der Dialyse vorhandenen Proteinkonzentration an gefärbtem BSA erfolgt nach der Methode von Lowry [LOWRY et al. (1951)]. Es wird eine Kalibriergerade mit ungefärbtem BSA aufgenommen. Hierzu wird eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von annähernd 1 mg/ml hergestellt und deren Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. In einem zweiten Schritt wird eine Kalibriergerade von gefärbtem BSA aufgenommen. Daraus lässt sich die Konzentration von gefärbter BSA-Lösung errechnen.

Protein-Präzipitation durch gerbstoffhaltige Pflanzenextrakte

Zu 4 ml einer Lösung von gefärbtem BSA gibt man in ein verschließbares Polypropylen-Röhrchen 1 ml Pflanzenextrakt. Nach gründlichem Durchmischen wird 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Das entstandene Präzipitat wird bei 4000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand über dem Protein-Tannin-Präzipitat wird vorsichtig abpipettiert und der Niederschlag einmal mit Acetatpuffer gewaschen.

Der gefällte Protein-Gerbstoffkomplex wird in einer Lösung aus 50 g Triethanolamin, 10 g SDS und 200 ml Isopropanol pro Liter wieder aufgelöst. Die Absorption dieser Lösung wird bei 590 nm gegen das verwendete Lösungsmittel gemessen.

Extraktherstellung

1,0 g pulverisierte Droge werden in einem Erlenmeyer-Kolben mit 40 ml demineralisiertem Wasser in siedenden Wasserbad 30 min lang extrahiert. Der Extrakt wird mit Hilfe eines Glastrichters mit dem Drogenmaterial in einen 50 ml Meßkolben überführt und dieser unter nachspülen von Erlenmeyerkolben und Trichter auf 50,0 ml aufgefüllt. Die erkaltete Lösung wird anschließend durch ein Papierfilter von 120 mm Durchmesser (*Schleicher & Schüll*, Dassel) filtriert, wobei die ersten 25 ml des Filtrats verworfen werden.

5.2.3.5 Bestimmung des Gerbstoffgehalts nach der BuOH / HCl – Methode

[WATERMAN, MOLE (1994)]

Herstellung von Butanol Reagenz: 0,7 g Eisen-(II)-sulfat heptahydrat werden in einem 1 l Meßkolben in 50 ml konzentrierter HCl gelöst. Mit n-Butanol wird zu 1 Liter ergänzt.

Durchführung: In einem verschließbaren Reagenzglas wird zu 500 μ l Probenlösung 7 ml Reagenz gegeben und gemischt. Die Reagenzgläser werden 45 min in ein siedendes Wasserbad gestellt, abkühlen lassen und die Absorption der entstandenen Anthocyanidin-Farbstoffe wird bei 550 nm gemessen.

Als Blindlösung für den Nullabgleich des Photometers stellt man eine Eisen-(II)-sulfat – Lösung her, bei der die 50 ml HCl gegen 50 ml Wasser ausgetauscht wurde. Ansonsten verfährt man wie oben beschrieben.

6. Anhang

Auflistung der Rohdaten der Flavonoid-und Gerbstoffbestimmungen nach der Arzneibuchmethodik über die gesamte Lagerdauer

Tab.: F1
Birkenblätter

Ch.: 9108057 Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		5	12	18	24
ga / Pa	1,66	1,34	1,28	1,35	1,40
ga / Ar	1,66	1,52	1,40	1,58	1,48
pu / Pa	1,66	1,61	1,47	1,46	1,37
pu / Ar	1,66	1,50	1,44	1,52	1,43

angegeben ist jeweils der Gesamtflavonoidgehalt in %

Ch.: 9109181	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		6	10	15	21
ga / Pa	1,87		1,35	1,52	1,44
ga / Ar	1,87		1,43	1,60	1,34
ge / Pa	1,87	1,54		1,45	1,41
ge / Ar	1,87	1,61		1,41	1,43
pu / Pa	1,87		1,50	1,50	1,47
pu / Ar	1,87		1,49	1,40	1,30

Ch.: 9106821	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		6	9	15	21
ga / Pa	1,84	1,82		1,42	1,64
ga / Ar	1,84	1,82		1,62	1,56
ge / Pa	1,84		1,58	1,57	1,64
ge / Ar	1,84		1,64	1,53	1,69
pu / Pa	1,84	1,69		1,51	1,60
pu / Ar	1,84	1,67		1,56	1,58

Ch.: 7100442	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)					
		3	10	20	26	33	38
ga / Pa	1,34	1,40	1,69	1,34	1,53	1,42	1,32
ge / Pa	1,34	1,23	1,49	1,40	1,54	1,44	1,34
pu / Pa	1,34	1,24	1,34	1,40	1,12	1,32	1,17
pu / Ar	1,34		1,22		1,12	1,40	1,28

Tab.: F2
Goldrutenkraut

Ch.: 9108919

Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)				
		5	10	18	25	30
ga / Pa	0,74		0,61	0,87	0,65	(1,25)
ga / Ar	0,74		0,52	0,71	0,66	(1,16)
ge / Pa	0,74	0,85	0,65	0,88	0,83	0,87
ge / Ar	0,74	0,83	0,61	0,97	0,85	0,79
pu / Pa	0,74	0,81	0,75	0,75	0,70	0,74
pu / Ar	0,74	0,76	0,72	0,78	0,84	0,77

Ch.: 9103375

	Ausgangswert	12	18	25	31	36
ge / Ar	0,96	1,22	1,09	1,18	1,10	1,28

Ch.: 0101378

	Ausgangswert	7	14	23	28
ge / Pa	1,29	1,17	1,16		1,36
ge / Ar	1,29	1,16	1,16		1,27
pu / Pa	1,29	1,46	1,24	1,23	1,10
pu / Ar	1,29	1,47	1,27	1,19	0,95

Riesengoldrutenkraut

Ch.: 8108375

Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)				
		3	12	18	25	31
ge / Ar	3,28		4,13	4,44	4,39	3,88
pu / Pa	3,28	3,10	3,91	4,14	4,54	3,98
pu / Ar	3,28	3,05	4,24	4,47	4,49	4,02
						3,71

Ch.: 9105210

	Ausgangswert	7	14	21	26
ge / Pa	4,63	3,49	3,88	4,11	4,05
ge / Ar	4,63	3,83	3,74	4,11	4,44
pu / Pa	4,63	4,14	4,08	4,06	4,07
pu / Ar	4,63	4,47	4,00	4,01	4,18

Tab.: F3
Holunderblüten

Ch.: 8102112

	Ausgangswert	3	11	19	26	32	37	Lagerdauer (Monate)
ga / Pa	1,74	1,62	1,92	1,79	1,72	1,64	1,71	
ga / Ar	1,74	1,57	1,97	1,69	1,86	1,87	1,98	
pu / Pa	1,74	1,83	2,02	2,23	2,36	2,33	2,18	
pu / Ar	1,74	1,39	1,98	2,18	2,06	2,15	2,25	

Ch.: 9110584

	Ausgangswert	3	9	15	21	26
ga / Pa	2,01		1,86	2,15	1,56	1,75
ga / Ar	2,01		2,28	2,15	1,48	1,78
pu / Pa	2,01	1,59	1,73	2,28	2,14	2,13
pu / Ar	2,01	1,77	1,79	2,23	2,06	2,04

Ch.: 9211644

	Ausgangswert	7	21	26
ga/Pa	2,36	2,16	2,06	1,80
ga/Ar	2,36	2,20	2,04	1,76
pu/Pa	2,36	2,29	2,39	1,84
pu/Ar	2,36	2,40	2,50	1,70

Tab.: F4
Mädesüßblüten

Ch.: 9211261

Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	9	15	21	26	Lagerdauer (Monate)
ga / Pa	2,60	2,27	2,60	2,57	2,46	
ga / Ar	2,60	2,20	2,68	2,58	2,41	
pu / Pa	2,60	2,70	2,96	2,82	2,55	
pu / Ar	2,60	2,62	3,02	2,91	2,58	

Tab.: F5
Passionsblumenkraut

Ch.: 9202211

Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		5	11	16	23
ge / Pa	0,54		0,37	0,47	0,39
ge / Ar	0,54		0,33	0,50	0,40
pu / Pa	0,54	0,48	0,49	0,45	0,41
pu / Ar	0,54	0,49	0,50	0,43	0,47

Ch.: 0101144

	Ausgangswert	7	14	21	26
ge / Pa	0,78	0,49	0,71	0,61	0,65
ge / Ar	0,78	0,54	0,64	0,69	0,73
pu / Pa	0,78	0,75	0,68	0,73	0,79
pu / Ar	0,78	0,75	0,67	0,71	0,81

Ch.: 0101577

	Ausgangswert	6	9	14	21	26
ge / Pa	0,40	0,21	0,32	0,48	0,39	0,35
ge / Ar	0,40	0,38	0,34	0,34	0,40	0,33
pu / Pa	0,40	0,52	0,35	0,32	0,34	0,38
pu / Ar	0,40	0,43	0,32	0,34	0,34	0,42

Tab.: F6
Ringelblumenblüten

Ch.: 9206996

Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		6	13	19	24
ga / Pa	0,87		0,65	0,75	0,81
ga / Ar	0,87		0,62	0,79	0,84
pu / Pa	0,87	0,77	0,75	0,71	0,88
pu / Ar	0,87	0,88	0,79	0,82	0,83
					1,05

Ch.: 0103771

	Ausgangswert	8		
		16	26	
ga / Pa	0,80	0,75	0,86	0,78
ga / Ar	0,80	0,68	0,85	0,84
pu / Pa	0,80	0,78	0,81	0,78
pu / Ar	0,80	0,72	0,81	0,72

Ch.: 9101938

	Ausgangswert	6				
		9	17	22	27	
pu / Ar	0,76	0,69	0,69	0,74	0,78	0,71

Tab.: F7
Ruhrkrautblüten

Ch.: 9205380

Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		5	11	19	24
ga / Pa	1,13		1,16	1,31	1,26
ga / Ar	1,13		1,19	1,42	1,24
pu / Pa	1,13	1,22	1,20	1,24	1,17
pu / Pa	1,13	1,31	1,18	1,13	1,17
					1,12

Tab.: F8
Stiefmütterchenkraut

Ch.: 9106341

Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		7	14	21	26
ge / Pa	0,40	0,49	0,31	0,43	0,42
ge / Ar	0,40	0,47	0,44	0,53	0,42
pu / Pa	0,40	0,52	0,41	0,53	0,47
pu / Ar	0,40	0,50	0,48	0,55	0,50

Ch.: 8206284

	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		7	15	21	27
ge / Pa	0,30	0,26	0,28	0,23	0,30
ge / Ar	0,30	0,26	0,30	0,25	0,37
pu / Pa	0,30	0,27	0,23	0,27	0,20
pu / Ar	0,30	0,25	0,26	0,32	0,23

Stiefmütterchenblüten

Ch.: 6105497

	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		5	11	17	24
ga / Pa	2,45		2,46	2,43	2,36
ga / Ar	2,45		2,42	2,42	2,39
pu / Pa	2,45	2,44	2,41	2,43	2,33
pu / Ar	2,45	2,46	2,40	2,42	2,39

Tab.: G1
Eichenrinde

Ch.:154286	Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Lagerdauer (Monate)				
		Ausgangswert	5	14	20	28
ge / Pa	3,84	4,14	3,36	6,27	6,08	5,78
ge / Ar	3,84	3,95	3,63	6,05	6,07	6,91
pu / Pa	3,84	3,25	4,24		4,99	5,69
pu / Ar	3,84	3,26	4,26		5,1	5,62

Ch.: 9106031

	Ausgangswert	9	13	22	30
ge / Pa	3,68	4,69	4,68	4,81	5,71
ge / Ar	3,68	4,65	4,77	4,85	4,65
pu / Pa	3,68	3,85	4,82	4,34	6,25
pu / Ar	3,68	3,70	4,83	4,15	4,69

Gerbstoffgehalt in % angegeben

Tab.: G2
Gänsefingerkraut

Ch.: 9111498

Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		8	14	23	30
ge / Pa	1,64		2,43	2,59	2,08
ge / Ar	1,64		2,52	2,48	2,00
pu / Pa	1,64	1,87	2,49	1,81	2,54
pu / Ar	1,64	2,13	2,67	2,04	2,24

Ch.: 0071.60

	Ausgangswert	12	19	27	35
ge / Ar	2,87	2,33	3,57	3,05	3,70
pu / Pa	2,87		3,30	2,71	3,27
pu / Ar	2,87		3,34	3,08	3,31

Ch.: 7203243

	Ausgangswert	13	20	28	35
ge / Ar	1,96	1,59	2,56	1,61	2,15

Tab.: G3
Hamamelisblätter

		Lagerdauer (Monate)					
		Ausgangswert	6	12	18	27	35
Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis							
ge / Pa	3,36	2,45	2,96	3,26	2,99	3,60	
ge / Ar	3,36	2,49	3,08	2,98	3,30	3,65	
pu / Pa	3,36	2,80	1,46	3,64	2,38	3,49	
pu / Ar	3,36	2,32	1,76	3,46	2,48	3,60	

		Ausgangswert	6	13	18	27	36
ge / Pa	3,81	3,54	3,74	3,94	3,78	4,26	
ge / Ar	3,81	3,13	4,09	3,85	4,81	4,41	
pu / Pa	3,81	2,68	3,83	4,58	4,69	4,25	
pu / Ar	3,81	4,14	4,05	4,31	4,50	4,50	

		Ausgangswert	7	13	19	28	36
ga / Pa	4,74	5,95		6,39	6,73	6,78	
pu / Pa	4,74	5,69	5,47	7,09	6,26	4,31	
pu / Ar	4,74	5,21	5,34	7,23	6,84	4,68	

		Ausgangswert	5	20	29	37
ge / Pa	1,59	2,43	2,37	2,07	2,51	
ge / Ar	1,59	2,04	---	---	---	
pu / Pa	1,59	1,95	---	---	---	
pu / Ar	1,59	2,26	---	---	---	

Tab.: G4

Hamamelisrinde

Ch.: 990331

Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		6	12	18	27
pu / Pa	4,19	4,43	3,95	5,15	4,91
pu / Ar	4,19	4,05	4,88	4,41	4,91

Ch.: 9910608

	Ausgangswert	6	12	18	27	35
ge / Pa	4,68	4,58	5,52	5,23	5,97	6,01
ge / Ar	4,68	4,48	5,69	5,79	5,75	6,64
pu / Pa	4,68	5,51	3,68	6,36	5,68	6,25
pu / Ar	4,68	4,16	4,03	5,57	5,62	5,90

Tab.: G5

Odermennigkraut

Ch.: 9101524

Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)			
		4	13	21	30
ge / Ar	2,81	3,00	2,97	4,04	3,99
pu / Pa	2,81	3,50	3,20	3,92	4,21
pu / Ar	2,81	3,11	3,31	3,74	3,95

Tab.: G6
Ratanhiawurzel

Ch.: 9108659 Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)		
		3	13	20
ge / Pa	6,60	6,33	7,94	8,45
ge / Ar	6,60	6,12	7,87	8,84
pu / Pa	6,60	5,99	6,44	7,95
pu / Ar	6,60	6,11	6,46	7,53

Ch.: 9201147	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)				
		5	14	20	28	36
pu / Pa	3,37	5,27	4,65	5,28	5,10	4,99
pu / Ar	3,37	4,62	4,84	4,84	5,03	5,32

Ch.: 9110973	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)		
		8	15	23
ge / Pa	4,52		6,30	7,19
ge / Ar	4,52		6,58	6,88
pu / Pa	4,52	4,61	6,09	6,11
pu / Ar	4,52	4,98	6,18	6,33
				6,44

Tab.: G7
Tormentillwurzelstock

Ch.: 8205930

Zerkleinerungsgrad/ Lagerbehältnis	Ausgangswert	Lagerdauer (Monate)				
		5	13	21	29	36
ge / Pa	8,24	9,09	7,97	9,70	9,74	9,28
ge / Ar	8,24	8,76	7,85	9,44	9,28	9,33
pu / Pa	8,24	8,74	8,18	8,65	8,64	9,84
pu / Ar	8,24	8,31	8,19	8,62	8,52	8,94

Ch.: 140531

	Ausgangswert	4	13	21	30	37
ga / Pa	9,05	10,00	6,42	9,23	---	---
ga / Ar	9,05	9,49	6,75	10,45	---	---
ga / Do	9,05	8,33	7,18	11,45	---	---
ge / Pa	9,05	9,88	8,67	9,97	10,64	11,24
ge / Ar	9,05	10,07	8,07	10,17	10,43	12,29
ge / Do	9,05	9,41	7,29	10,20	9,76	11,11
pu / Pa	9,05	8,56	9,78	10,45	10,05	11,11
pu / Ar	9,05	10,87	9,84	10,19	9,49	11,03
pu / Do	9,05	8,79	9,36	10,66	9,33	10,14

7. Abkürzungsverzeichnis

AB	Arzneibuch
Abb.	Abb.
AMG	Arzneimittelgesetz
APV	Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik
Ar	Aromaschutzbeutel (Verpackung)
ara	Arabinose
AUC	Peakfläche (area under curve)
BAnz	Bundesanzeiger
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BSA	bovines Serum-Albumin
Ch. B.	Chargenbezeichnung
CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products
CRS	Chemische Referenzsubstanz
d	Tage
Da	Dalton
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	Deutscher Arzneimittel Codex
DAD	Diode-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
EMEA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
ESCOP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
et al.	et alteri (und andere)
FE	Flächeneinheiten
g	Gramm
ga	ganz (Schnittgrad)
gal	Galactose
ge	geschnitten (Schnittgrad)
glu	Glucose
GPC	Gelpermeationschromatographie
HMP	herbal medicinal Products
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie, -chromatogramm

Hrsg.	Herausgeber
ICH	International Conference on Harmonization
ID	Innendurchmesser
J.	Journal
kg	Kilogramm
L	Liter
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometrie,- spektrum
mV	Millivolt
n. b.	nicht bestimmt
Pa	Papierbeutel (Verpackung)
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea (europäisches Arzneibuch)
pu	pulverisiert (Schnittgrad)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rha	Rhamnose
RP	reversed phase
rut	Rutinose (L-Rhamno(1→6)-D-Glucose)
S.	Seite
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
sec.	Sekunde
Tab.	Tab.
t _R	Retentionszeit
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolet-Strahlung
v. a.	vor allem

8. Literaturverzeichnis

Achterrath-Tuckermann, U.; Kunde, R.; Flaskamp, E.; Isaac, O.; Thiemer, K.: Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen.

Ahmad, N.; Mukhtar, H.: Green tea polyphenols and cancer: Biological mechanisms and practical implications. *Nutrition Reviews*, Vol. 57 (3), S. 78-83 (1999)

Ammar, N. M.; Al-Okbi, Sahar, J.: *Arch. Pharmacol. Res.* 11, 2, S. 166-168 (1988)

Ammar, N.: *Arch. Pharmacol. Res.* 13, 2, S. 211-213 (1990)

Appel, H.; Govenor, H.; D'Ascenzo, M.; Siska, E.; Schultz, J.: Limitations of Folin assay of foliar phenolics in ecological studies. *J. of Chem. Ecol.* 27 (4), S. 761-777 (2001)

Asquit, T. N.; Butler, L. G.: Use of dye-labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *J. Chem. Ecol.* 11, 1535-1544 (1985)

Bauer, R.; Czygan, F.; Franz, G.; Ihrig, M.; Nahrstedt, A.; Sprecher, E.: Qualitätsansprüche an rational anwendbare Phytopharmaka. *Dt. Apoth. Ztg.* 133 (44), S. 4105-4108 (1993)

Bilia, A. R.; Bergonzi, M. C.; Gallori S.; Mazzi, G.; Vincieri, F. F.: Stability of the constituents of Calendula, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. *J. of Pharm. and Biomed. Analysis* 30, S. 613-624 (2002)

Biyiti, L.; Pesando, D.; Puiseux-Dao, S.: Antimicrobial activity of two flavanones isolated from the cameroonian plant *Erythrina sigmoidea*. *Planta Med.* 54, S. 126-128 (1988)

Böddeker, P.: Untersuchungen zur immunologischen und antitumoralen Aktivität prenylierter und sulfatierter Flavonoide. Dissertation Universität Regensburg (1995)

Bormann, H.; Melzig, M. F.: Inhibition of metallopeptidases by flavonoids and related compounds. *Pharmazie* 55 (2), S. 129-132 (2000)

Boyd, E. M.; Bereczyk, K.; Godi, I.: The acute toxicity of tannic acid administered intragastrically. *Canad. Med. Ass. J.* 92, 1292-1297 (1965)

Brendler, T.; Grünwald, J; Jänicke C. (Hrsg.): HerbCD Datenbank über Arzneipflanzen und deren Anwendung. PhytoPharm Consulting GmbH, Berlin (2000)

Bronner, W. E.; Beecher, G. R.: Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *J. Chromatogr. A* 805, 137-142 (1998)

Bundesanzeiger (**BAnz**) 06.07.1988 (Kommission E)

Bundesanzeiger (**BAnz**) 13.03.1986 (Kommission E)

Bundesanzeiger (**BAnz**) 29.08.1992 (Kommission E)

Bundesanzeiger (**BAnz**): 02.03.1989 (Kommission E)

Bundesanzeiger (**BAnz**): 13.03.1990 (Kommission E)

Bundesanzeiger (**BAnz**): 15.10.1987 (Kommission E)

Butler, L. G.; Price, M. L.; Brotherton, J. E.: Vanillin assay for Proanthocyanidins (condensed tannins): Modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* 30 S. 1087-1089 (1982)

Calderon, P.; Van Buren, J.; Robinson, W. B.: Factors influencing the formation of precipitates and hazes by Gelatin and condensed and hydrolyzable Tannins. *J. Agric. Food Chem.* 16 (3), S. 479-483 (1968)

Capasso, A.; Pinto, A.; Mascolo, N.; Autore, G.; Capasso, F.: Reduction of agonist induced contractions of Guinea-pig isolated ileum by flavonoids. *Phytother. Res.* 5, 2, S. 85-87 (1991)

Castele, K. V.; Geiger, H.; Sumere van, C. F.: Separation of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatography* 240, S. 81-94 (1982)

Chapon, L.: Der Begriff Eiweißempfindlichkeit der Biere. Der heutige Stand der Forschung. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* Teil 1: 48 (9/10), S. 300-309 (1995); Teil 2: 49 (1/2), S. 12-18 (1996 a); Teil 3: 49 (3/4) (1996 b)

Chapon, L.: Der Begriff Tannoide: Prinzip der Bestimmung und Auswertung der Ergebnisse. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 46 (7-8), S. 263-279 (1993),

Cheynier, V.; Doco, T.; Fulcrand, H.; Guyot, S.; Le Roux, E.; Souquet, J. M.; Rigaud, J.; Moutounet, M.: ESI-MS analysis of polyphenolic oligomers and polymers. *Analisis Magazine* 25 (8) S. M32-M37 (1997)

Chibanguza, G.; März, R.; Sterner, W.: Zur Wirksamkeit und Toxizität eines pflanzlichen Sekretolytikums und seiner Einzeldrogen. *Arzneim.-Forsch.* 34, S. 32-36 (1984)

Chodera, A.; Dabrowska, K.; Bobkiewicz-Kozlowska, T.; Tkaczyk, J.; Skrzypczak, L.; Budzianowski, J.: Effect of leiocarposide on experimental urolithiasis in rats. *Acta. Polon. Pharm.*, 46, 181-186 (1988)

Choi, Jae Sue, Yokosawa T.; Oura H.: *J. Nat. Prod.* 54, S.218-224 (1991)

Chu, Y-H.; Chang, C-L.; Hsu, H-F.: Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 80, S. 561-566 (2000)

Clark, W. G.; MacKay, E. M.: The absorption and excretion of rutin and related flavonoid substances. *J. Am. Med. Assoc.* 143, S. 1411-1415 (1950)

CPMP (1) (Committee for proprietary medicinal products): Note for guidance: Stability testing of new drug substances and products (CPMP/QWP/380/95) (1998)

CPMP (2) (Committee for proprietary medicinal products): Note for guidance: Stability testing of existing active substances and related finished products (CPMP/QWP/556/96) (1998)

CPMP (3) (Committee for proprietary medicinal products): Note for guidance on the quality of herbal medicinal products (CPMP/QWP/2819/00) (2001)

Crozier, A.; Jensen, E.; Lean, M. E.J.; McDonald, M. S.: Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. of Chrom. A*, 761, 315-321 (1997)

Csedö, K.: The antibiotic activity of *Filipendula ulmaria*. *Planta Med.* 59, S. 675 (1993)

Czinner, E.; Hagymási, K.; Blázovics, A.; Kéry, A.; Szöke, E.; Lemberkovics, E.: The in vitro effect of *Helichrysi flos* on microsomal lipid peroxidation. *J. of Ethnopharmacology* 77, S.31-35 (2001)

Czinner, E.; Hagymási, K.; Blázovics, A.; Kéry, A.; Szöke, E.; Lemberkovics, E.: In vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *J. of Ethnopharmacology* 73, S. 437-443 (2000)

Daigle, D. J.; Conkerton E. J.: Analysis of flavonoids by HPLC: An Update. *J. of Liquid Chromatography* 11 (2), S. 309-325 (1988)

Dallenbach-Tölke, K.; Nyiredy, S.; Meier, B.; Sticher, O.: HPLC-Analyse der Flavonglykoside aus *Betulae folium* *Planta medica*. S. 189-192 (1987)

Dawra, R. K.; Makkar, H. P. S.; Singh, B.: Protein-Binding capacity of microquantities of tannins. *Analytical Biochem.* 170, S. 50-53 (1988)

Dehmlow, C.; Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells. *Life sciences* 58, S. 1591-1600 (1996)

Della Logia, R.: The role of triterpenoids in the topological anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 60, S. 516-520 (1994)

Deutscher Arzneimittel Codex (**DAC**) 2002, Monographie Stiefmütterchenkraut (S-185)

Deutsches Arzneibuch (**DAB**), Allgemeine Methoden 2.8.N5, Ausgabe 2002

Dingermann, T.; Loew, D.: Phytopharmakologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart S. 175 f. (2003 a)

Donhauser, S.; Glas, K.: Staatliche Brautechnische Prüf- und Versuchsanstalt, Freising-Weihenstephan, unveröffentlichte Untersuchungen

DuPont, M. S.; Mondin, Z.; Williamson, G.; Price, K. R.: Effect of variety, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J. Agric. Food Chem.* 48, S. 3957-3964 (2000)

Erdelmeier, C. A. J.; Cinatl, J.; Rabenau, H.; Doerr, H. W.; Biber, A., Koch, E.: Antiviral and antiphlogistic activities of *Hamamelis virginiana* bark. *Planta Med.* 62, S. 241-245 (1996)

Escarpa, A.; Morales, M. D.; González, M. C.: Analytical performance of commercially available and unavailable phenolic compounds using real samples by HPLC-DAD. *Analytica Chimica Acta* 460, S. 61-72 (2002)

ESCOP-Monographie "Betulae folium" Fascicule 1 (1996)

ESCOP-Monographie „Calendulae flos“ Fascicule 1 (1996)

ESCOP-Monographie "Passiflorae herba" Fascicule 4 (1997)

Escribano-Bailón, T.; Gutiérrez-Fernández, Y.; Rivas-Gonzalo, J.; Santos-Buelga, C.: Charcterization of Procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del País grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 40, S. 1794-1799 (1992)

Felix, W.; Backhans, H.J., Eichler, P.; Hennings, G.: Protective effect of *ruscus* against injury of vascular endothelium and vascular smooth muscle caused by etacrynic acid. *Inter. Angio.* 77, Suppl. 1 (1984)

Ferrández, M. L.; Ramachandrian, N. A. G.; Alcaraz, M. J.: Effect of flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs on arachidonate metabolism in rat peritoneal leukocyte. *Pharmazie* 45, S. 206-208, S. 444-445 (1990)

Feuerstein, U.: Untersuchungen zur Stabilität pflanzlicher und mikrobieller Polysaccharide im Hinblick auf deren Verwendung als Wirk- und Hilfsstoffe in Arzneimitteln. Dissertation Universität Regensburg (1995)

Franz, G.: Untersuchungen über die Schleimpolysaccharide von *Tussilago Farfara* L., *Symphytum Offic.* L., *Borago Offic.* und *Viola tricolor* L. *Planta Med.* 17, S. 217-220 (1969)

Gabor, M.; Engi, Etelka: *Acta Pharm. Hung.* 57, 6, S. 275-282 (1987)

Glasl, H.: Flavonol-O-Glykoside: photometrische Gehaltsbestimmung. *Deutsche Apotheker Zeitung* (43), S. 2147-2152 (1984)

Glasl, H.: Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. *Deutsche Apotheker Zeitung* 123 (42) S. 1979-1987 (1983)

Goldstein, J. L.; Swain, T.: The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* 4, S. 185-192 (1965)

Grimm, W.: Haltbarkeit und Haltbarkeitsprüfung von Arzneimitteln (APV-Richtlinie mit Kommentar). *Pharm. Ind.* 47 (6), S. 627-632 (1985)

Hagerman, A. E.; Rice M. E.; Ritchard N. T.: Mechanisms of protein precipitation for two tannins, Pentagalloyl Glucose and Epicatechin (4→8) Catechin (Procyanidin). *J. Agric. Food Chem.* 46, S. 2590-2595 (1998)

Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. v. Bruchhausen, F.; Ebel, S.; Frahm, A.; Hackenthal, E; Hänsel, R.; Keller, K.; Nürnberg, E; Rimpler, H.; Surmann, P.; Wolf, H.; Wurm, G. (Hrsg.) als CD-Ausgabe HagerROM 2002, Springer Verlag, Heidelberg (2002)

Hammerstone, J. F.; Lazarus, S. A.; Mitchell, A. E.; Rucker, R.; Schmitz, H. H.: Identification of Procyanidins in cacao (*Theobroma cacao*) and chocolate using HPLC/MS. *J. Agric. Food Chem.* 47, S. 490-496 (1999)

- Hanke**, G. in Haltbarkeit von Grundstoffen und Zubereitungen in der Apotheke. Elste, U. (Hrsg.) Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 61-85 (1990)
- Harborne**, J. B. et al. in The Flavonoids: Advances in research since 1986. Harborne, J. B. (Hrsg.), Chapman & Hall, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras (1994)
- Hatano**, T.; Yasuhara, T.; Yoshihara, R.; Agata, I.; Noro, T.; Okuda, T.: Effects of Interaction of tannins with Co-existing substances. VII. Inhibitory effects of tannins and related Polyphenols on Xanthine Oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* 38 (5) S. 1224-1229 (1990)
- Hefendehl**, F. W.; Lander, C.: Qualitätssicherung pflanzlicher Arzneimittel – Anforderungen bei der Zulassung in Hanke, G. (Hrsg.): Qualität pflanzl. Arzneimittel; Wissenschaftl.. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 42 ff. (1984)
- Heilmann**, J.; Merfort, I.: Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden. I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen. *Pharm. i. u. Z.*, 27, Nr.2, S. 58-65 (1998 a)
- Heilmann**, J.; Merfort, I.: Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden. II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharm. i. u. Z.*, 27, Nr. 4, S. 173-183 (1998 b)
- Hemingway**, R. W.: Reactions at the interflavanoid bond of proanthocyanidins in Hemingway, R. W.; Karchesy, J. J.(Hrsg.): Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum Press, New York (1989)
- Hiermann**, A.; Kartnig, T.; Azzam, S.: Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung der Procyanidine in Crataegus. *Sci, Pharm.* 54, S. 331-337 (1986)
- Hiller**, K.; Bader, G.: Goldruten-Kraut. *Z. Phytother.* 17, S. 123-130 (1996)
- Isaac**, O.: Calendula officinalis L. – Die Ringelblume. *Z. Phytother.* 16, 357-370 (1994)
- Isaac**, O.: Die Ringelblume – eine alte Arzneipflanze, neu betrachtet. *Z. Phytother.* 21, 138-142 (2000)
- Jänicke**, C.; Grünwald, J.; Brendler, T.: Handbuch Phytotherapie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2003)
- Jimenez-Ramsay**, L. M.; Rogler, J. C.; Houseley, T. L.; Butler, L. G.; Elkin, R. G.: Absorption and distribution of ¹⁴C-labeled condensed tannins and related sorghum phenolics in chicken. *J. Agric. Food Chem.* 42, S. 963-967 (1994)

Justesen, U.; Knuthsen, P.; Leth, T.: Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by HPLC with photodiode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 799, 101-110 (1998)

Keinänen, M.; Julkunen-Tiitto, R.: High performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *J. of Chrom. A*, 793, 370-377 (1998)

Kiefl, B.: Untersuchungen zur Stabilität von Ätherischöldrogen. Dissertation Universität Regensburg (1998)

Kolkmann, R.: Stabilitätsprüfung von Phytopharmaka. Vortrag BfArM, Bonn (06.05.2002)

Kommanaboyina, B.; Rhodes, C. T.: Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Develop.and Industr. Pharmacy*, 25 (7), S. 857-868 (1999)

Krämer, J.: AM-Stabilität international harmonisieren. *Pharm. Ztg.* 141 (5), S. 388-391 (1996)

Krawczyk, U.; Petri, G.; Kéry, A.: HPLC analysis of Procyanidins in *Crataegus* extract. *Arch. Pharm.* 324, S. 97-99 (1991)

Kreimeyer, J.: Beiträge zur Analytik von Flavan-3-olen und oligomeren Proanthocyanidinen sowie Untersuchungen zur Pharmakologie von Wirkstoff-Fraktionen und einzelnen Procyanidinen aus einem Weißdorn-Trockenextrakt. Dissertation Universität Münster (1997)

Krenn, L.; Kopp, B.; Rahman, K.; Kubelka, W.: Quantitative Bestimmung der Flavonoide mittels HPLC. *Zeitschrift für Phytotherapie* 16, 90-99 (1995)

Labarbe, B.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Souquet, J-M.; Moutounet, M.: Quantitative fractionation of Grape Procyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* 47, S. 2719-2723 (1999)

Lang, F. Wilhelm, E.: Quantitative determination of Proanthocyanidins in *Ginkgo biloba* special extracts. *Pharmazie* 51 (10) S. S. 734-737 (1996)

Lang, F.: Entwurf einer Leitlinie zur Stabilitätsprüfung von Phytopharmaka. Vortrag BfArM, Bonn (06.05.2002)

- Lazarowych**, N.; Pekos, P.: Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: Strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products. *Drug Information J.* 32, S. 497-512 (1998)
- Lazarus**, S. A.; Adamson, G. E.; Hammerstone, J. F.; Schmitz, H. H.: HPLC/MS spectrometry analysis of Proanthocyanidins in foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 47, S. 3693-3701 (1999)
- Leuschner**, J.: Anti inflammatory, spasmolytic and diuretic effects of commercially available *Solidago gigantea* herb extract. *Arzneimittelforschung* 45 (2), 165-168 (1995)
- List**, P. H.; Schmidt, P. C.: Technologie pflanzlicher Arzneizubereitungen, S. 103-119, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1984)
- Loew**, D.; Habs, M.; Klimm, HD.; Trunzler, G.: Phytopharmakareport. 2. Auflage; Steinkopff-Verlag, Darmstadt; S. 1-10 (1999)
- Lowry**, O. H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- Machicao**, F.; Sonnenbichler, J.: Mechanism of stimulation of RNA synthesis in rat liver nuclei by silibinin. *Z. Physiol. Chem* 358, S. 141-147 (1988)
- Maillard**, M.: An antifungal isoflavanone and a structure revision of a flavanone from *Erythrina berteroana*. *Planta Med.* 55, S. 281-282 (1989)
- Maillard**, M.; Gupta, M. P.; Hostettmann, K.: A new antifungal prenylated flavanone from *Erythrina berteroana*. *Planta Med.* 53, S. 563-564 (1987)
- Makkar**, H.; Blümmel, M.; Becker, K.: Formation of complexes between PVP or PEG and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *British J. of Nutrition* 73, S. 897-913 (1995)
- Markant**, A.; Rimbach, G.; Krämer, K.; Mayer, K.; Pallauf, J.: Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. *Pharm. Ztg.* 140 S. 2313-2327 (1995)
- Markham**, K. R.: Methods in plant biochemistry. Vol 1: Plant phenolics. Harborne J. B. (Hrsg.); Academic Press, London, S. 208 (1989)
- Mascolo**, N.; Pinto, A.; Capasso, F.: Flavonoids, leucocyte migration and eicosanoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 4, S. 293 (1988)

Matsuda, H. Chisaka, T.; Kubomura, Y.; Yamahara, J.; Sawada, T.; Fujimura, H.; Kimura, H.: Effects of crude drugs on experimental hypercholesterolemia. I. Tea and its active principles. *J. of Ethnopharmacol.* 17 (3), S. 213-224 (1986)

Mattila, P.; Astola, J.; Kumpulainen, J.: Determination of flavonoids in plant material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array detections. *J. Agric. Food Chem.* 48, S. 5834-5841 (2000)

McRae, K.B.; Lidster, A.J.; DeMarco, A.C.; Dick, A.J.: Comparision of the polyphenol profiles of apple fruit cultivars by correspondence analysis. *J. Sci. Food Agric.* 50, 329-342 (1990)

Meier, B.: *Passiflora incarnata L.* – Passionsblume. *Z. Phytother.* 16, 115-126 (1995 b)

Meier, B.: *Passiflorae herba* – pharmazeutische Qualität. *Z. Phytother.* 16, 90-99 (1995 a)

Melzig, M. F.; Major, H.: Neue Aspekte zum Verständnis des Wirkungsmechanismus der aquarischen Wirkung von Birkenblättern und Goldrutenkraut. *Z. Phytother.* 21, S. 193-196 (2000)

Menghini, A.; Mancini, L. A.: *Pharmacol. Res. Commun.* 20 (Suppl. V) 113-116 (1988)

Mericli, A. H.; Damadyan, B.; Cubukcu, B.: Flavonoids of turkish *Helichrysum arenarium* (L.) MOENCH (Asteraceae). *Sci. Pharm.* 54, S. 363-365 (1986)

Merken, H. M.; Beecher, G. R.: Measurement of food flavonoids by HPLC: A Review. *J. of Agric. Food Chem.* 48 (3), S. 577-599 (2000)

Minami, M.; Kitabayashi, H.; Ujihara, A.: Quantitative analysis of rutin in buckweath (*Fagopyrum sp.*) by HPLC. *J. Fac. Agric. Shinshu University* 34, 91-95, (1998)

Mori, A.; Nishino, C.; Enoki, N.; Tawata, S.: Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulg.* and *Staph. aureaus*. *Phytochem.* 26 (8), S. 2231-2234 (1987)

Mueller-Harvey, I.: Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91, S. 3-20 (2001)

Nagell, A.: Qualitätskontrolle von Phytopharma. Harnischfeger, G. (Herausgeber); Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1985) S.27-30

Niesel, S.: Untersuchungen zum Freisetzungerverhalten und Stabilität ausgewählter wertbestimmender Pflanzeninhaltsstoffe unter besonderer Berücksichtigung moderner phytochemischer Analyseverfahren. Dissertation FU Berlin (1992)

Occhiuto, F.; Circosta, C.; Costa, R.; Briguglio, F.; Tommasini, A.: Plant. Med. Phytother. 20, 1, S. 52-63 (1986)

Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T.: New methods of analyzing tannins. J. of Natural Products 52 (1), S. 1-31 (1989)

Pearce, F. L.; Befus, A.; Bienenstock, J.: Mucosal mast cells. III. Effect of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells. J. of Allergy and Clin. Immunol. 73 (6), S 819-823 (1984)

Pfeuffer : Bedienungsanleitung für das Analysegerät Tannometer®. Pfeuffer GmbH, Kitzingen (1999)

Pharmacopoeia Europaea (**Ph. Eur.**) (1) 2002 , IV. Ausgabe, Monographie Birkenblätter

Pharmacopoeia Europaea (**Ph. Eur.**) (2) 2002, IV. Ausgabe, Allgemeine Methoden Kap. 2.8.14

Pharmacopoeia Europaea (**Ph. Eur.**) (3) 2002, IV. Ausgabe, Allgemeine Methoden Kap. 2.9.12

Pharmacopoeia Europaea (**Ph. Eur.**) (4) 2002 , IV. Ausgabe, Monographie Passionsblumenkraut

Porter, L. J.; Hrstich, L. N.; Chan, B. G.: The conversion of Procyanidins and Prodelfphinidins to Cyanidin and Delphinidin. Phytochemistry 25 (1) S. 223-230 (1986)

Porter, L. J.; Woodruffe, J.: Haemanalysis: The relative astringency of proanthocyanidin polymers. Phytochemistry 23 (6), S. 1255-1256 (1984)

Rehwald, A.; Meier, B.; Sticher, O.: Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L.. Pharm. Act. Helv. 69, 153-158 (1994)

Rehwald, A: Analytical investigations of *Crataegus* sp. and *Passiflora incarnata* L. by high performance liquid chromatography. Dissertation Nr. 10959, ETH Zürich (1995)

Reuter, H. J. et al.: Behandlung von Harnwegsinfektionen mit einem Arzneitee. Therapiewoche 35, S. 1427-1431 (1985)

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J., Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology & Medicine 20 (7), S. 933-956 (1996)

Rimpler, H.: Biogene Arzneistoffe. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart S. 373 f. (1999 a), 387 f. (1999 b), 405 ff. (1999 c)

Rohr, G. E.; Meier, B.; Sticher, O.: Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part I. Diode array and electrochemical detection. Phytochem. Analysis 11, S. 106-112 (2000 a)

Rohr, G. E.; Meier, B.; Sticher, O.: Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of procyanidins in *Crataegus* leaves and flowers. J. of Chrom. A, 835 S. 59-65 (1999 a)

Rohr, G. E.; Riggio, G.; Meier, B.; Sticher, O.: Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part. II. Liquid chromatography – Mass Spectrometry. Phytochem. Analysis 11, S. 113-120 (2000 b)

Rohr, G. E.: Analytical Investigation on and Isolation of Procyanidins from *Crataegus* Leaves and Flowers. Dissertation ETH Zürich (1999 b)

Rote Liste. Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main (Hrsg.), ECV Editio Cantor Verlag, Aulendorf (2003)

Scalbert, A.: Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 30 (12), S. 3875-3883 (1991)

Schilcher, H.: Pflanzliche Diuretika. Urologe B, 27, 215-222 (1987)

Schilcher, H.: Pflanzliche Urologika. Dtsch. Apoth. Ztg. 124, S. 2429-2436 (1984)

Schilcher, H.; Rau, H.: Nachweis der aquaratischen Wirkung von Birkenblätter- und Goldrutenkrautauszügen im Tierversuch. Urologe B, 28, 274-280 (1988)

Schmidt, P. C.; González Ortega, G.: Passionsblumenkraut: Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von *Passiflora herba*. Dt. Apoth. Ztg. 133 (47), S. 4457-4466 (1993)

- Schneider-Leukel, K.**: Untersuchungen zur Flavonoidfreisetzung aus Drogen und Drogenmischungen bei der Teezubereitung. Dissertation Universität Regensburg (1994)
- Schofield, P., Mbugua, D. M., Pell, A. N.**: Analysis of condensed tannins: a review. Animal Feed Science and Technology 91 S. 21-40 (2001)
- Scholz, E.**: Pflanzliche Gerbstoffe - Pharmakologie und Toxikologie. Deutsche Apotheker Zeitung 134 (34) S. 3167-3179 (1994)
- Scholz, E.; Rimpler, H.**: Proanthocyanidins from *Krameria triandra* root. Planta Med. 55, S. 379-384 (1989)
- Schöpke, T.; Hasan Agha, M. I.; Kraft, R.; Otto, A.; Hiller K.**: Hämolytisch aktive Komponenten aus *Viola tricolor* L. und *Viola arvensis* Murr. Sci. Pharm. 61, S. 145-153 (1993)
- Siebert, K. J.**: Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization and analysis. J. Agric. Food. Chem. 47 (2), S. 355-362 (1999)
- Smietana, S.; Schneider, G.; Dingermann, T.**: Screening of drug extracts for potential platelet aggregation-inhibition activities. Arch. Pharm. Med. Chem. 331, S. 13-66 (1999)
- Speroni, E.; Minghetti, A.**: Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. Planta medica 488-491 (1988)
- Spilková, J.; Hubík, J.**: Biologische Wirkungen von Flavonoiden II. Pharm. in unserer Zeit, 21, Nr.4, S. 174-182 (1992)
- Spilková, J.; Hubík, J.**: Biologische Wirkungen von Flavonoiden. Pharm. in unserer Zeit, 17, Nr.1, S. 1-9 (1988)
- Steinegger, E.; Hänsel, R.; Sticher, O.**: Pharmakognosie. 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo; S. 859f. (1999 b); S. 141 f. (1999 a); S. 173 f. (1999 c); S. 187 f. (1999 d) 870 ff. (1999 e) 835 f. (1999 f)
- Steinigen, M.**: Analytik der pflanzlichen Arzneimittel in Hanke, G. (Hrsg.):Qualität pflanzl. Arzneimittel; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 118 ff. (1984)
- Sun, B.; Leandro, C.; Ricardo-da-Silva, J. M.; Spranger, I.**: Separation of grape and wine Proanthocyanidins according to their degree of polymerization. J. Agric. Food Chem. 46, S. 1390-1396 (1998)

Sun, B.; Ricardo-da-Silva, J. M.; Spranger, I.: Critical factors of vanillin assay for Catechins and Proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46, S. 4267-4274 (1998)

Thomas-Barberan, F. A.; Maillard M.; Hostettmann, K.: Antifungal flavonoids from leaf surfaces of *Helichrysum nitens* and from stem bark of *Erythrina berteroana*. *Prog. in Clin. and Biol. Res.* 280, S. 61-65 (1988)

Treutter, D.: Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-Dimethylaminocinnamaldehyde. *J. of Chrom.* 467, S. 185-193 (1989)

Treutter, D.; Santos-Buelga C.; Gutmann, M.; Kolodziej, H.: Identification of flavan-3-ols and procyanidins by HPLC and chemical reaction detection. *J. of Chrom. A* 667 S. 290-297 (1994)

Ubillas, R. et al.: SP-303, an antiviral oligomeric Proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). *Phytomedicine* 1, S. 77-106 (1994)

Veit, M. in Adam, K. P.; Becker, H.(Hrsg.): *Analytik biogener Arzneistoffe*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart S. 441 ff. (2000)

Veit, M.: Note for Guidance on Stability Testing of Existing Herbal Drug Preparations and Related Herbal Medicinal Products. *Pharm. Ind.* 64 Nr. 1, S. 20-23 (2002)

Vennat, B.; Gross, D.; Pourrat, A.; Pourrat, H.: *Hamamelis virginiana*: Identification and assay of Proanthocyanidins, Phenolic Acids and Flavonoids in leaf extracts. *Pharm. Acta Helv.* 67 (1) S. 11-14 (1992)

Vennat, B.; Pourrat, H.; Pouget, M. P.; Gross, D.; Pourrat, A.: Tannins from *Hamamelis virginiana*: Identification of Proanthocyanidins and Hamamelitannin. Quantification in Leaf, Bark and Stem extracts. *Planta Med.* S. 454-457 (1988)

Voigt, R.: *Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf*. 7. Auflage, Ullstein Mosby, Berlin S. 573 ff. (1993)

Wagner, H.: *Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe*. 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 309 f. (1999 a), S. 315 (1999 b) S. 335 ff. (1999 c), S. 202 f. (1999 d), S. 403 f. (1999 e)

Wagner, H.; Rosprim, L.; Düll, P.: Die Flavon-C-glykoside von *Viola tricolor* L. *Z. Naturforschung* 27 b, S. 954-958 (1972)

Wagner, H.; Tittel, G., Bladt, S.: Analyse und Standardisierung von Arzneidrogen und Pytopräparaten durch HPLC und andere chromatographische Verfahren. Dt. Apoth. Ztg. 123 (11) S. 515-521 (1983)

Wang, B. H.; Foo, L. Y.; Polya, G. M.: Differential inhibition of eucaryote protein kinases by condensed tannins. Phytochemistry 43 (2), S. 359-365 (1996)

Waterman, P. G.; Mole, S.: Methods in ecology: Analysis of phenolic plant metabolites. 1st edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford S. 66 ff. (1994 a), S. 104 ff. (1994 b), S. 121 ff. (1994 c)

Westendorf, J.; Vahlensieck, W.: Spasmolytische Einflüsse des pflanzlichen Kombinationspräparates Urol® auf die isolierte Rattenharnblase. Therapiewoche 33, 936-944 (1983)

Wichtl, M. in Hartke, K.; Hartke, H.; Mutschler, E.; Rücker, G.; Wichtl, M. (Hrsg.): Kommentar zur Ph. Eur., Nachtrag 2000, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart Kap. 2.8.14 (2001)

Wichtl, M.: Pflanzliche Ausgangsmaterialien in Hanke, G. (Hrsg.): Qualität pflanzlicher Arzneimittel; Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; S.65 ff. (1984)

Willer, B.: Untersuchungen zur antiasthmatischen Wirkung von *Sambucus nigra*. Dissertation Universität Regensburg (1997)

Williams, V. M.; Porter, L. J.; Hemingway, R. W.: Molecular weight profiles of proanthocyanidin polymers. Phytochemistry 22 (2), S. 569-572 (1983)

Wissinger-Gräfenhahn, U.: Medizinische Aspekte von Ringelblumenblüten-Extrakten zur topischen Anwendung. Z.. Phytother. 21, S. 143-146 (2000)