

Stabilitätsuntersuchungen pflanzlicher Zubereitungen am Beispiel von Baldrian- und Senna-Trockenextrakten



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

vorgelegt von
Martin Goppel
aus Regensburg

2003

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 2001 bis Juli 2003 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie an der Universität Regensburg und wurde während dieser Zeit von der Firma **Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG**, Karlsruhe großzügig finanziell gefördert.

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

Promotionsgesuch eingereicht am: 20.10.2003

Prüfung abgelegt am : 04.12.2003

Prüfungsausschuss:

- Prof. Dr. S. Elz (Vorsitzender)
- Prof. Dr. G. Franz (Erstgutachter)
- Prof. Dr. F. Kees (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* für die Überlassung dieser Arbeit, die umfassende Unterstützung und sein wohlwollendes Interesse am Fortgang der Arbeit. Darüber hinaus danke ich ihm und seiner Frau für lehrreiche Einblicke in ihr Leben neben der Universität als Gourmets und Künstler.

Weiterhin bedanke ich mich bei:

der Firma *Schwabe*, Karlsruhe insbesondere Herrn *Dr. H. Stumpf* und Herrn *Dr. F. Lang*, die an der Initiierung des Forschungsprojektes beteiligt waren, für ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit und deren großzügige materielle Unterstützung

der Firma *PhytoLab*, Vestenbergsgreuth für die zur Verfügung gestellten Einsatzdrogen und Extrakte

der Universität Regensburg für die Gewährung eines Stipendiums nach dem Gesetz zur Förderung des künstlerischen und wissenschaftlichen Nachwuchses

Herrn *Dr. K. Mayer* und seinen Mitarbeitern der zentralen Analytik der Universität Regensburg für die Aufnahme der Massenspektren

Herrn *Dr. T. Burgemeister* und seinen Mitarbeitern der zentralen Analytik der Universität Regensburg für die Aufnahme der NMR-Spektren

Herrn Dr. D. Heigl, meinem HPLC- und Stabilitätslehrmeister, sowie Leidensgenossen am Gerät

Herrn PD. Dr. D. Paper und Herrn Dr. F. Demirci für ihre Hilfsbereitschaft und viele wertvolle Tipps und Tricks, ohne die das Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Pharmazeutische Qualität und Stabilität.....	1
1.1.1.	Rechtliche Grundlagen	1
1.1.2.	Besonderheiten pflanzlicher Arzneimittel in Bezug auf die Stabilitätsprüfung	2
1.1.3.	Stabilität und Haltbarkeit.....	4
1.1.3.1.	Wertmindernde Faktoren und deren Prophylaxe.....	4
1.1.3.2.	Schätzung der Haltbarkeit.....	6
1.2.	Pflanzliche Extrakte	8
1.2.1.	Definition nach Ph. Eur.	8
1.2.2.	Extraktionsmethoden	9
1.2.3.	Droge-Extrakt-Verhältnis	10
1.2.4.	Eingesetzte Hilfsstoffe	11
1.2.5.	Einteilung der Extrakte unter Gesichtspunkten der Qualitätssicherung.....	11
2.	Problemstellung und Zielsetzung.....	14
3.	Praktische Umsetzung	17
3.1.	Design der Stabilitätsuntersuchungen.....	17
3.2.	Stabilität von pulverisierter Baldrianwurzel und Baldrianwurzeltrockenextrakten	19
3.2.1.	Beschreibung der Droge.....	19
3.2.2.	Inhaltsstoffe.....	20
3.2.2.1.	Cyclopentan-Sesquiterpene	20
3.2.2.2.	Valepotriate und Baldrinale.....	21
3.2.2.3.	Alkaloide.....	24
3.2.2.4.	Lignane	25
3.2.2.5.	Ätherische Öle.....	27
3.2.2.6.	Weitere Inhaltsstoffe	28
3.2.3.	Indikationen und Anwendung der Baldriandroge	28
3.2.4.	Charakterisierung des Ausgangsmaterials	30
3.2.4.1.	Entwicklung einer HPLC-Methode	30

3.2.4.2.	Quantitative Unterschiede der wichtigsten Inhaltsstoffe in Baldrian-Droge und Extrakten	33
3.2.4.3.	Pulvereigenschaften des Untersuchungsmaterials	36
3.2.5.	Stabilitätsuntersuchungen: Baldrianwurzel	37
3.2.5.1.	Vorliegende Untersuchungen zur Stabilität von Baldrianwurzel	37
3.2.5.2.	Vorausgehende Untersuchungen	40
3.2.5.3.	Ergebnisse der HPLC Untersuchungen	40
3.2.5.4.	DC-Untersuchungen der Einsatzdroge	46
3.2.5.5.	Ätherisches Öl	49
3.2.5.6.	Aussagen zur Stabilität der Einsatzdroge	50
3.2.6.	Stabilitätsuntersuchungen zu Baldrianwurzelextrakten	51
3.2.6.1.	HPLC Untersuchungen	51
3.2.6.2.	Stabilitätsuntersuchungen an methanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt	51
3.2.6.3.	Stabilitätsuntersuchungen an ethanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt	55
3.2.6.4.	DC-Untersuchungen des methanolischen Baldrianwurzel-Trockenextraktes	61
3.2.6.5.	Aussagen zur Stabilität von Baldrianextrakten	63
3.2.7.	Identifikation der unbekanntenen Inhaltsstoffe	66
3.2.7.1.	Fraktionierung der Baldrianextrakte	66
3.2.7.2.	Identifikation der isolierten Abbauprodukte	68
3.2.7.3.	Identifikation weiterer Inhaltsstoffe	70
3.2.8.	Zusammenfassung und Diskussion	73
3.3.	Stabilität von pulverisierten Sennesblättern und Sennesblättertrockenextrakten	76
3.3.1.	Beschreibung der Droge	76
3.3.2.	Inhaltsstoffe	76
3.3.2.1.	Sennoside	76
3.3.2.2.	Anthrachinone	79
3.3.2.3.	Naphtalenderivate	79
3.3.2.4.	Flavonoide	80
3.3.2.5.	Weitere Inhaltsstoffe	80
3.3.3.	Indikationen und Anwendung	81
3.3.4.	Charakterisierung des Ausgangsmaterials	83
3.3.4.1.	Gehaltsverteilung der Inhaltsstoffe (Droge und Extrakte)	83
3.3.4.2.	Pulvereigenschaften	87
3.3.5.	Stabilitätsuntersuchungen zu pulverisierten Sennesblättern	87
3.3.5.1.	Vorhandene Untersuchungen zur Stabilität von Sennesdrogen	87

3.3.5.2.	Vorausgehende Untersuchung	89
3.3.5.3.	HPLC Untersuchungen.....	90
3.3.5.4.	DC-Untersuchungen.....	95
3.3.5.5.	Aussagen zur Stabilität der Einsatzdroge	97
3.3.6.	Stabilitätsuntersuchungen an Sennesblätter-Trockenextrakten	98
3.3.6.1.	HPLC Untersuchungen.....	98
3.3.6.2.	DC-Untersuchungen der Sennesblätterextrakte	103
3.3.6.3.	Aussagen zur Stabilität von Sennesblätterextrakten.....	105
3.3.7.	Zusammenfassung und Diskussion	108
3.4.	Stabilität von pulverisierten Sennesfrüchten und Sennesfrüchtetrockenextrakten	110
3.4.1.	Beschreibung der Droge	110
3.4.2.	Inhaltsstoffe	110
3.4.3.	Indikationen und Anwendung	111
3.4.4.	Charakterisierung des Ausgangsmaterials.....	112
3.4.4.1.	Gehaltsverteilung der Inhaltsstoffe (Droge und Extrakte).....	112
3.4.4.2.	Pulvereigenschaften der pulverisierten Einsatzdroge und des Extraktes	115
3.4.5.	Stabilitätsuntersuchungen zu pulverisierten Sennesfrüchten	115
3.4.5.1.	HPLC Untersuchungen	115
3.4.5.2.	Aussagen zur Stabilität der Einsatzdroge.....	118
3.4.6.	Stabilitätsuntersuchungen an Sennesfrüchte-Trockenextrakten	118
3.4.6.1.	HPLC Untersuchungen	118
3.4.6.2.	Aussagen zur Stabilität der Sennesfrüchteextrakte	122
3.4.7.	Zusammenfassung und Diskussion	125
3.4.8.	Identifikation nicht identifizierter Inhaltsstoffe des HPLC-fingerprints	126
3.4.8.1.	Fraktionierung des Sennesblätterextraktes	126
3.4.8.2.	Herstellung von Fraktionen aus Sennesfrüchten.....	127
3.4.8.3.	Strukturaufklärung der isolierten Inhaltsstoffe	127
3.5.	Besondere Stabilitätsprobleme bei Trockenextrakten.....	129
3.5.1.	Problemstellung.....	129
3.5.2.	Sensorische Veränderungen	129
3.5.3.	Veränderungen der Pulvereigenschaften.....	134
3.5.3.1.	Trocknungsverlust.....	134
3.5.3.2.	Korngrößenverteilung.....	139
3.5.4.	Veränderungen im Freisetzungverhalten	144
3.5.5.	Zusammenfassung und Diskussion	148

4. Zusammenfassung der Ergebnisse	150
5. Materialien und Methoden.....	154
5.1. Untersuchungsmaterial	154
5.1.1. Sennesdrogen und – extrakte.....	154
5.1.2. Baldriandrogen und – extrakte.....	154
5.1.3. Verpackungsmaterial.....	155
5.2. Geräte.....	155
5.3. Lösungsmittel und Reagenzien	157
5.4. Allgemeine Arbeitsmethoden	157
5.4.1. Lagerbedingungen.....	157
5.4.1.1. 25°C/60% rF	157
5.4.1.2. 30°C/60% rF bzw. 40°C/75% rF.....	158
5.4.2. Zerkleinerung des Drogenmaterials	159
5.4.3. Extrakterstellung	159
5.4.3.1. Nativer ethanolischer Sennesblätterextrakt.....	159
5.4.3.2. Nativer Sennesfrüchteextrakt.....	159
5.4.3.3. Native Baldrianextrakte	159
5.4.4. Probenvorbereitung	160
5.4.4.1. Sennesblätter, -früchte und -extrakte	160
5.4.4.2. Baldrianwurzel und -extrakte.....	160
5.5. Analytische Methoden.....	161
5.5.1. Bestimmung des Trocknungsverlustes	161
5.5.2. Bestimmung der Korngrößenverteilung.....	161
5.5.3. Bestimmung des Freisetzungsverhaltens.....	161
5.5.4. HPLC-Methoden	162
5.5.4.1. Gradient 1 zur Trennung von mittel- und unpolaren Baldrianinhaltsstoffen	162
5.5.4.2. Isokratische HPLC-Methode zur Analytik von Fraktion H1	163
5.5.4.3. Isokratische HPLC-Methode zur Bestimmung der Valerensäuren (nach FREYTAG (1983))	164
5.5.4.4. Gradient 2 zur Trennung der Sennesproben (nach MEILHAMMER (2003))....	164
5.5.5. Dünnschichtchromatographie.....	165
5.5.5.1. DC-Untersuchung von Baldrianproben auf Valerensäuren.....	165

5.5.5.2.	DC-Untersuchung von Baldrianproben auf Aminosäuren.....	166
5.5.5.3.	DC-Untersuchungen von Baldrianproben auf Lignane	166
5.5.5.4.	DC-Untersuchungen von Sennesproben.....	167
5.5.6.	Bestimmung des Ätherischölgehaltes	167
5.6.	Präparative Methoden	168
5.6.1.	Isolierung von Lignanen aus Baldrianwurzel	168
5.6.1.1.	Herstellung von Fraktionen verschiedener Polarität	168
5.6.1.2.	Isolation von Lignanen und Valerensäuren mittels Säulenchromatographie.....	168
5.6.2.	Isolation von Inhaltsstoffen aus Sennesdrogen.....	169
5.6.2.1.	Vorextraktion zur Isolation von Tinnevellinglykosid aus Sennesfrüchten.....	169
5.6.2.2.	Vorextraktion zur Isolation von Flavonglykosiden aus Sennesblätterextrakt.....	170
5.6.2.3.	Isolation von Tinnevellinglykosid und Flavonglykosiden aus Sennesdrogen	170
6.	Anhang.....	171
6.1.	¹H-NMR-Spektren.....	171
6.1.1.	Pinoresinol-4,4'-di-O-β-glykosid.....	171
6.1.2.	Pinoresinol.....	171
6.2.	MS-Spektren	172
6.2.1.	Hydroxyvalerensäure	172
6.2.2.	Acetoxyvalerensäure	172
6.2.3.	Pinoresinol.....	173
6.2.4.	Hydroxypinoresinol (LC-MS).....	174
6.2.5.	Pinoresinol-O-diglykosid	175
6.2.6.	Isorhamnetin-gentiobiosid.....	175
6.2.7.	Kämpferol-gentiobiosid	176
6.2.8.	Quercetin-gentiobiosid.....	176
6.2.9.	Tinnevellin-glykosid	177
6.3.	Dokumentation konstanter Klimabedingungen.....	178
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	179
8.	Literaturverzeichnis.....	181

1. Einleitung

1.1. Pharmazeutische Qualität und Stabilität

1.1.1. Rechtliche Grundlagen

Vorraussetzungen für die Zulassung eines Arzneimittels ist nach § 22 des Arzneimittelgesetz [AMG (1998)], neben dem Nachweis der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der Nachweis gleichbleibender Qualität. Einer der wichtigsten Parameter für die Qualität ist die Gewährleistung chemischer, physikalischer und mikrobieller Stabilität über den vom Hersteller angegebenen Haltbarkeitszeitraum. Zu diesem Zweck müssen die verschiedenen Arzneimitteleigenschaften analysiert, und deren Konstanz innerhalb definierter Toleranzgrenzen über den vorgegebenen Zeitraum bewiesen werden. Wichtigstes Regelwerk, das die Zulassungsvoraussetzungen für Arzneimittel innerhalb Europas enthält, sind in diesem Zusammenhang die Richtlinien der International Conference on Harmonization (ICH). Diese lösten 1998 die bisher gültigen EU-Richtlinien ab. Darin sind die wichtigsten Voraussetzungen für die Zulassung innerhalb der europäischen Union, Japans und den Vereinigten Staaten international harmonisiert worden. Mit diesen Ländern sind 85% des Weltarzneimittelmarktes abgedeckt, so dass eine Vereinfachung der Zulassung im Rahmen der Globalisierung möglich wurde. Der Vorteil der Aufweitung des Zulassungsraumes hatte allerdings einen Mehraufwand an Untersuchungen für die Hersteller zur Folge [KRÄMER (1996)].

Stabilitätsprüfungen müssen für sämtliche Stufen der Arzneimittelherstellung durchgeführt werden. Das beinhaltet die nachzuweisende Stabilität des reinen Arzneistoffes, der Präformulierungen, der klinischen Prüfpräparate und des Fertigproduktes. Auch Pflanzenextrakte müssen daher als Zwischenstufe zur fertigen Arzneiform auf ihre Stabilität hin untersucht werden. Mittels geeigneter Analytik müssen die Prüfpräparate auf Veränderungen im Wirkstoffgehalt oder auf eventuelle Zunahme von Abbauprodukten und Verunreinigungen hin untersucht werden. Die Proben müssen dabei so gelagert werden, dass sie der entsprechenden Klimazone, für die die Laufzeit bestimmt wird, gerecht werden. Die oben genannten ICH-Partner sind alle den Klimazonen I (gemäßigtes Klima) und II (subtropisches und mediterranes Klima) zuzuordnen. Um die Marktfähigkeit und die angemessene Lagerfähigkeit für alle beteiligten Länder zu ermöglichen müssen alle Arzneimittel als geeignet für die ungünstigeren Bedingungen der Klimazone II entwickelt werden. Dies entspricht Bedingungen mit einer Temperatur von 25°C und 60% relativer Luftfeuchte. Neben der Einlagerung als Langzeitprüfmuster unter diesen Bedingungen werden gleichzeitig beschleunigte Stabilitätstests unter Stressbedingungen durchgeführt, um mögliche Abbaureaktionen nachvollziehen zu können. Ziel der Stabilitätstests soll es sein, eine möglichst genaue Einschätzung der Effek-

te von Verpackung, Verschluss, Dosierung, Charge, Temperatur, Feuchte, pH-Wert und Licht auf Zerfallsprozesse zu bekommen [HOLZ et al. (2001)].

1.1.2. Besonderheiten pflanzlicher Arzneimittel in Bezug auf die Stabilitätsprüfung

Pflanzliche Arzneimittel im Sinne der rationalen Therapie werden als vollwertige Arzneimittel betrachtet. Insofern gelten auch in diesem Fall die gleichen rechtlichen Anforderungen hinsichtlich Wirksamkeit und Unbedenklichkeit wie für chemisch-definierte Substanzen [CPMP (2001)]. Dennoch bestehen naturgemäß wesentliche Unterschiede in der Zusammensetzung beider Arzneiformen. Während bei chemisch-definierten Substanzen meist Einzelsubstanzen oder die Kombination weniger Stoffe betrachtet wird, handelt es sich bei pflanzlichen Arzneimitteln um hochkomplexe Vielstoffgemische mit Hunderten von Inhaltsstoffen. Daher ist zur Aufrechterhaltung der qualitativen Ansprüche an das resultierende Arzneimittel ein wesentlich größerer analytischer Aufwand erforderlich [GAEDCKE (2000)].

Nach der „note for guidance on quality of herbal medicinal products“ CPMP (2001) wird die Droge oder die Drogenzubereitung als Ganzes, als die zu untersuchende aktive Substanz angesehen. Die Anforderungen hinsichtlich der Stabilitätskontrolle müssen demnach den entsprechenden „guidelines“ für neue aktive Substanzen und Fertigpräparate oder für existierende aktive Substanzen und Fertigpräparaten entsprechen [CPMP (1998)]. Allerdings weist bereits die Präambel dieser „guideline“ daraufhin, dass ihre Anwendung eigentlich nicht für biologisch oder biotechnologisch hergestellte Arzneimittel gedacht war, und es ist offensichtlich, dass in der guideline den Besonderheiten pflanzlicher Arzneimittel nicht Rechnung getragen wurde.

Quantitative Untersuchungen des Gehaltes wirksamkeitsbestimmender Inhaltsstoffe müssen nach diesen Vorschriften für pflanzliche Fertigarzneimittel sicherstellen, dass über den vorgeschlagenen Haltbarkeitszeitraum bei definierten Lagerbedingungen Gehaltsveränderungen von $\pm 5\%$ gegenüber dem Ausgangswert nicht stattfinden. Wenn keine definierten Wirkstoffe vorhanden sind, kann eine Abweichung von $\pm 10\%$ vom Ausgangswert von Leitsubstanzen akzeptiert werden [CPMP (2001)]. Als weitere „significant changes“ sind in der guideline Veränderung im pH-Wert, der Löslichkeit und des Erscheinungsbildes genannt, die zu einem Versagen der Zulassung führen würden. Da die Leitlinie allerdings nur anleitenden Charakter besitzt, sind bei entsprechender Begründung allerdings auch weitere Abweichungen von den Vorschriften erlaubt. Eine alleinige Untersuchung des Verhaltens der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe ist allerdings für pflanzliche Zubereitungen nicht ausreichend. Vielmehr muss gleichfalls durch entsprechende Fingerprint-Verfahren die Stabilität anderer nachgewiesener Inhaltsstoffe dokumentiert werden. Eine Zunahme von Degradati-

onsprodukten muss dabei ausgeschlossen werden. Realistisch betrachtet können aber selbst durch Benutzung mehrerer unterschiedlicher Fingerprint-Methoden nur Bruchteile des Inhaltsstoffspektrums überwacht werden. Von der Stabilität einiger weniger Inhaltsstoffe wird auf die Stabilität der ganzen pflanzlichen Zubereitung geschlossen. Dieses *pars pro toto* Prinzip lässt für pflanzliche Arzneimittel einige Aspekte der Stabilitätsprüfung, wie z.B. das accelerated testing in Frage stellen [GRIMM (1985)]. Vor diesem Hintergrund wird daher nach Methoden gesucht, die eine „ganzheitliche“ Betrachtung eines Extraktes ermöglichen. Ein Beispiel hierfür ist die NMR-Spektroskopie, bei der es möglich ist, für ungetrennte Extrakte einen Fingerprint zu erstellen. Erste Erfolge sind für die Charakterisierung von ätherischen Ölen [CASANOVA et al. (2000)], Harzen [REZZI et al. (2002)] mittels ^{13}C -NMR, sowie mit zweidimensionalen Methoden für Arnikaextrakt [BILIA et al. (2002a)] und Kava-kavaextrakt [BILIA et al.(2002b)] publiziert. Dass sich diese Methode unter Umständen auch für die Stabilitätskontrolle eignet, zeigten BILIA et.al. (2001) an einem Johanniskrautextrakt.

Für Drogenausgangsmaterial oder Drogenzubereitungen, wie z.B. Trockenextrakte, sind als Bezugsgrößen für Stabilitätsuntersuchungen die Spezifikationsparameter ausschlaggebend. Diese müssen vom Hersteller selbst nach einer weiteren guideline [CPMP (2001b)] erarbeitet werden und stellen nach Billigung der zulassenden Behörde die Akzeptanzkriterien für die Qualitätskontrolle dar. Diese Parameter umfassen sowohl physikalische als auch chemische Wertangaben, die durch validierte Methoden ermittelt werden müssen. Auch für diese Parameter müssen Haltbarkeitswerte angegeben sein, die für die Stabilitätsprüfung maßgeblich sind. Durch ihre Einhaltung soll die Reproduzierbarkeit des Inhaltsstoffspektrums garantiert werden [GAEDCKE (2000)].

Die steigenden Anforderungen bei der Zulassung von Phytompharmaka in Bezug auf die Stabilitätsanalytik und der damit verbundene hohe zeitliche, logistische und analytische Aufwand haben die Expertengruppe der Forschungsvereinigung der Arzneimittelhersteller (FAH e.V.) bewogen, einen Vorschlag für eine angepasste guideline zu veröffentlichen [FAH (2002)], die die Besonderheiten pflanzlicher Arzneimittel berücksichtigt. Bedingt durch die komplexe Zusammensetzung der Zubereitungen soll demnach unter anderem bei der Auswertung der Analysendaten eine höhere analytische Variabilität gewährt werden. Solange alle ermittelten Werte über die Zeit innerhalb der erlaubten Grenzen liegen, soll auf weitere statistische Auswertung verzichtet werden. Da nur in Ausnahmefällen die bei einem accelerated testing möglicherweise auftretenden Abbauprodukte vollkommen geklärt werden können, soll die strukturelle Identifikation von Abbauprodukten entfallen. Wenn bereits validierte Daten von zwei Chargen aus dem accelerated testing vorliegen, soll auf eine weitere Einlagerung bei diesen Bedingungen vollständig verzichtet werden.

1.1.3. Stabilität und Haltbarkeit

1.1.3.1. Wertmindernde Faktoren und deren Prophylaxe

Für die Veränderungen in der Zusammensetzung einer Arzneizubereitung nennt LEUENBERGER (2002) multiple Einflussgrößen, die sich in „innere“ und „äußere Faktoren“ gliedern lassen. Die äußeren Einflüsse rühren unter anderem von Reaktanden wie dem Luftsauerstoff, Kohlendioxid, Luftfeuchte, Licht und Wärme, sowie katalytisch wirkenden Schwermetallionen oder Enzymen her. Daneben beeinflussen die inneren, d.h. zubereitungsbedingte Faktoren wie Hilfsstoffe, Lösungsart, H^+ - und OH^- -Ionen oder Puffersubstanzen ebenfalls das Verhalten der Inhaltsstoffe. Diese Parameter können im Zusammenspiel zu diversen Effekten innerhalb der Zubereitung führen. Die häufigsten chemischen Veränderungen können durch:

1. Hydrolysen
2. Oxidative Zersetzung
3. Racemisierung
4. Decarboxylierung
5. Substitutionsreaktionen
6. Polymerisationsreaktionen

hervorgerufen werden.

Zusätzlich sind in Vielstoffgemischen, wie z.B. pflanzlichen Extrakten Interaktionen zu erwarten [GRIMM (1993)]. Für die Wirkstoffe aus pflanzlichen Zubereitungen kommt den Punkten Hydrolyse bzw. oxidative Zersetzung in diesem Zusammenhang die größte Bedeutung zu. Ester, Lactone, Epoxide oder Acetale zählen zu Strukturmerkmalen vieler Pflanzeninhaltsstoffe, die nach BAUER et al. (1999a) gegenüber einer hydrolytischen Zersetzung gefährdet sind. Bei festen Zubereitungen wie beispielsweise den Trockenextrakten ist die Hydrolysegeschwindigkeit dabei vom Wassergehalt, der Temperatur, von der Wasseradsorptionsgeschwindigkeit und der Adsorptionsisotherme der jeweiligen Substanzen abhängig. In den adsorbierten Wasserschichten muss es dabei zunächst zu einer Auflösung des Wirkstoffes kommen, bevor Abbauprozesse ablaufen [LEUENBERGER (2002)]. Neben hydrolyseempfindlichen Substanzen kommen im pflanzlichen Inhaltsstoffspektrum zahlreiche Olefine, Ether und Amine vor, die als empfindlich gegenüber einer oxydativen Zersetzung beschrieben werden [BAUER et al. (1999a)]. Der als Autoxidation bezeichneten spontanen Reaktion mit molekularem Sauerstoff kommt dabei sicherlich die größte Bedeutung zu. Daneben sind als Auslöser zusätzlich die Lichtenergie, Schwermetallionen und erhöhte Temperatur zu nennen [LEUENBERGER (2002)]. Die weiteren aufgeführten chemischen

Reaktionen spielen in der Regel eine untergeordnete Rolle. Für pflanzliche Inhaltsstoffe sind Polymerisationsreaktionen als Sekundärreaktionen von Hydrolyse und Autoxidation, und als verantwortlich für die Entstehung gefärbter Produkte beschrieben [VOIGT (2000a)]. Als Beispiel für eine Polymerisation pflanzlicher Inhaltsstoffe sei die Bildung von Belladonnin in *Atropa belladonna* oder die Polymerisation der Catechine genannt [TEUSCHER (1990)]. Die sterischen Umlagerungen können auf die gleichen äußeren Einflüsse wie die Hydrolysen zurückgeführt werden. Für die Racemisierung von Pflanzeninhaltsstoffen sind als Beispiel die Konformationsänderungen von *L*-Epinephrin, *L*-Hyoscyamin und *L*-Cocain zu nennen [VOIGT (2000a)]. Photochemische Veränderungen finden sich beispielsweise bei Menthon oder Campher als Inhaltsstoffe ätherischer Öle [GRIMM (1985)].

Neben der chemischen Instabilität spielen auch physikalische Arzneimittelinstabilitäten eine große Rolle. Sie können in Form von Veränderung des Aussehens und der Beschaffenheit, oder wichtiger Parameter wie Zerfallszeit von Tabletten und Freisetzung aus der Arzneiform vorliegen. Für pflanzliche Trockenextrakte ist als wichtigster Einflussfaktor sicherlich die Sorption von Wasserdampf zu nennen, die in Extremfällen zu Verflüssigung und Verklebung der Zubereitung führt [BAUER et al. (1999a)]. In vielen Fällen geht der physikalischen Veränderung eine chemische Veränderung voraus. Mechanismen und kinetische Gesetzmäßigkeiten sind bei dieser Art der Veränderung zu komplex, als dass für heterogene Gemische wie z.B. Trockenextrakte Vorhersagen zur Haltbarkeit gemacht werden können [LEUENBERGER (2002)].

Zur Minderung oder Prophylaxe der chemischen Instabilitäten stehen eine Reihe stabilisierender Maßnahmen zur Verfügung. Eine Verringerung des hydrolytischen Abbaus kann durch Reduktion des Einflusses von Feuchtigkeit und Temperatur, durch geeignete Lagerung und dichte Verpackung erreicht werden. Bei flüssigen Zubereitungen ist auf die Einstellung eines für Hydrolysen ungünstigen pH-Wertes zu achten. Gleiches gilt zur Vermeidung der oxidativen Prozesse. Zusätzlich kann hier durch Zusatz von Komplexbildnern und Antioxidantien, sowie durch Ausschluss des Luftsauerstoffes mittels Begasung mit Inertgasen eine Stabilisierung erreicht werden [ESSIG et al. (1986)].

Wertminderungen durch enzymatischen Abbau spielen bei der Trocknung und Lagerung von Pflanzenmaterial ebenfalls eine große Rolle. Nach VOIGT (2000a) existieren einige Prinzipien um, die Drogenmaterialien vor dieser Instabilität zu schützen: Die Entfernung von Restwasser oder die Zugabe von wasserbindenden Substanzen wie Saccharose, das Ausfällen der Enzyme mit Ammoniumsulfat und Änderungen im pH-Wert führen zur reversiblen Inaktivierung. Irreversible Enzymschädigungen gelingen durch Erhitzen über 60°C, Denaturierung mit Ethanol oder den Zusatz von Enzyminhibitoren.

Auch mikrobiologische Veränderungen sind besonders beim Einsatz von Pflanzenmaterial problematisch. Dabei sind neben der Ausgangskeimzahl die klimatischen Lagerungsbedingungen ausschlaggebend. Bei GERHARDT (1990) findet sich als Grenzwert für die Begünstigung ein vermehrtes Wachstum von Bakterien und Pilzen ab 75% relativer Luftfeuchte. Ein Wassergehalt von 12-20% der Zubereitung reicht laut VOIGT (2000a) für das Überleben von Mikroorganismen aus. Diese können neben Veränderungen im Erscheinungsbild auch für Veränderungen der Inhaltsstoffe verantwortlich sein. Dem mikrobiellen Befall ist daher durch keimreduzierende Maßnahmen und adäquate Konservierung der Zubereitung vorzubeugen. Da die Herstellung von Trockenextrakten meist mit Alkohol-Wasser-Mischungen erfolgt, ist durch das Herstellungsverfahren bei Extrakten bereits eine Keimreduktion zu erwarten. Daneben wird als zusätzliche entkeimende Maßnahme die Uperisation durchgeführt [GAEDCKE (2000)].

Die obige Zusammenfassung zeigt, wie multifaktoriell Instabilitäten bedingt sein können. Die Reaktionsmechanismen chemischer und physikalischer Instabilitäten von Reinstoffen gehorchen dabei in der Regel einfacheren Gesetzmäßigkeiten als von Gemischen aus Feststoffen [LEUENBERGER (2002)], wie es bei Pflanzenextrakten der Fall ist.

1.1.3.2. Schätzung der Haltbarkeit

Die Kinetik obiger Reaktionen kann in der Regel ermittelt und somit durch statistische Auswertung eine Haltbarkeitsdauer angegeben werden. Eine mathematische Grundlage stellt dabei die Arrhenius Beziehung dar. Nach der Gleichung von Arrhenius $K = A e^{-E_a/RT}$ führt nach Van 't Hoff eine Anhebung der Temperatur um 10°C zu einer Verdoppelung bis Ver vierfachung der Reaktionsgeschwindigkeit [VOIGT (2000)]. Wenn für verschiedene Temperaturen die Geschwindigkeitskonstante K ermittelt wird und logarithmisch und gegen $1/T$ [K] aufgetragen wird, kann aus der resultierenden Gerade die Geschwindigkeitskonstante für beliebige Temperaturen abgelesen werden. Wichtig dabei ist aber die Kenntnis der Reaktionskinetik. Die meisten Abbaureaktionen folgen unter Idealbedingungen einer Kinetik 1. Ordnung, welche einen exponentiellen Verlauf beschreibt. Dabei besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen umgesetzter Substanz und der Restmenge an Substanz pro Zeiteinheit. Die Folge ist eine heftige Degradation zu Beginn, die mit abnehmender Konzentration der Substanz verlangsamt wird. Demgegenüber steht die Kinetik 0. Ordnung, die einen linearen Verlauf zeigt. Das bedeutet, dass pro Zeiteinheit immer die gleichen Substanzmengen umgesetzt werden, unabhängig von der Konzentration der Substanz. Die Reaktionsgeschwindigkeit bleibt in diesem Fall konstant [BAUER et al. (1999b)]. Beide Reaktionstypen können bei der Beobachtung der Degradation von Arzneimitteln nachgewiesen werden, wobei der Verlauf von den Reaktionsbedingungen abhängt. Neben dem bereits erwähnten Einfluss der Temperatur hat dabei die relative Feuchtigkeit nach CARSTENSEN (1995) den

größten Effekt auf die Degradation und physikalische Veränderungen. Ab einem definierten kritischen Wassergehalt nimmt die Steigung der Degradationskinetiken linear zu. Wie die Degradation letztendlich vonstatten geht, hängt von der Wasseradsorption und der daraus resultierenden Oberflächenfeuchtigkeit der Substanzpartikel ab. Nach WELLS (1988) ändert sich die Kinetik von einer Kinetik 1. Ordnung während der Degradation der gelösten Partikel an der feuchten Oberfläche hin zu einer linearen Kinetik, da das Eindringen des Feuchtigkeitsfilms in das Innere eines Partikels der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird. Die graphische Darstellung einer solchen Entwicklung zeigt anfangs einen starken Abfall der dann in einen flacheren linearen Verlauf übergeht. Die Ermittlung der Sorptionsisothermen des Stoffes als Maß für die Hygroskopizität ist nach CARSTENSEN (1988) daher ein wichtiger Stabilitätsparameter. Mit ihrer Kenntnis können Trocknungsmittel ausgewählt werden, die nach dem Vergleich mit deren Sorptionsisothermen eine wesentlich höhere Wasseraufnahme für die Lagerbedingungen aufweisen. Dadurch wird zunächst von diesen alle vorhandene Feuchtigkeit aufgenommen, bevor die Arzneizubereitung in Mitleidenschaft gezogen wird, was zu erheblicher Verlängerung der Haltbarkeit führt.

Mit Kenntnis der Ordnung der Kinetik und der Geschwindigkeitskonstanten nach Extrapolation kann die Haltbarkeit der Zubereitung oder des Arzneistoffes angegeben werden. Sie wird in der Regel mit der Zeit bis zum Abfall der Ausgangskonzentration auf 95% des Initialwertes angegeben. Die Haltbarkeit muss sich dabei immer auf konkrete klimatische Bedingungen beziehen [GRIMM (1993)], da, wie bereits ausgeführt, die Intensität von Abbauprozessen von diesen anhängt. Unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen bei der statistischen Auswertung kann die Haltbarkeit auch als Zeitintervall angegeben sein. Die ICH-guideline schreibt für die Ermittlung der Haltbarkeit allerdings den Zeitpunkt vor, bei dem das einseitige 95%-Vertrauensbandes der Regressionsgerade die Grenze des erlaubten Mindestgehaltes schneidet. Dies führt abhängig von der Genauigkeit der Analysenmethode zu einer Verkürzung der Haltbarkeit [HOLZ et al. (2001)]. Da die Analytik pflanzlicher Zubereitungen und Fertigarzneimittel naturgemäß mit erheblich größeren Schwankungen bei der Werteermittlung als bei chemisch definierten Einzelsubstanzen behaftet ist, kann für diese Zubereitungen nach dieser Methode eine problematische Verkürzung der Haltbarkeit resultieren [LANG (2001)]. Geringfügig bessere Werte liefert die Beobachtung der Haltbarkeit, wenn definierte Abbauprodukte detektiert wurden. Da meist die Menge der zu bestimmenden Substanz wesentlich geringer ist, erreicht man für Reaktionsprodukte selbst bei größerer Varianz der Methode eine Aussage mit erheblich höherer statistischer Sicherheit als für das Edukt. Zieht man das erhaltene Schwankungsintervall im Gehalt des Abbauproduktes vom Ausgangswert der auf ihre Stabilität hin untersuchten Substanz ab, resultieren geringere Schwankungen, die demzufolge auch zu höheren Haltbarkeitswerten führen [BAUER et al. (1999a)]. Eine weitere Fehlermöglichkeit bei der Ermittlung der Haltbarkeit, ist die irrtümliche Zuordnung zu

einer linearen Kinetik anstatt zu einer Kinetik höherer Ordnung. Bei der Extrapolation kann dies ebenfalls zu geringeren Haltbarkeitswerten führen. Im Anfangsbereich einer Verlaufskurve spielt diese fälschlicherweise Annahme einer zu niedrigen Ordnung allerdings nur eine geringere Rolle, da in diesem Bereich die Unterschiede zwischen den Kurvenverläufen tolerierbar sind [BAUER et al. (1999b)].

Zur Erhöhung der Haltbarkeit bei Substanzen mit bekanntermaßen raschem Abbau behilft man sich, indem dem Extrakt nachträglich ein definierter Sicherheitszuschlag von 10% des Inhaltsstoffes zugesetzt wird. Dies allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die therapeutische Breite das zulässt [LIST et al. (1984)].

1.2. Pflanzliche Extrakte

1.2.1. Definition nach Ph. Eur.

Unter Pflanzenextrakten versteht man konzentrierte Zubereitungen verschiedenartiger Konsistenz, die aus pflanzlichem Material gewonnen werden können. Als geeignete Auszugsmittel (Menstrua) kommen in der Regel Wasser, Alkohol-Wasser-Mischungen oder aber auch fette Öle oder Likörwein zum Einsatz [BAUER et al. (1999c)]. Je nach Herstellungsmethode lässt das Arzneibuch [PH.EUR. (2002e)] vier verschiedene Extraktformen unterscheiden:

- **Tinkturen:**
Flüssige Zubereitung, bei der auf 1 Teil Droge mindestens 2 bis max. 10 Teile Extraktionsflüssigkeit eingesetzt werden.
- **Fluidextrakte:**
Flüssiger Extrakt, bei dem aus 1 Teil Droge in der Regel 1 Teil Extrakt erhalten wird.
- **Spissumextrakte:**
Zähflüssiger Extrakt, der den halbfesten Zubereitungen zugerechnet wird, der durch teilweisen oder vollständigen Entzug des Extraktionsmediums entstanden ist, und einen Trockenrückstand von mehr als 70% aufweisen muss.
- **Trockenextrakte:**
Feste Zubereitung, die nach vollständiger Entfernung des Extraktionsmediums entsteht, und keinen Trocknungsverlust größer als 5% aufweisen darf.

Die größte Bedeutung haben allerdings die Trockenextrakte, da diese die optimalste Haltbarkeit aufweisen [KOMMENTAR PH.EUR. (1998)].

1.2.2. Extraktionsmethoden

Zur Extraktion sind verschiedene Extraktionsmethoden zugelassen, deren Ziel es sein sollte, die wirksamen Inhaltsstoffe so weit es geht von unerwünschten Begleitstoffen zu trennen. Eine erhebliche Rolle kommt bei diesem Problem dem Extraktionsmittel zu. So stellt Wasser beispielsweise ein sehr gutes Menstruum für viele wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe dar, hat aber gleichzeitig die Eigenschaft eine Vielzahl unerwünschter polarer Begleitsubstanzen zu extrahieren. Weitere Probleme bei rein wässriger Extraktion stellt die Begünstigung mikrobiellen Befalls und enzymatischer Reaktionen dar [VOIGT (2000b)]. So kommen in der Regel Alkohol-Wasser Mischungen zum Einsatz, wodurch weniger Schleimstoffe, Gummen, Pektine und Proteine in den Extrakt übergehen [SCHNEIDER et al. (1992a)]. Statt dessen können mehr Harze, Balsame und Chlorophyll gelöst werden [VOIGT (2000b)].

Die am häufigsten angewandten Auszugsverfahren zur Gewinnung von Extrakten sind die Mazeration, Digestion und Perkolation und davon abgeleitete Methoden. Dabei führen Mazeration und Digestion lediglich zur Einstellung eines Konzentrationsgleichgewichtes, während die Perkolationsverfahren zur erschöpfenden Extraktion des Pflanzenmaterials genutzt werden können. Bei dem einfachsten Auszugsverfahren, der Mazeration, wird das Extraktionsgut mehrere Tage bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz mit dem Lösungsmittel versetzt und hin und wieder geschüttelt. Das Arzneibuch [PH.EUR. (2002e)] schreibt nach dem Dekantieren eine fünftägige Lagerung bei 15°C vor bevor filtriert wird, damit Extraktivstoffe abgeschieden werden, die bei dieser Temperatur wieder ausfallen. Eine Mazeration wird besonders für die Extraktion von thermolabilen Inhaltsstoffen oder Schleimstoffen genutzt. Die Mazeration unter Erhitzung auf 40-50°C ist die Digestion, die zu höheren Extraktionsausbeuten führt, beim Abkühlen aber Nachtrübungen durch wieder ausfallende Inhaltsstoffe zeigt. Keine besseren Extraktionsergebnisse aber kürzere Extraktionszeiten liefern die Schüttelmazeration (10-30 min) und die Turboextraktion (Wirbelextraktion). Während bei der Schüttelmazeration das Gemisch ständig geschüttelt oder gerührt wird, kommen bei der Turboextraktion hochtourige Rührwerke für 5-10 min zum Einsatz. Durch die rotierenden Schlagmesser wird die Pflanzenmatrix schneller aufgeschlossen und zerkleinert. Wegen der dabei entstehenden Erwärmung der Lösung ist dieses Verfahren nicht zur Extraktion thermolabiler Substanzen geeignet. Zu einer ebenfalls schnellen Extraktion führt eine Behandlung mittels Ultraschall, die aber Extrakte liefert, die empfindlicher gegen hydrolytische und oxidative Prozesse sein können [VOIGT (2000b)].

Bei der Perkolation und davon abgeleiteten Verfahren spricht man von kontinuierlicher Extraktion, weil der Auszug fortlaufend durch frisches Menstruum ersetzt wird, was zu erschöpfender Extraktion führt. Bei der einfachen Perkolation wird das vorgequollene Drogengut in ein beidseitig offenes Perkolationsrohr gefüllt und von oben mit Menstruum durchspült. Das

Resultat wird von den Faktoren Selektivität des Lösemittels, Tropfgeschwindigkeit und Temperatur beeinflusst. Als nachteilig erweist sich der hohe Verbrauch an Solvens. Ein verbessertes Verfahren in dieser Hinsicht stellt die Soxhlet-Extraktion dar, bei der das Drogengut immer wieder durch einen Destillationskreislauf mit reinem Lösungsmittel durchspült wird, während sich die Extraktivstoffe im Destillationskolben aufkonzentrieren. Nachteilig hierbei ist die thermische Belastung des Extraktes. Ein weiteres kontinuierliches Verfahren, das im Industriemaßstab zur Anwendung kommt, stellt die Gegenstromextraktion dar. Bei diesem Verfahren kann der das Drogengut über eine Förderapparatur mit entgegenströmendem Menstruum erschöpfend extrahiert werden [VOIGT (2000b); BAUER et al. (1999c); SCHNEIDER et al. (1992a)].

In neuerer Zeit wird zunehmend auch die Extraktion mit überkritischen Gasen praktiziert. Das Gas, vornehmlich Kohlendioxid, wird über die kritische Temperatur erhitzt und durch Druckerhöhung ein überkritischer Zustand des Gases erzeugt. Durch die dabei auftretende Erhöhung der Dielektrizitätskonstante und der Dichte kann das Gas in diesem Zustand als Solvens genutzt werden. Diese Methode vereinigt die Merkmale der Destillation und Extraktion und wird daher oft auch als „Destraktion“ bezeichnet. Sie eignet sich besonders zur Extraktion lipophiler Stoffe, und wird daher zur Gewinnung von Fetten, fetten Ölen oder zur Entkoffeinierung von Kaffee benutzt [VOIGT (2000b); BAUER et al. (1999c)].

1.2.3. Droge-Extrakt-Verhältnis

Nach der Extraktion werden im Falle der Spissum- und Trockenextrakte die Lösungsmittel durch geeignete Verfahren entfernt und die Extrakte getrocknet. Dabei muss darauf geachtet werden, dass Zersetzungsprozesse durch geeignete Trocknungsmethoden weitgehend vermieden werden. Das Massenverhältnis von definiertem Ausgangsmaterial zum resultierenden nativen Extrakt wird als Droge-Extrakt-Verhältnis bezeichnet (DEV_{nativ}). Diesem wird heute als Qualitätsparameter große Bedeutung beigemessen, und sollte für die eingesetzten Extrakte deklariert werden [FRANZ (2002)]. Der reziproke Wert des DEV kann als Maß für den Extraktivstoffgehalt eines nach validierter Methode erstellten Produktes genommen werden. Je höher die Extraktivstoffmenge desto niedriger das DEV, was unter dem Gesichtspunkt der Optimierung der Herstellungsbedingungen angestrebt werden sollte. Der Extraktivstoffgehalt ist wesentlich von der Beschaffenheit des Pflanzenausgangsmaterials abhängig, so dass das DEV Schwankungen, bedingt durch die natürlichen Variationen des Pflanzenmaterials, unterworfen sein kann. Über das DEV kann mit vorgegebenen Dosierungs-Angaben der Kommission E die Tagesdosis eines speziellen Extraktes errechnet werden:

$$\text{TD-Extrakt [g]} = \text{TD Droge [g]} : DEV_{\text{nativ}}$$

Aus den oben erwähnten Schwankungen im DEV resultiert ein Intervall für die Masse eingesetzten Extraktes. [GAEDCKE (2000)]

1.2.4. Eingesetzte Hilfsstoffe

Native Trockenextrakte zeigen auf Grund ihrer Hygroskopizität eine schlechte physikalische Stabilität und stellen darum meist nur Zwischenprodukte dar, die unter Zusatz von inerten Hilfsstoffen weiterverarbeitet werden müssen. Einige Extrakte können ohne den Zusatz indifferenten Hilfsstoffe nicht vollständig getrocknet werden. Als technische Hilfsstoffe fungieren hier hochdisperses Siliziumdioxid, Lactose, Stärke, Glucosesirup oder Maltodextrin [LIST et al. (1984)]. Zur Einstellung und Normierung des Wirkstoffgehaltes und der Stabilisierung sind als indifferente Hilfsstoffe Lactose, Dextrin, Saccharose, Glucose, Stärke und arabisches Gummi erlaubt. Der gewählte Normwert eines Extraktes muss dabei mit einer Abweichung von maximal 5% erreicht werden. Flüssige und zähflüssige Extrakte enthalten Reste des Auszugsmittel und können zusätzlich durch den Einsatz von Propylenglykol-/Glyceringemischen oder fetten Ölen aufbereitet werden [GAEDCKE (2000)].

1.2.5. Einteilung der Extrakte unter Gesichtspunkten der Qualitätssicherung

Nach FRANZ (2002) werden Extrakte in der aktuellen Monographie des PH.EUR. (2002e) in drei zu unterscheidende Typen klassifiziert:

1. Standardisierte Extrakte:

Dabei handelt es sich um Extrakte, von deren Inhaltsstoffen (einzelne oder Gruppe) die therapeutische Wirksamkeit bekannt ist. Diese werden durch Zusatz von inertem Material oder durch Verschneiden von Extraktchargen unterschiedlichem Gehalts auf ein vorgegebenes Gehaltsintervall eingestellt. Die in dieser Arbeit untersuchten Sennesextrakte fallen unter diese Definition.

2. Quantifizierte Extrakte:

Bei diesen Extrakten kann die klinische Wirksamkeit nicht einzelnen Inhaltsstoffen zugeordnet werden. Die Quantifizierung erfolgt daher durch Einstellung auf einen definierten Bereich von spezifischen, wirksamkeitsmitbestimmenden Inhaltsstoffen durch Verschneiden von Drogen-Ausgangsmaterial oder verschiedenen Extraktchargen. Johanniskrautextrakt kann als Beispiel für diesen Extrakttyp genannt werden.

3. Andere Extrakte:

Für einige Extrakte, wie beispielsweise die in dieser Arbeit untersuchten Baldrianextrakte, kann die nachgewiesene klinische Wirksamkeit mit keiner Inhaltsstoffgruppe oder Einzel-

substanzen streng korreliert werden. Dieser Extraktionstyp kann nur über den Herstellungsprozess definiert werden. Als Bezug dienen Parameter des Ausgangsmaterials, der Extraktionsbedingungen und das Menstruum. Ersatzweise werden für diese Extrakte Leitsubstanzen genutzt, um die Qualitätssicherung über den Herstellungsprozess gewährleisten zu können und GMP-gerechte Herstellung zu ermöglichen.

Mit dieser neuen Einteilung wird versucht, den Besonderheiten pflanzlicher Extrakte in puncto Qualitätssicherung Rechnung zu tragen. Die vielschichtige Zusammensetzung eines Extraktes erfordert laut FRANZ et al. (2001) diese Charakterisierung im Sinne einer größeren Transparenz hinsichtlich der pharmazeutischen und damit auch der therapeutischen Qualität. Wie bereits bei den Herstellungsverfahren geschildert, liegt ein Problem in der Coextraktion vieler Begleitstoffe. Sie machen in der Regel mengenmäßig den Hauptanteil eines Extraktes aus [GAEDCKE (2000)]. Diese oft auch als „Matrix“ bezeichneten unwirksamen Begleitstoffe haben unterschiedlichen Einfluss auf Farbe, Geruch und Geschmack der pflanzlichen Zubereitung und können deren Stabilität ungünstig beeinflussen. Auch erschweren sie unter Umständen massiv die selektive analytische Erfassung der Wirkstoffe [VOIGT (2000b)]. Dieser Komplex muss allerdings nicht zwangsläufig wertlos oder schädlich sein, sondern kann unter Umständen die Hauptwirkung unterstützen (Co-Effektoren) [FRANZ et al. (2001)]. Ein Beispiel hierfür wäre die resorptionsfördernde Wirkung der Saponine [VOIGT (2000b)]. Falls bei der Herstellung allerdings auch unerwünschte Komponenten, wie z.B. Toxine oder Allergene mit in den Extrakt übergehen, muss das Herstellungsverfahren entsprechend modifiziert werden um die Anreicherung dieser Stoffe zu vermeiden [BAUER et al. (1993)]. Ein Beispiel hierfür wäre die Abreicherung der Ginkgolsäuren unter die vorgeschriebenen 5 ppm bei der Extrakterstellung von offizinellem Ginkgoextrakt [JAGGY und KOCH (1997)].

LANG und STUMPF (1999) geben eine Übersicht weiterer Parameter des Herstellungsprozesses an, die Einfluss auf die Zusammensetzung, und damit auf die Qualitätssicherung haben können: Das Pflanzenausgangsmaterial kann beispielsweise große Unterschiede im Inhaltsstoffgehalt abhängig von geographischer Herkunft, Erntezeitpunkt und Pflanzenorgan aufweisen. Variationen in der Art des Lösungsmittels, dessen Konzentration, Menge und Drogenextraktverhältnis, sowie die Füllhöhe über dem Gut und die Extraktionsgeschwindigkeit spielen eine bedeutende Rolle bei der Herstellung pflanzlicher Extrakte. Bei industrieller Fertigung im Großmaßstab können weiterhin Modifikationen in der Extraktionsmethode, dem zeitlichen Ablauf, der Temperatur und dem Druck sowie der Größe des Ansatzes zu Veränderungen in der Zusammensetzung führen. Abb. 1 fasst die Einflussfaktoren zusammen [GAEDCKE (1998)]. Für nicht alle dieser Parameter ist eine Standardisierung des Verfah-

rens möglich, so dass Abweichungen der Zusammensetzung bei Pflanzenextrakten ein Problem darstellen können.

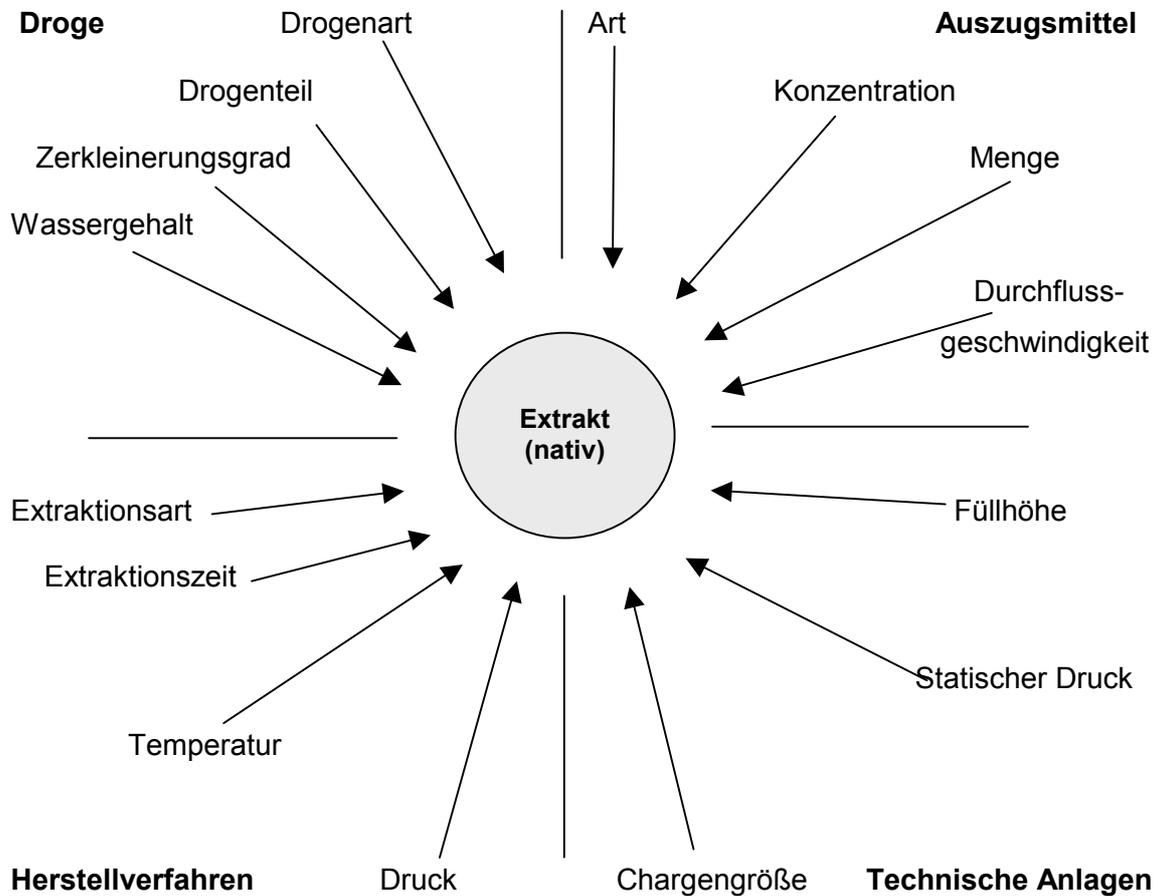


Abb. 1: Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung von pflanzlichen Extrakten nach GAEDCKE (1998)

Aus den oben genannten Aspekten wird ersichtlich, welcher Bedeutung der Einhaltung definierter Vorgaben bei der Herstellung der Extrakte zukommt, auch um einen Vergleich unter den handelsüblichen Präparaten zu ermöglichen. Daneben spielt die Einhaltung der vorgeschriebenen Spezifikations-Parameter eine große Rolle zur Gewährleistung einer reproduzierbaren Wirksamkeit und Sicherheit beim Patienten [BAUER et al. (1993)]. Da die Qualität eines Pflanzenausuges direkt von der Qualität des Drogenauszugsmaterials abhängig ist, spielt auch die Einhaltung und Kontrolle der im Arzneibuch vorgegebenen Merkmale des Pflanzenmaterials eine wesentliche Rolle [HEFENDEHL (1986), TOBLER und SCHNEIDER (2001)].

2. Problemstellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ICH- konforme Stabilitätsuntersuchungen für ausgewählte handelsübliche Drogenextrakte durchzuführen. Im Vergleich dazu sollten die entsprechenden Einsatzdrogen untersucht werden, um mögliche Unterschiede im Stabilitätsverhalten aufzudecken. Diese können sich bei Variation der klimatischen Bedingungen in Veränderungen der organoleptischen, physiko-chemischen, chemischen und mikrobiellen Eigenschaften äußern [GRIMM et al. (1993)].

Die drei vorgeschriebenen klimatischen Bedingungen [CPMP(2001)] von 25°C / 60% rF (long term testing), 30°C / 60% rF (intermediate testing) und 40°C / 75% rF (accelerated testing) sollten erstellt werden, um die zu untersuchenden Präparate für den vorgeschriebenen Überwachungszeitraum entsprechend zu lagern. Dieser beträgt für das long-term testing mindestens ein Jahr, für das accelerated testing mindestens 6 Monate. Falls sich Veränderungen während des accelerated testings zeigen, soll zusätzlich die Stabilität bei 30°C / 60% rF für 6 Monate untersucht werden. Zur Erzeugung konstanter Feuchtigkeitsatmosphären stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei die Nutzung übersättigter Salzlösungen für diese Problematik am besten geeignet ist [STAHL (1980)]. Die ICH-guidelines erlauben eine Abweichung der kinetischen Temperatur um $\pm 2^\circ\text{C}$. Damit ist die Jahresdurchschnittstemperatur für eine Klimazone gemeint, wobei jahres- und tageszeitliche Schwankungen darin mit eingeschlossen sind [BAUER et al. (1999a)]. Zur Beschleunigung von Abbaureaktionen wurden auch die Veränderungen bei kurzer Lagerung unter Stressbedingungen von 70°C trockener Hitze untersucht, um mögliche Abbauewege aufdecken zu können.

Während der Lagerung sollten zum einen die Veränderungen der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe sowie der jeweiligen Leitsubstanzen dokumentiert werden. Unter Leitsubstanzen sind chemisch definierte Inhaltsstoffe zu verstehen, die nach heutigem Erkenntnisstand zu der postulierten Wirkung keinen Beitrag leisten müssen und daher lediglich von analytischem Interesse sind [GAEDCKE (2000)]. Für *Valeriana officinalis* existieren als charakteristische Leitsubstanzen die Valerensäuren. Ubiquitär vorkommende Inhaltsstoffe, wie z.B. Flavonoide in Sennesblättern könnten in diesem Zusammenhang auch als Leitsubstanzen gesehen werden. Für Stabilitätsuntersuchungen sollten allerdings jeweils die empfindlichsten Strukturen als Leitsubstanzen dienen [LAZAROWYCH et al. (1998)]. Da die Art der Zubereitung einen großen Einfluss auf die Stabilität der Inhaltsstoffe hat, müssen für verschiedene Zubereitungen unter Umständen auch verschiedene Leitsubstanzen zum Einsatz kommen [LIST et al. (1984)]. Die Überwachung des relativen Gehaltes mehrerer Leitsubstanzgruppen liefert verbesserte Aussagen über die Chargenkonformität, das Extraktionsverfahren und die Stabilität, als die alleinige Betrachtung der wirksamkeitsbestimmenden

Inhaltsstoffe [LAZAROWYCH et al. (1998)]. Daher sollten neben diesen auch Leitsubstanzgruppen identifiziert und in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

Daneben schreiben die ICH-guidelines eine Überwachung der Begleitsubstanzen mittels geeigneter Verfahren vor. In diesem Zusammenhang finden sich einzig in den Richtlinien der FDA (1987) genauere Angaben, zu den Anforderungen an geeignete Verfahren zur Stabilitätsuntersuchung. Die angewandte validierte Methode soll dazu geeignet sein, Veränderungen der chemischen, physikalischen oder mikrobiellen Veränderungen über die Zeit zu detektieren. Es sollen sich dabei spezifisch die aktiven Inhaltsstoffe, Degradierungsprodukte und Begleitkomponenten ohne gegenseitige Störungen quantitativ genau bestimmen lassen. Diesen Anforderungen kann man für die Analytik pflanzlicher Zubereitungen aber nicht in allen Punkten gerecht werden.

Als routinemäßig einsetzbare Analysenverfahren sollten verschiedene chromatographische Fingerprint-Verfahren auf ihre Tauglichkeit zur Stabilitätsanalytik hin untersucht werden. Die dabei möglicherweise detektierten Abbauprodukte sollten identifiziert und wenn möglich die Abbauewege nachvollzogen werden. Nach LAZAROWYCH et al. (1998) werden in der Regel für Fingerprint-Untersuchungen die Dünnschicht-, die Hochdruckflüssigkeits-, die Gaschromatographie und die Kapillarelektrophorese genutzt. Daneben kommen spektroskopische Methoden wie UV-, Infrarot- und Kernresonanzspektroskopie zum Einsatz. Dabei muss nach GAEDCKE (2000) beachtet werden, dass, je weniger über die Inhaltsstoffe bekannt ist, umso mehr qualitative Fingerprint-Verfahren in verschiedenen Polaritätsbereichen müssen in der Qualitätssicherung eingesetzt werden. Für die vorliegende Arbeit sollten die HPLC mit UV-DAD Detektion sowie die DC genutzt werden. Limitierend für die Vergleichbarkeit solcher Fingerprints ist jeweils die Robustheit der analytischen Methode. Nach der ICH-guideline sind unter diesem Stichpunkt sämtliche Veränderungen im analytischen Ergebnis subsumiert, die durch geringfügige Veränderungen der Messbedingungen den Variationskoeffizienten beeinflussen. Dazu zählen Variationen des pH-Wertes, der Temperatur, des Fließmittels, des apparativen Aufbaus, oder der Säulen. Besonders die Wiederholpräzision bei der Dünnschichtchromatographie stellt in diesem Zusammenhang bei der Stabilitätsprüfung ein Problem dar. Daher besteht nach BAKSHI et al. (2002) für viele Substanzen das Bestreben, die DC-Methodik durch eine routinetauglichere HPTLC-Methode auszutauschen. Ein weiteres Problem der DC ist die problematische Vergleichbarkeit der Ergebnisse, die erheblich von der Art der photographischen Dokumentation der Chromatogramme abhängt.

Zur Entwicklung einer „stability-indicating assay method“ (SIAM) für Einzelsubstanzen schlägt BAKSHI et al. (2002) folgende Vorgehensweise vor:

1. Kritische Betrachtung der Struktur der Inhaltsstoffe um mögliche Abbauege zu ermitteln
2. Ermittlung der physikochemischen Parameter der Struktur (pK_a , $\log P$, Löslichkeit etc.)
3. Forcierter Abbau durch erhöhte Temperatur, Feuchtigkeit oder pH
4. Isolation von Abbauprodukten aus Punkt 3
5. Methodenentwicklung und Optimierung unter Einbeziehung der Substanz und aller Abbauprodukte
6. Identifikation der Abbauprodukte und Herstellung geeigneter Standards
7. Validierung der Methode

Auf Grund der in den einleitenden Kapiteln genannten Besonderheiten pflanzlicher Zubereitungen wird allerdings offensichtlich, dass die für chemisch definierte Stoffe vorgeschlagene Vorgehensweise wiederum bei pflanzlichen Zubereitungen nicht in allen Punkten durchgeführt werden kann.

Die Stabilität eines feuchtigkeitsempfindlichen Wirkstoffes verhält sich vollkommen anders, je nachdem in welcher Verpackung er gelagert wird [FUCHS [1986]]. Die Wasserdampfdurchlässigkeit des Materials hat dabei einen großen Einfluss auf den Austausch von Feuchtigkeit zwischen Binnenklima und Außenatmosphäre [STAHL (1980)]. Um den Einfluss der Verpackung auf das Prüfungsgut evaluieren zu können, sollten demnach verschiedene Verpackungsarten überprüft werden.

Wird ein Stoff anderen klimatischen Bedingungen ausgesetzt als sie bei der Herstellung vorlagen, kann es zu sorptionsbedingten Änderungen von feuchtigkeitsabhängigen Eigenschaften, wie Rieselfähigkeit oder Wirkstofffreigabe kommen [STAHL (1986)]. Für feste Arzneiformen sind bei Lagerung unter erhöhter Feuchte und Temperatur Veränderungen in der Härte, Erhöhung der Zerfallszeit und Verminderung der Auflösengeschwindigkeit beschrieben [GRIMM (1983)]. Neben der chemischen Degradation sollten daher ähnliche Veränderungen der physikalischen Parameter und des Aussehens der Extrakte untersucht werden.

Neben den handelsüblichen Extrakten, sollten auch native Extrakte ohne Hilfsstoffe untersucht werden, um nachzuweisen ob für diese Zubereitungen andere Empfindlichkeiten vorliegen. Gerade der entscheidende Faktor Feuchtigkeit wird durch Hilfsstoffe entscheidend

beeinflusst [STAHL (1986)] und kann somit auch zu deutlichen Veränderungen im Stabilitätsverhalten führen.

3. Praktische Umsetzung

3.1. Design der Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitätsuntersuchungen orientierten sich in wesentlichen Punkten an der „Note for guidance on stability testing: stability testing of existing active substances and related finished products“ [CPMP (1998)]. Die drei vorgeschriebenen Klimabedingungen wurden in den vorliegenden Untersuchungen simuliert und die Entwicklung der Drogen und Extrakte für mindestens 18 Monate überwacht. Während der ersten 12 Monate sollten dabei alle drei Monate Proben genommen, im zweiten Jahr nur noch alle 6 Monate. Die vorgeschriebene Testfrequenz von 3 Monaten innerhalb des ersten Jahres war aus logistischen Gründen nicht immer einzuhalten. Für jeden Kurvenverlauf standen je fünf Messzeitpunkte nach Beendigung der Prüfung zur Verfügung. Um mögliche Abbauwege im Voraus identifizieren zu können, wurden für kurze Zeit Proben bei erhöhten Temperaturen eingelagert.

Um den Einfluss des Verpackungsmaterials zu ermitteln, wurden die Proben in verschiedenen Aufbewahrungsgefäßen aufbewahrt. Für die vier handelsüblichen Extrakte wurden PE-Weithalsflaschen mit alukaschierten Beuteln, PE-Beuteln und unverpackten Proben verglichen. Die jeweiligen Verpackungen sollten als Miniaturisierungsmodelle für die industriell vorkommenden Lagerbedingungen zum Einsatz kommen. Die drei pulverisierten Einsatzdrogen und die vier nativen Extrakte wurden nur in PE-Weithalsflaschen aufbewahrt.

Zur Überwachung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung wurde in erster Linie die HPLC-Trennung mit UV-DAD Detektion herangezogen, da von dieser Methode die größte Messgenauigkeit zu erwarten war. Es wurden jeweils zwei Stichproben genommen, die je zweimal per HPLC untersucht wurden. Daneben wurden die Extrakte per DC mit verschiedenen Fließmittelsystemen, als weiteres Fingerprint-Verfahren, auf qualitative Veränderungen im Inhaltsstoffspektrum hin untersucht. Um das Problem der schlechten Wiederholpräzision bei der DC zu umgehen, wurden die Proben nicht sofort am Messzeitpunkt vermessen, sondern aus tiefgefrorenen Rückstellmustern gesammelt untersucht. Dadurch wird auch das Problem der photographischen Dokumentation, und des schwierigen Vergleichs der verschiedenen Messpunkte gerade bei geringfügigen Änderungen wesentlich verringert.

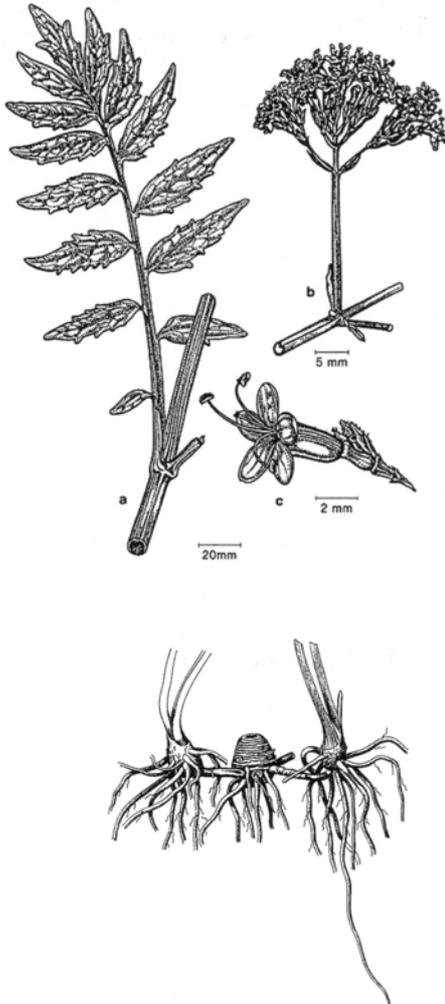
Neben der Überwachung der Inhaltsstoffe durch chromatographische Verfahren, sollten auch die physikalischen Veränderungen der Drogen und Extrakte zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten dokumentiert werden. Als Messparameter erschien die Ermittlung des

Trocknungsverlustes sowie der Korngrößenverteilung als geeignet. Ein weiteres Qualitätsmerkmal stellt eine Veränderung im Erscheinungsbild und organoleptisch messbare Veränderungen dar, welche bei den Extrakten zum Teil so stark auftraten, dass auch hierfür die Dokumentation durchgeführt wurde.

Als signifikante Veränderungen, wird in der allgemeinen guideline für die Handhabung pflanzlicher Zubereitungen [CPMP (2001)] lediglich die Verfehlung der vom Hersteller selbst definierten vorgegebenen Spezifikationsparameter angegeben. Um eine Bezugsgröße zu haben, wurden in den graphischen Auswertungen die Abweichungen um $\pm 5\%$ bzw. $\pm 10\%$ vom Ausgangswert (Peakfläche oder Gehalt) als Gerade mit eingefügt.

3.2. Stabilität von pulverisierter Baldrianwurzel und Baldrianwurzel-trockenextrakten

3.2.1. Beschreibung der Droge



Valeriana officinalis L. ist ein mehrjähriges, bis zu 1,5 m hoch wachsendes Kraut, das in Europa und Asien heimisch ist. Charakteristisches Merkmal ist ein kurzes vertikales Rhizom, von dem sich nach allen Richtungen zahlreiche Faserwurzeln verzweigen. Im Frühjahr bildet sich zunächst eine grundständige Rosette unpaarig gefiederter Laubblätter aus. Im Sommer entwickelt sich daraus der runde, geriefte und innen hohle Stängel, an dessen Nodien unpaarig gefiederte Laubblätter ansitzen. Der Blütenstand stellt sich als rispige Trugdolde aus 2-8 mm großen trichterförmigen, fünfzähligen, hellrosa Einzelblüten dar. Die Blüten besitzen eine asymmetrisch gebaute Krone, je 3 Staub- und Fruchtblätter, von denen aber nur eines fertil ist [HÄNSEL und HÖLZL (1996a)]. Die Frucht ist eine Achäne mit Pappus.

Die drogenliefernde Stammpflanze *Valeriana officinalis* s. l. umfasst eine Sammelart aus verschiedenen Kleinarten, die je nach Herkunft in verschiedene Ökotypen und geographische Rassen aufgegliedert werden kann [SCHNEIDER et al. (1992a)]. Die Folge ist ein variierender Gehalt an spezifischen Inhaltsstoffen. So lässt sich allein die Zusammensetzung des ätherischen Öles entsprechend der dominierenden Komponenten in vier Chemotypen unterscheiden [BOS et al. (1997)]. Eine Übersicht der unterschiedlichen Grundtypen liefert BODESHEIM (1996).

Im Europäischen Arzneibuch [PH.EUR. (2002a)] ist die Droge durch das Rhizom, die Wurzeln, sowie die Ausläufer oder Bruchstücke dieser Teile definiert. Der günstigste Erntezeitpunkt liegt laut WAGNER (1999a) im September, da zu dieser Zeit der Gehalt an ätherischem Öl und das Wurzelgewicht am größten ist. Die frisch geerntete Droge darf nach dem Waschen bei maximal 35°C getrocknet werden um möglichst viele der thermolabilen und

flüchtigen Inhaltsstoffe zu erhalten. Zur Drogengewinnung dienen zum größten Teil Kulturen aus Belgien, Holland und Deutschland (Franken) [HÄNSEL et al. (1999a)]. Die frisch geerntete Droge ist weitgehend geruchlos, da sich das typische Baldrianaroma erst im Laufe des Trocknungsprozesses durch freigesetzte Isovaleriansäure entwickelt [WAGNER (1999a)]. Der Gehalt der gattungsspezifischen Inhaltsstoffe variiert je nach Art und Alter der eingesetzten Ausgangsdroge [BOS et al. (1997), NOLLER (1989)].

Weitere drogenliefernde Arten, die wegen ihres hohen Valepotriat-Vorkommens industriell genutzt werden, sind *V. wallichii* DC (*V. jatamansi* Jones) und *V. mexicana* (*V. edulis* Nutt. ex Torr. et Gray ssp. *procera* (H.B.K.) F.G. Meyer) [SCHNEIDER et al. 1992a].

3.2.2. Inhaltsstoffe

3.2.2.1. Cyclopentan-Sesquiterpene

Die für die Analytik bedeutsamsten Inhaltsstoffe stellen die Valerensäuren als Vertreter der Cyclopentan-Sesquiterpene dar (Abb. 2). Ihre Auffindung erfolgte erstmals 1956 durch STOLL und SEEBECK im ätherischen Öl von *V. officinalis*. Nach einem Vorschlag von HÄNSEL et al. (1985) werden sie als charakteristische Leitsubstanzen der Qualitätskontrolle für die offizinelle Baldriandroge und deren Zubereitungen eingesetzt. Dies gilt nicht für die außereuropäischen, valepotriatreichen Arten, wie *V. edulis* und *V. jatamansi*, in denen sie nicht vorliegen [SCHNEIDER et al. (1992a)].

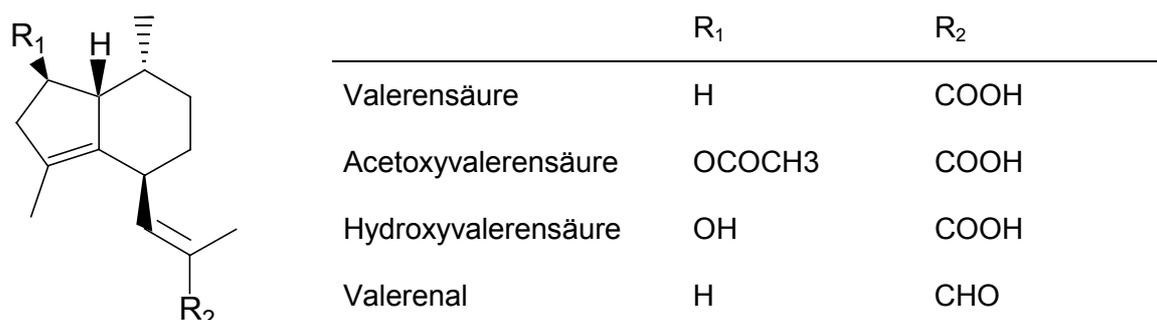


Abb. 2: Cyclopentan-Sesquiterpene aus *Valeriana officinalis*

Der Gehalt an Valerensäuren lässt sich durch verschiedene HPLC-Methoden ermitteln [BOS et al. (1998); HÄNSEL et al. (1982); GORBATO et al. (1996), PH.EUR. (2002a)], unterliegt aber erheblichen Schwankungen abhängig von Herkunft und Erntezeitpunkt. Demzufolge kann ein Gesamtvalerensäuregehalt bei *V. officinalis* zwischen 0,3 und 0,9 % vorlie-

gen, wobei der gehaltreichste Erntezeitpunkt im Frühjahr liegt [BOS et al. (1998)]. Der Anteil der Hydroxyvalerensäure ist in der Regel vergleichsweise gering, es handelt sich möglicherweise um ein bei ungünstigen Lagerungsbedingungen entstehendes Abbauprodukt [BOS (1998)]. Das Europäische Arzneibuch schreibt seit 2002 als weiteres Qualitätskriterium neben dem Gehalt an ätherischem Öl einen Mindestgehalt an Sesquiterpensäuren von 0,17% vor.

Neben der Bestimmung durch HPLC ist auch der Identitätsnachweis von *V. officinalis* über das Vorhandensein der Valerensäuren mittels Dünnschichtchromatographie etabliert [PH.EUR. (2002a) ; SCHIMMER und RÖDER (1992)].

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Valerensäuren stellt nach MIKELL et al. (2001) die Kapillarelektrophorese dar, die vergleichbare Gehaltswerte an Valerensäurederivaten liefert.

DHARMARATNE et al. (2002) konnten darüber hinaus mehrere Valerensäurederivate in *V.officinalis* identifizieren, deren Doppelbindung zwischen C-3 und C-4 durch eine Epoxidbrücke ersetzt ist (Abb. 3).

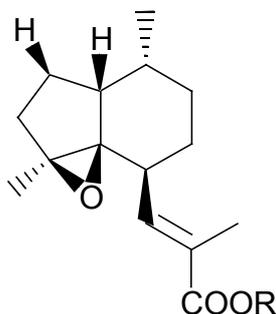
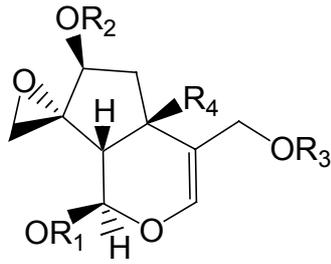


Abb. 3: (-)-3 β ,4 β -Epoxyvalerensäurederivate nach DHARMARATNE et al. (2002)

3.2.2.2. **Valepotriate und Baldrinale**

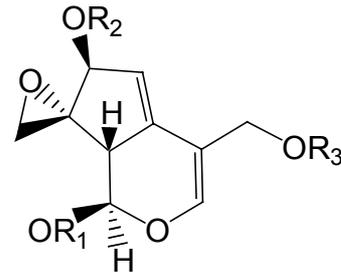
Bei den Valepotriaten handelt es sich um Triester eines terpenoiden, dreiwertigen Alkohols, der sich vom Cyclopentapyran ableitet und einen Epoxidring enthält (**Valeriana-epoxy-triester**) [WAGNER 1999a]. Diese erstmalig von THIES (1966) beschriebenen Verbindungen stellen typische Inhaltsstoffe der Valeriana-Arten dar und kommen vor allem in Wurzeln und Rhizom vor [SCHNEIDER et al. (1992a)]. Da es sich aber um sehr thermo-, alkali- und säurelabile Substanzen handelt, sind sie in galenischen und handelsüblichen Arzneizubereitungen aus *Valerianae radix* praktisch nicht mehr nachweisbar [HÄNSEL und SCHULZ (1985)]. Gemäß BRUNETON (1999) führen Temperaturen über 40°C oder ein pH-Wert kleiner als drei zur Degradation der Valepotriate. Die unsachgemäß getrocknete Baldrianwurzel ist praktisch frei von Valepotriaten [SCHNEIDER et al. (1992a)].

Strukturell lassen sich anhand des Vorhandenseins einer Doppelbindung zwischen C5 und C6 des Isoprengrundkörpers, zwei Valepotriat-Grundtypen unterscheiden: Monoen-Valepotriate (Abb. 4) und Dien-Valepotriate (Abb. 5.). Diese Grundkörper können nach THIES und FUNKE (1981) mit Essig-, Isovalerian-, β -Methylvalerian-, α -Isovaleroxyisovalerian-, α -Acetoxyisovalerian-, β -Acetoxy- β -methylvalerian- und β -Hydroxyisovaleriansäure verestert sein.



Didrovaltrat:	R ₁ , R ₃ = Isovaleryl
	R ₂ = Acetyl
	R ₄ = H
Homodidrovaltrat:	R ₁ = Isocapryl
	R ₂ = Acetyl
	R ₃ = Isovaleryl
	R ₄ = H
IVHD-Valtrat:	R ₁ = Isovaleryl
	R ₂ = Acetyl
	R ₃ = α -Isovaleryl- oxyisovaleryl
	R ₄ = OH

Abb. 4: Monoen-Valepotriate



Valtrat:	R ₁ , R ₂ = Isovaleryl
	R ₃ = Acetyl
Isovaltrat:	R ₁ , R ₃ = Isovaleryl
	R ₂ = Acetyl
Homovaltrat:	R ₁ = Isovaleryl
	R ₂ = Isocapryl
	R ₃ = Acetyl
Acevaltrat:	R ₁ = Isovaleryl
	R ₂ = Acetoxyisovaleryl
	R ₃ = Acetyl

Abb. 5: Dien-Valepotriate

Daneben wurde mit einem Gehalt von 1,5% von THIES (1979) ein Valepotriat-Glukosid (Valerosidat) mit Glucose als Kopplungspartner am C-11 (Abb. 6) in der Baldrianwurzel gefunden.

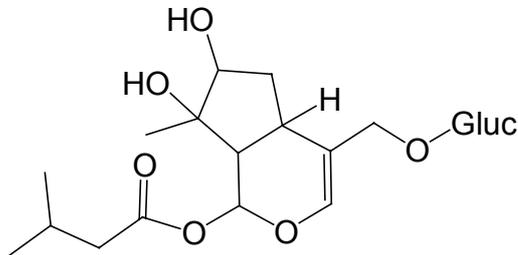


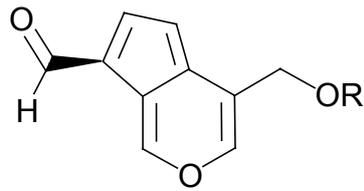
Abb. 6: Valerosidat nach THIES (1970)

Der Gehalt an Valepotriaten unterscheidet sich stark nach Art und geographischer Herkunft. So enthält die Wurzel der valepotriatreichen *V. edulis* zwischen 5 und 8%, wohingegen sich in der Wurzel von *V. officinalis* lediglich 0,5 bis 2% Valepotriate, vornehmlich Valtrat (50-80%), nachweisen lässt [SCHNEIDER et al. (1992a)]. BOS et al. (1998) postulierten analoge Valerensäurewerte als optimalen Erntezeitpunkt das späte Frühjahr, da hier ein Gehaltsmaximum an Valepotriaten in *V. officinalis* vorliegt. Die Untersuchungen von HÖRNER (1989) ergaben einen deutlich höheren Gehalt an Valtrat im Rhizom als in den Wurzeln, insbesondere in den dicken Wurzeln.

Die Gehaltsbestimmung der Valepotriate erfolgt simultan mit den Valerensäuren mittels HPLC, da die Valepotriate ein ähnliches Retentionsverhalten wie die Valerensäuren zeigen [TITTEL et al. (1978); BOS et al. (1998); DOSSAJI et al. (1981); HÄNSEL et al. (1982); GORBATO et al. (1996)]. Daneben wurde von LIPTAH et al. (1980) eine titrimetrische Methode zur Bestimmung der Valepotriate etabliert.

Die Valepotriate zeigen laut THIES (1969) nach Zugabe von Salzsäure/ Eisessig eine charakteristische Farbreaktion (Halazuchromreaktion), die zum Identitätsnachweis im Reagenzglas, bzw. als Sprühreagens bei der Dünnschichtchromatographie genutzt wird [WAGNER 1970] (siehe dazu auch 3.2.5.1).

Die gelb gefärbten Baldrinale (Abb. 7) finden sich genuin nicht in der Pflanze und sind als Abbauprodukte der Valepotriate anzusehen [THIES (1969)], die sich nach Thermolyse oder säurekatalysiertem Abbau bilden [WILLEMS (1980)] (siehe dazu auch Kapitel 3.2.5).



	R
Baldrinal	Acetyl
Homobaldrinal	Isovaleryl
Desacylbaldrinal	H

Abb. 7: Baldrinale in *Valeriana officinalis* (nach THIES (1969))

Weitere Zersetzungsprodukte stellen die am Epoxidring geöffneten Valtrathyrine (Abb. 8) dar [HÖLZL (1976)].

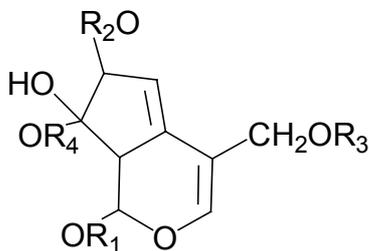
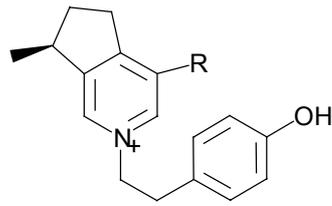


Abb. 8: Valtrathyrine nach HÖLZL (1976)

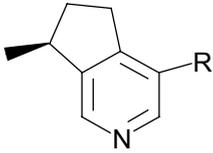
3.2.2.3. Alkaloide

Nach SCHNEIDER et al. (1992a) finden sich in der Droge 0,01 bis 0,05% Alkaloide, die sich dünnschichtchromatographisch mittels Dragendorff Reagens nachweisen lassen. Den größten Anteil haben das Valeriana-Haupt- und Nebenalkaloid [TORSELL und WAHLBERG (1966)], bei denen es sich um Monoterpenalkaloide handelt. Mit Actinidin wurde von GROSS et al. (1971) ein weiteres Monoterpenalkaloid nachgewiesen, das formell eine Teilstruktur der Valerianaalkaloide darstellt. Valerianin, ein Derivat des Actinidins, wurde von FRANCK (1971) aufgefunden. Darüber hinaus sind die Alkaloide Naphtyridylmethylketon [JANOT et al. (1979)] und Methylpyrrylketon [BORKOWSKI et al. (1961)] bekannt, die keine monoterpenen Grundstrukturen aufweisen. Eine Übersicht der Alkaloide gibt Abb. 9:



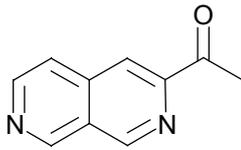
Valeriana-Hauptalkaloid: R = H

Valeriana-Nebenalkaloid: R = OH

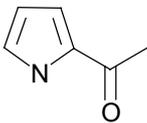


Actinidin R = CH₃

Valerianin R = CH₂OCH₃



Naphtyridylmethylketon

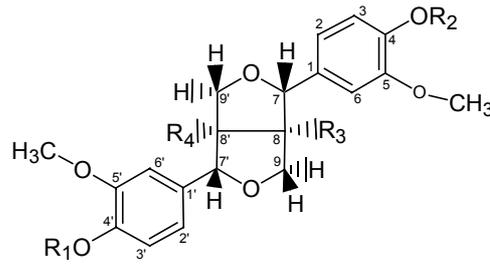


α -Methyl-pyrylketon

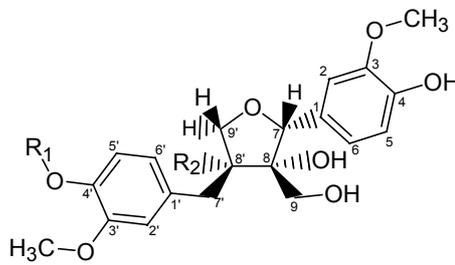
Abb. 9: Alkaloide aus *Valeriana officinalis* nach SCHNEIDER et al. (1992a)

3.2.2.4. Lignane

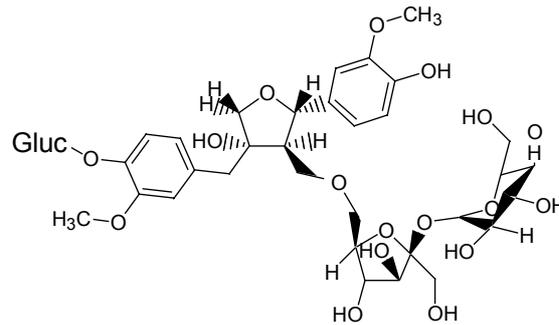
Mit den Lignanen (Abb. 10) wurde in den letzten Jahren eine weitere Gruppe mittelpolarer Inhaltsstoffe identifiziert, die für die Stabilitätsanalytik interessant scheint. BODESHEIM (1996) konnte erstmalig Pinoresinol, Pinoresinol-4-O- β -D-glucosid, Prinsepiol und Hydroxypinoresinol isolieren und identifizieren. SCHOLLE (1998) klärte mit Pinoresinol-4,4'-di-O- β -glucosid und den zwei isomeren 8-Hydroxypinoresinol-glucosiden die Struktur zwei weiterer Glykoside von Diepoxylignanen auf. Des weiteren wurden drei Vertreter der Monoepoxylignane erstmalig in Baldrian nachgewiesen, die als ringoffene Teilstruktur des Hydroxypinoresinol angesehen werden können: Massoniresinol-4'-O- β -glucosid, Berchemol-4'-O- β -glucosid und 4'-O- β -D-Glucosyl-9-O-(6''deoxysaccharosyl)olivil.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Pinoresinol	H	H	H	H
8-Hydroxypinoresinol	H	H	OH	H
Prinsepiol	H	H	OH	OH
Pinoresinol-4-O-β-D-glucosid	H	β-D-Glucose	H	H
Pinoresinol-4,4'-di-O-β-glucosid	β-D-Glucose	β-D-Glucose	H	H
8-Hydroxypinoresinol-4'-O-β-glucosid	β-D-Glucose	H	OH	H
8-Hydroxypinoresinol-4-O-β-glucosid	H	β-D-Glucose	OH	H



	R ₁	R ₂
Massoniresinol-4'-O-β-glucosid	β-D-Glucose	OH
Berchemol-4'-O-β-glucosid	β-D-Glucose	H



4'-O-β-D-Glucosyl-9-O-(6''deoxysaccharosyl)olivil

Abb. 10: Lignane aus *Valeriana officinalis* (nach BODESHEIM (1996) und SCHOLLE (1998))

Den mittels HPLC ermittelten Lignan-Gehalt beziffert SCHOLLE (1998) mit Werten bis zu 0,5%. Die Lignane treten als Dragendorff-positive Zonen im Alkaloid-DC auf und wurden daher lange Zeit irrtümlich der Alkaloid-Fraktion zugerechnet [BODESHEIM (1996)].

3.2.2.5. Ätherische Öle

Aus Wurzel und Rhizom von *V. officinalis* lässt sich durch Wasserdampfdestillation ein ätherisches Öl gewinnen, das mit einem Gehalt von bis zu 1% vertreten sein kann. Das Öl besteht laut HÄNSEL et al. (1999a) überwiegend aus Monoterpenen, wie z.B. Bornylacetat, Borneol, 1,8-Cineol, Fenchon, Camphen aber auch charakteristischen Sesquiterpenen wie E- und Z-Valerenol und dessen Estern [BOS et al. (1986)], Valerenal, Valeranon, neben β-Caryophyllen, β-Bisabolon u. v. a. . Bei der Destillation treten neben den oben genannten Verbindungen noch leicht flüchtige Säuren auf, wie z.B. Isovaleriansäure, die aus Abbaureaktionen der Valeriansäure stammt [SCHNEIDER et al. (1992a)]. Letztere Säure ist auch für den charakteristischen Geruch der Baldriandrogen verantwortlich. Auch die Valerensäuren treten in geringer Konzentration im Ätherischen Öl auf.

Als Qualitätskriterium schreibt das Arzneibuch einen Mindestgehalt an ätherischem Öl für die ganze Droge von 0,5% und für die geschnittene Droge von 0,3% (V/m) vor. Nach BOS et al. (1998) ist der Gehalt an ätherischem Öl im Herbst am größten, was auch den Grund dafür darstellt, dass die Ernte zumeist im September erfolgt. Der ätherisch Ölgehalt weist auch nach HÖRNER (1989) auf ontogenetisch starke Schwankungen auf, und liegt im Durchschnitt weit unter dem geforderten Gehalt. Daher ist auf die Auswahl des Ausgangsmaterials und des Erntezeitpunktes im Hinblick auf das ätherische Öl besondere Rücksicht zu nehmen.

3.2.2.6. Weitere Inhaltsstoffe

Gerbstoffe kommen in der Gattung *Valeriana* nicht vor [SCHNEIDER et al. (1992a)], dafür aber eine Anzahl von polaren Säuren wie Chlorogensäure, Kaffeesäure und Isoferulasäure (Hesperitinsäure). Isoferulasäure ist charakteristisch für den officinellen Baldrian [STOLL et al. (1956)], und kann daher für den dünnschichtchromatographischen Qualitätsnachweis wässriger Baldrianextrakte benutzt werden [KALLMANN (1987)].

Weitere Inhaltsstoffe der hydrophilen Fraktion stellen Aminosäuren dar. Neben Glutamin, Alanin, Aspartat, Glutamat, Serin, Arginin, Valin, Phenylalanin, Isoleucin und Leucin wurde ein hoher Gehalt an γ -Aminobuttersäure beschrieben [HÄNSEL et al. (1981), LAPKE (1997)]. Mit einem Gehalt von 0,3% ist Cholin als weitere stickstoffhaltige Verbindung enthalten [SZENTPETERY et al. (1963)].

Von VOLK (1964) wurden bis zu 10% lösliche Kohlenhydrate gefunden, die als Fructose 0,9%, Glucose 1,5%, Saccharose 5% und Raffinose 3% identifiziert wurden. Ein Polyacetylen, Tridecen(1)-penta(3,5,7,9,11) wurde von SCHULTE et al. (1964) als weiterer Inhaltsstoff für Baldrianwurzel beschrieben, der nur in geringen Mengen vorliegt.

Bei GODAU (1991) findet sich eine Übersicht über weitere charakteristische nicht näher beschriebene Inhaltsstoffe, wie Harze und Gummen, Schleime, Eiweiße und zahlreiche Enzyme wie Katalase, Oxydase, Peroxydase, Lipase und Linamarase.

3.2.3. Indikationen und Anwendung der Baldriandroge

Wegen seines starken Geruches galt Baldrian im Volksglauben lange Zeit als zauberabwehrendes Kultmittel, und wurde als Schutz vor Hexen und bösen Geistern aufgehängt [RÄTSCH (1998); HILLER und MELZIG (2000)]. Die heutige Nutzung als mildes Sedativum wurde erst Mitte des 18. Jh. erkannt [HÖLZL (1996)].

In Monographien von 1985 mit Ergänzung von 1990 wird die Droge von der Kommission E als positiv für die Anwendung bei Unruhezuständen und nervös bedingten Einschlafstörungen bewertet [BUNDESANZEIGER (1985)]. Die ESCOP (1997) erweiterte diese Indikationen auf Rastlosigkeit und Erregbarkeit. Die postulierte Wirkung von Baldrianpräparaten konnte in mehreren placebokontrollierten klinischen Studien eindeutig belegt werden [Übersichten bei SCHULZ und HÄNSEL (1996) und STEVINSON und ERNST (2000)]. Neben der deutlichen Verbesserung nicht-organischer Schlafstörungen kann als zusätzlicher Parameter eine Veränderung des Ruhe-EEGs nach mehrmaliger Einnahme von Baldrianpräparaten festgestellt werden [DONATH et al. (2000); SCHULZ et al. (1995)]. Die dabei am häufigsten eingesetzten Trockenextrakte sind nach JÄNICKE et al. (2003a) 70% ethanolische Extrakte mit einem DEV von 3-7:1, die in Tagesdosen von 400-600 mg zum Einsatz kommen. Die

ESCOP-Empfehlung (1997) beläuft sich auf 2-3 g Droge pro Tasse als Tee, entsprechend 500-1200 mg Trockenextrakt. Verstärkende Wirkung der Baldrianpräparate können nach FINTELMANN et al. (2002) durch Kombination mit Hopfen und Melisse beobachtet werden. So findet sich Baldrianwurzel auch in den Beruhigungstees I-VIII der STANDARDZULASSUNGEN (2000) wieder. Alternativ dazu ist dort die Anwendung als Vollbad mit 100 g Droge vorgeschlagen.

Trotz der klinischen Bestätigung der therapeutischen Effekte ist eine eindeutige Zuordnung der sedierenden Wirkung zu einem definierten Inhaltsstoff bisher nicht gelungen. Eine Vielzahl der Inhaltsstoffe wurde mittels in vitro- und in vivo-Modellen getestet. Die Ergebnisse führten zu teils widersprüchlichen Schlussfolgerungen, die die für den Extrakt nachgewiesenen Wirkungen nicht erklären können [HÄNSEL et al. (1999a); WAGNER (1999a); BODESHEIM (1996)]. Die am besten untersuchten Verbindungen sind die Valepotriate, die auch von toxikologischem Interesse sind, da alkylierende [BRAUN et al. (1982)] und potentiell lebertoxische [BOUNTANH et al. (1984)] Wirkungen in vitro nachgewiesen werden konnten. Ein mögliches cancerogenes Risiko bei der Anwendung konnte aber ausgeschlossen werden, da die Valepotriate auf Grund ihrer Labilität schnell abgebaut werden und das Vorliegen in relevanter Konzentration in den meisten Fertigpräparaten oder Teeauszügen ohnehin nicht gegeben ist [BRAUN et al. (1984), DIECKMANN (1988)]. Ergänzend konnte FINK (1982) nachweisen, dass sich die Valepotriate in künstlichem Magensaft nach 30 min zu 50% zu den unter 3.2.5.1 dargestellten Produkten abgebaut wurden.

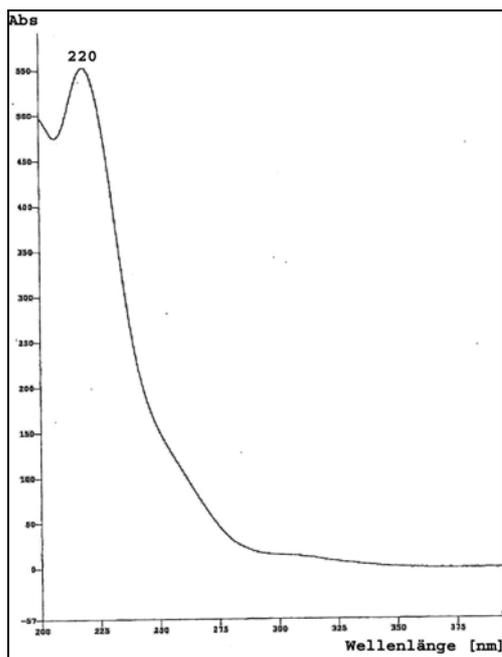
Die Zuordnung der Baldrianextrakte im Rahmen der neuen PH.EUR. (2002e) Monographie „Extrakte“ muss demnach auf Grund des Fehlens von wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen oder eines Bereichs von Inhaltsstoffen in die Kategorie 3 der sogenannten „anderen Extrakte“ gemacht werden. Nicht zuletzt unter diesem Gesichtspunkt ist die Bedeutung der Standardisierung des Herstellungsverfahrens und die Qualitätskontrolle für alle Baldrianextrakte des Handels evident.

3.2.4. Charakterisierung des Ausgangsmaterials

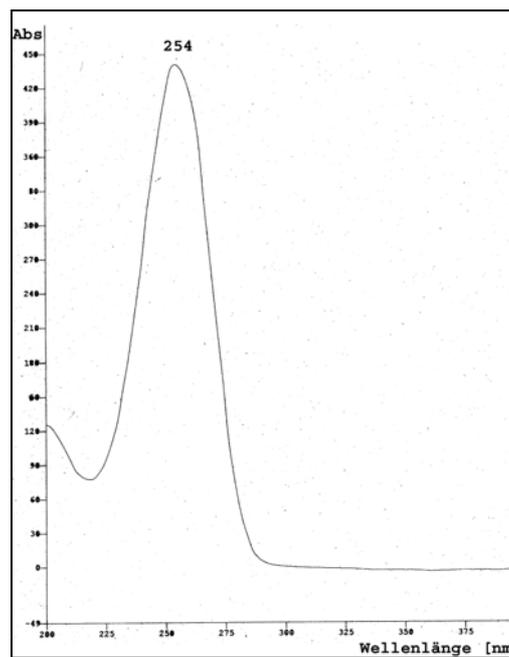
3.2.4.1. *Entwicklung einer HPLC-Methode*

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Baldrian-Inhaltsstoffe sind bereits HPLC-Methoden entwickelt worden, bei denen sich die Erfassung lediglich auf die Cyclopentanesquiterpene und Valepotriate [TITTEL et al. (1978) ; BOS et al. (1998) (1996) ; DOSSAJI et al. (1981) ; LAZAROWYCH et al. (1998) ; HÄNSEL et al. (1982) ;GORBATO et al. (1996) ; FREYTAG (1983)] oder Lignane [BODESHEIM (1996); SCHOLLE (1998)] beschränkt. Daher sollte eine HPLC-Methode entwickelt werden, die nicht nur eine Bestimmung der Valerensäuren und Valepotriate zulässt, sondern auch ein größeres Spektrum an eventuell stabilitätsrelevanten Inhaltsstoffen erfassbar macht. Die zu diesem Zweck neu entwickelte Methode basiert auf einer Acetonitril / Wasser-Gradientenelution an RP 18 Säulen (zeitlicher Verlauf siehe 5.5.4.1). Um auch die polareren Inhaltsstoffe zu erfassen, musste ein flacher Gradient gewählt werden. Die erforderliche Ausweitung des erfassbaren Substanzspektrums führte zu einer Entwicklungszeit von ca. 100min, was für den Einsatz bei Stabilitätsuntersuchungen als relativ zeitaufwendig zu bewerten ist.

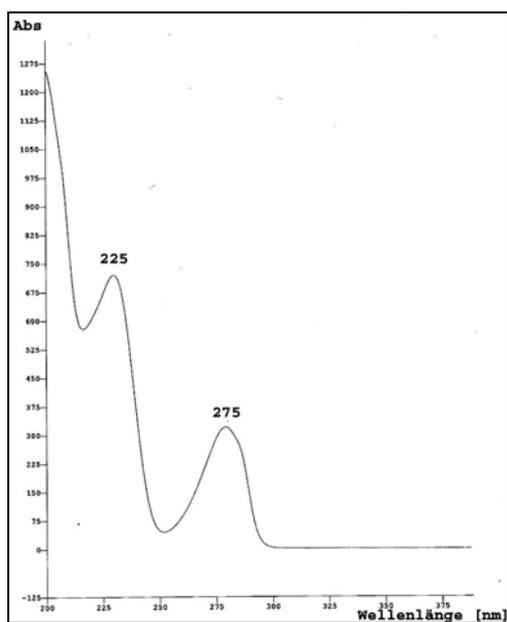
Abb. 12 stellt ein typisches HPLC-Fingerprint pulverisierter Baldrianwurzel dar. Durch DAD-UV Detektion wurde eine Zuordnung der meisten Peaks anhand der charakteristischen Spektren zu den verschiedenen Substanzgruppen möglich (Abb. 11). Die Valerensäuren sind durch ein Maximum bei ca. 220 nm charakterisiert (Peaks 12, 13, 14), Dien-Valepotriate hingegen absorbieren maximal bei ca. 254 nm (Peaks 15, 16) [BOS et al. (1996)]. Die Lignane zeichnen sich durch ein Maximum bei 225 nm und eine zweite schwächere Absorption bei ca. 275 nm aus (Peaks 3, 4, 5, 6, 7, 8,10,11) [BODESHEIM (1996)].



Valerensäuren



Valepotriate



Lignane

Abb. 11: Typische UV-Spektren der einzelnen Substanzgruppen in *Valeriana officinalis*

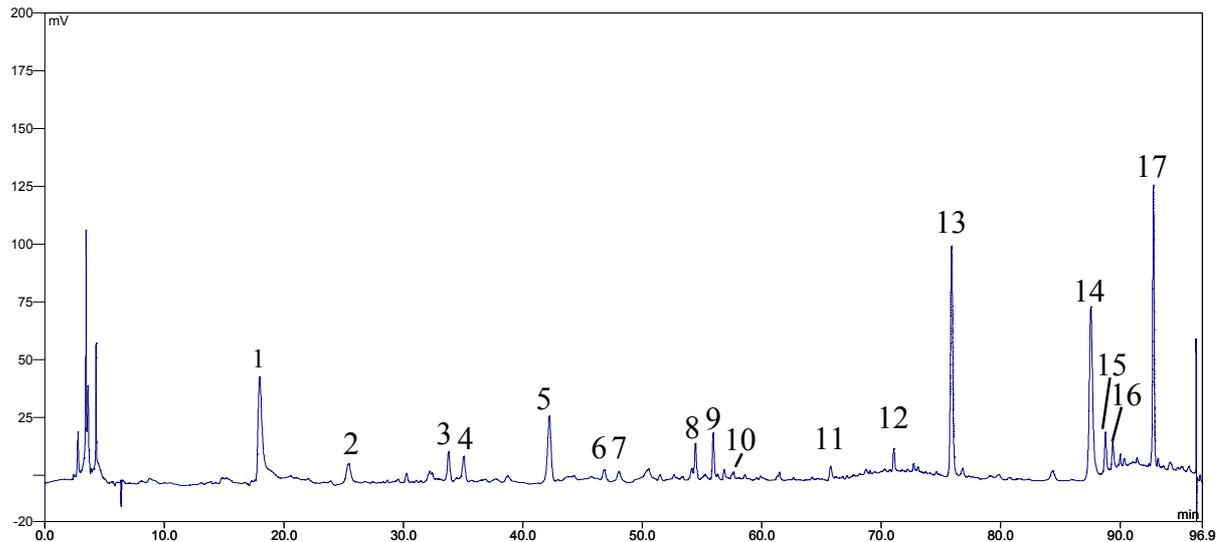


Abb. 12: HPLC-Fingerprint eines Extraktes aus Baldrianwurzel nach Trennung mittels Gradient 1

Die weitere Absicherung der Identität erfolgte entweder durch Coelution mit einer Referenzsubstanz (Valerensäure) oder nach Isolation und anschließender Untersuchung durch MS (Hydroxyvalerensäure, Acetoxyvalerensäure, Pinioresinol, Hydroxypinioresinol, Pinioresinoldiglycosid, Hydroxypinioresinoldiglycosid) und NMR (Pinioresinol, Pinioresinoldiglycosid)(vgl. 3.2.8). Auf Grund ihrer eindeutigen UV-Spektren lassen sich die Peaks 15 und 16 den Valepotriaten zurechnen. Eine Coelution mit einem valepotriatreichen Extrakt aus *Valeriana edulis*, der hauptsächlich aus Isovaltrat und Valtrat bestand, bestätigte diese Vermutung. Anhand des Peakflächen-verhältnisses ließ sich ableiten, dass Peak 15 vermutlich dem Isovaltrat, Peak 16 dem Valtrat zuzuordnen ist. Die Zuordnung aller identifizierter Peaks ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Für die Validierung der HPLC-Methode wurden als Standardsubstanzen Valerensäure und Pinioresinol benutzt, und die Methode auf Reproduzierbarkeit, Selektivität, Bestimmungsgrenzen und Linearität hin überprüft (vgl. 5.5.4.1.).

Peak-Nr.	t _R [min]	Identität der Verbindung	MW	ESI neg [M-H] ⁻	UV- Maxima [nm]	Stoffgruppen- Zugehörigkeit
1	17.96	n.b.				
2	25.41	n.b.				
3	33.78	n.b.			225,277	Lignan ⁴⁾
4	35.05	n.b.			225,277	Lignan ⁴⁾
5	42.22	Pinoresinol-diglucosid ³⁾	682	681,3	225,276	
6	46.8	n.b.			225,277	Lignan ⁴⁾
7	48.05	Hydroxypinoresinol-glucosid ³⁾	536,2	535,2	227,277	
8	54.45	n.b.			227,277	Lignan ⁴⁾
9	55.94	n.b.				
10	57.72	Hydroxypinoresinol ²⁾	374	373,1	227,277	
11	65.76	Pinoresinol ³⁾	358	356,9	230,279	
12	71.06	Hydroxyvalerensäure ²⁾	250	248,9	219	
13	75.89	Acetoxyvalerensäure ²⁾	292	291,0	217	
14	87.55	Valerensäure ¹⁾	234	232,9	217	
15	88.78	n.b.			254	Valepotriat ⁴⁾
16	89.39	n.b.			254	Valepotriat ⁴⁾
17	92.79	Valerenal ⁴⁾			229	

Tabelle 1: Zuordnung der Peaks im HPLC-Fingerprint von Baldrianwurzel

¹⁾ identifiziert durch Coelution mit Referenzsubstanzen

²⁾ identifiziert nach Isolation durch MS siehe 3.2.7.3

³⁾ identifiziert nach Isolation durch MS und ¹H-NMR siehe 3.2.7.2

⁴⁾ Zuordnung zu Inhaltsstoffgruppen anhand der UV-Spektren

3.2.4.2. Quantitative Unterschiede der wichtigsten Inhaltsstoffe in Baldrian-Droge und Extrakten

Vor Beginn der Stabilitätsuntersuchungen wurden die Einsatzdroge und die vorhandenen Extrakte mittels der HPLC-Methode (5.5.4.1) auf ihr Inhaltsstoffspektrum hin untersucht. Die ermittelten Werte dienten als Bezugswerte für die nachfolgenden Veränderungen im Gehalt der jeweiligen Verbindungen. Als Untersuchungsmaterial standen arzneibuchkonforme pul-

verisierte Baldrianwurzel, je ein methanolischer und ein ethanolischer Trockenextrakt des Handels, und zwei selbst hergestellte, native ethanolische Extrakte zur Verfügung.

Die Bestimmung der Valerensäuren (Abb. 13) mit Valerensäure als Standardreferenz ergab einen Anteil von Hydroxyvalerensäure von unter 3% am Gesamtgehalt an Valerensäuren für die Ausgangsdroge und 3-6,5% für die Extrakte. Der Gesamtvalerensäuregehalt, berechnet als Valerensäure, in der Ausgangsdroge bewegt sich mit 0,37% in dem von BOS et al. (1998) postulierten Intervall. Die untersuchten Extrakte erreichen die zwei bis dreifache Menge an Valerensäuren, wobei die ethanolischen Extrakte höherer Konzentration als Auszugsmittel mit bis zu 0,9% die Maximalwerte repräsentieren.

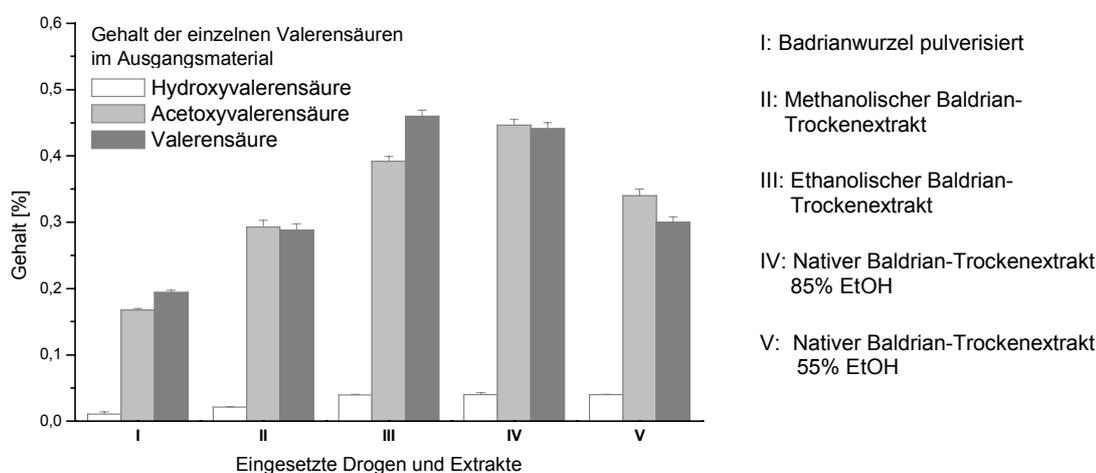


Abb. 13: Gehalt an Valerensäuren in Ausgangsdroge und den untersuchten Extrakten berechnet als Valerensäure

In die Gehaltsbestimmung der Lignane (Abb. 14) wurden die Flächen aller Peaks einbezogen, deren UV-Spektrum die oben genannten typischen Maxima von 225 und 275 nm aufwies, auch wenn nicht zu allen die Identität zweifelsfrei geklärt wurde. Der ermittelte Gesamtgehalt an Lignan der Ausgangsdroge berechnet als Pinoresinol lag mit 0,59% etwas über dem von BODESHEIM (1996) postulierten Gehalt. Die Extrakte wiesen unabhängig von den jeweiligen Extraktionsbedingungen einen nahezu einheitlichen Lignan-Gehalt von ca. 2% auf. Lediglich der ethanolische Extrakt (55% EtOH) lag mit 1,6% Lignan-Gehalt deutlich niedriger.

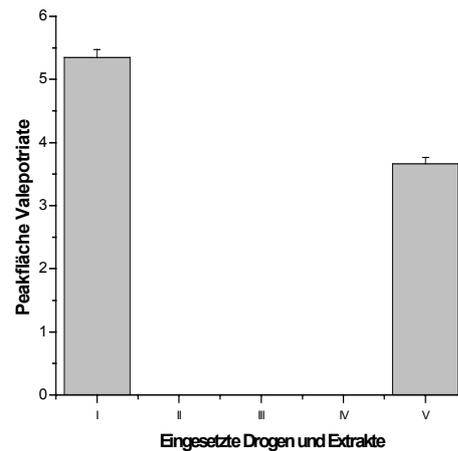
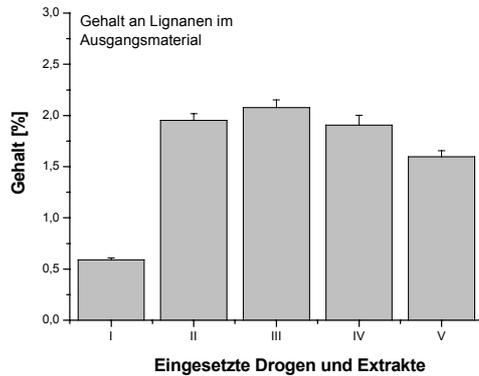


Abb. 14: Gehalt an Gesamtignanen in Einsatzdroge und den eingesetzten Extrakten berechnet als Pinoselin

Abb. 15: Peakflächen der Valepotriate in pulverisierter Baldrianwurzel und den untersuchten Extrakten

I: Baldrianwurzel pulverisiert; II: Methanolischer Baldrianwurzel-trockenextrakt; III: Ethanolischer Baldrianwurzel-trockenextrakt; IV: Nativer ethanolischer Baldrianwurzel-trockenextrakt 85% EtOH; V: Nativer ethanolischer Baldrianwurzel-trockenextrakt 55% EtOH

Für die Valepotriate sind keine Gehaltsvergleiche erstellt worden, Abb. 15 soll lediglich die Anteile der Valepotriate respektive das Nichtvorhandensein in den Extrakten darstellen. Während in der Einsatzdroge eine noch nachweisbare Menge an Valepotriaten vorliegt, werden in den handelsüblichen Baldrianextrakten keine Valepotriate gefunden. Das Fehlen dieser Substanzen liegt ihrer Empfindlichkeit gegen erhöhte Temperatur und Feuchtigkeit begründet, so dass sie während des Extraktions- und Trocknungsprozesse abgebaut werden (vgl. 3.2.2.2). Lediglich im nativen Baldrianwurzelextrakt, der mit 85% Ethanol extrahiert wurde, sind Valepotriate nachweisbar. Der Grund könnte in der großen Menge an extrahierten Valepotriaten liegen, die auf Grund der weniger polaren Zusammensetzung des Extraktionsmediums in stärkerem Maße extrahiert wurden, und sich noch nicht komplett zersetzt haben.

In Abb. 16 sind die Gehalte an ätherischem Öl für die Einsatzdroge und die untersuchten Extrakte aufgezeigt. Die vorgeschriebene Destillation nach Arzneibuch [PH.EUR. (2002b)] sollte sicherstellen, dass die pulverisierte Einsatzdroge mit 0,42% Gehalt an ätherischem Öl den Anforderungen des Arzneibuches von mindestens 0,3% Gehalt entspricht. Der Gehalt an ätherischem Öl bei den Extrakten ist, bedingt durch die polare Vorextraktion deutlich geringer.

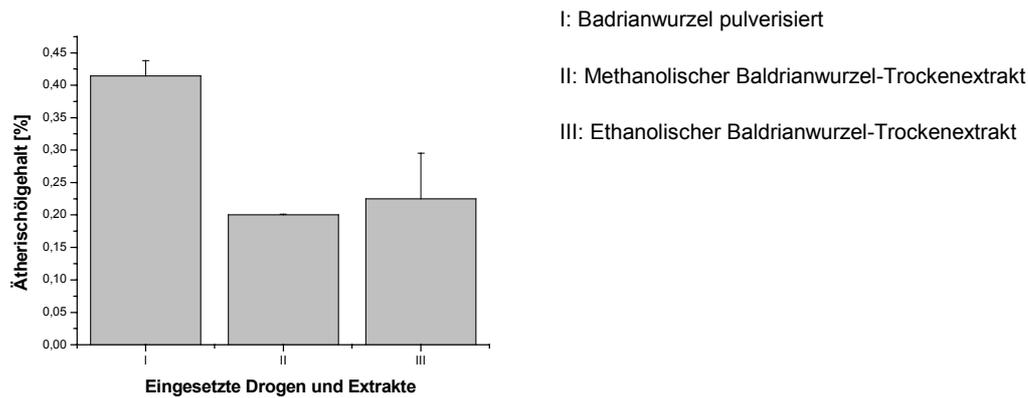


Abb. 16: Gehalt an ätherischem Öl in Baldriandroge und Extrakten zu Beginn der Einlagerung

3.2.4.3. Pulvereigenschaften des Untersuchungsmaterials

Um die physikalischen Veränderungen unter Stressbedingungen beobachten zu können, wurde das Ausgangsmaterial auf seine Pulvereigenschaften hin charakterisiert.

Die Ermittlung des Trocknungsverlustes als Qualitätskriterium für die pulverisierte Baldriandroge nach PH.EUR. (2002c) ergab einen Wert von 10,7%, was deutlich unter den maximal erlaubten 12% lag. Nach der Siebanalyse [PH.EUR. (2002d)] konnte die Korngrößenverteilung des Pulvers dargestellt werden (Abb. 17). Die grafische Auswertung zeigt, dass die Korngrößen keiner Normalverteilung gehorchen, sondern auf dem Sieb mit der Maschenweite von 150µm ein, im Verhältnis zu den anderen Fraktionen, größerer Rückstand feinpulvri-ger Zusammensetzung verblieben ist.

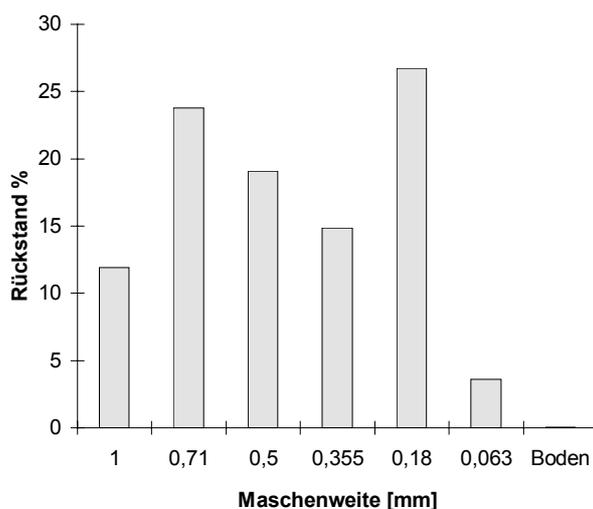


Abb. 17: Korngrößenverteilung der pulverisierten Baldrianwurzel

Für Trockenextrakte fordert das europäische Arzneibuch [PH.EUR.(2002e)] einen maximalen Trocknungsverlust von 5%. Die eingesetzten handelsüblichen Extrakte sind daher mit 4,13% (Val.ex.sicc.) und 4,14% (Val.ex.spir.sicc.) arzneibuchkonform. Die Wassergehaltsbestimmung nach Karl Fischer, wie sie in der Monographie des Baldrianwurzel-trockenextraktes [DAB (2002)] vorgeschlagen ist, würde zwar aussagekräftigere Werte liefern, ist aber auf Grund des zeitlichen Aufwands für die nachfolgenden Stabilitätstests nicht geeignet. Die nativen Extrakte konnten aufgrund des Fehlens von trocknungsverbessernden Hilfsstoffen nicht ausreichend getrocknet werden und lagen mit Trocknungsverlusten von 6,95% beim 55%-ethanolischen und 8,13% beim 85%-ethanolischen Extrakt über dem vom Arzneibuch geforderten Wert.

Die Siebanalyse der handelsüblichen Trockenextrakte lieferte eine homogenere Verteilung als dies bei der pulverisierten Droge der Fall war (Abb. 18 und 19). Die Partikelgröße ist jeweils durch zwei dominante Maschenweiten charakterisierbar. Die nativen Extrakte stellten sich als derart hygroskopisch heraus, dass bereits kurz nach der Trocknung Verklumpung eintrat und somit eine Erfassung der Korngrößenverteilung nicht möglich war.

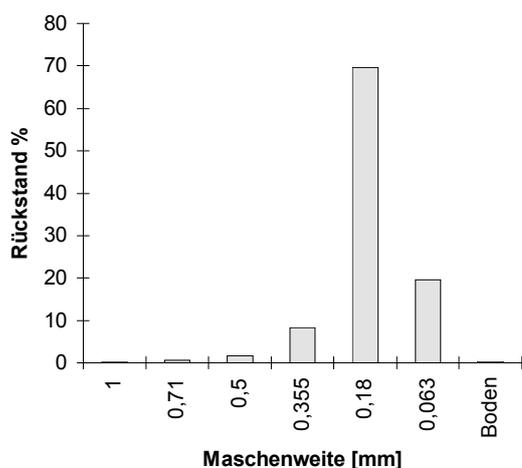


Abb. 18: Korngrößenverteilung des methanolischen Baldrian-Trockenextraktes

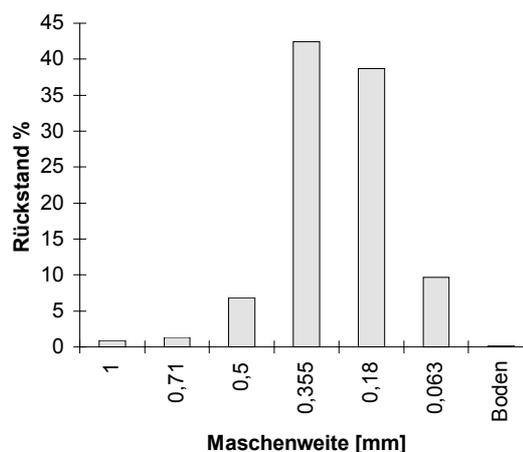


Abb. 19: Korngrößenverteilung des ethanolischen Baldrian-Trockenextraktes

3.2.5. Stabilitätsuntersuchungen: Baldrianwurzel

3.2.5.1. Vorliegende Untersuchungen zur Stabilität von Baldrianwurzel

Bereits THIES (1969) beschrieb die Abbaureaktionen der Valepotriate unter dem Einfluss von Säuren oder Enzymen. Dabei konnte er zeigen, dass Valepotriate der Diengruppe nach der Ester-Hydrolyse zu Baldrinalen abgebaut werden, oder im stark sauren Milieu über Hydrine zu blauen Cyclopentapyryliumsalzen reagieren (Abb. 20), was zum Identitätsnach-

weis genutzt werden kann (Halazuchromreaktion). Im Falle des Valtrats und Acevaltrates wird Baldrinal gebildet, während Isovaltrat zu Homobaldrinal degradiert wird. Die Valepotriate der Monoen-Reihe können hingegen nicht zu Baldrinalen abgebaut werden.

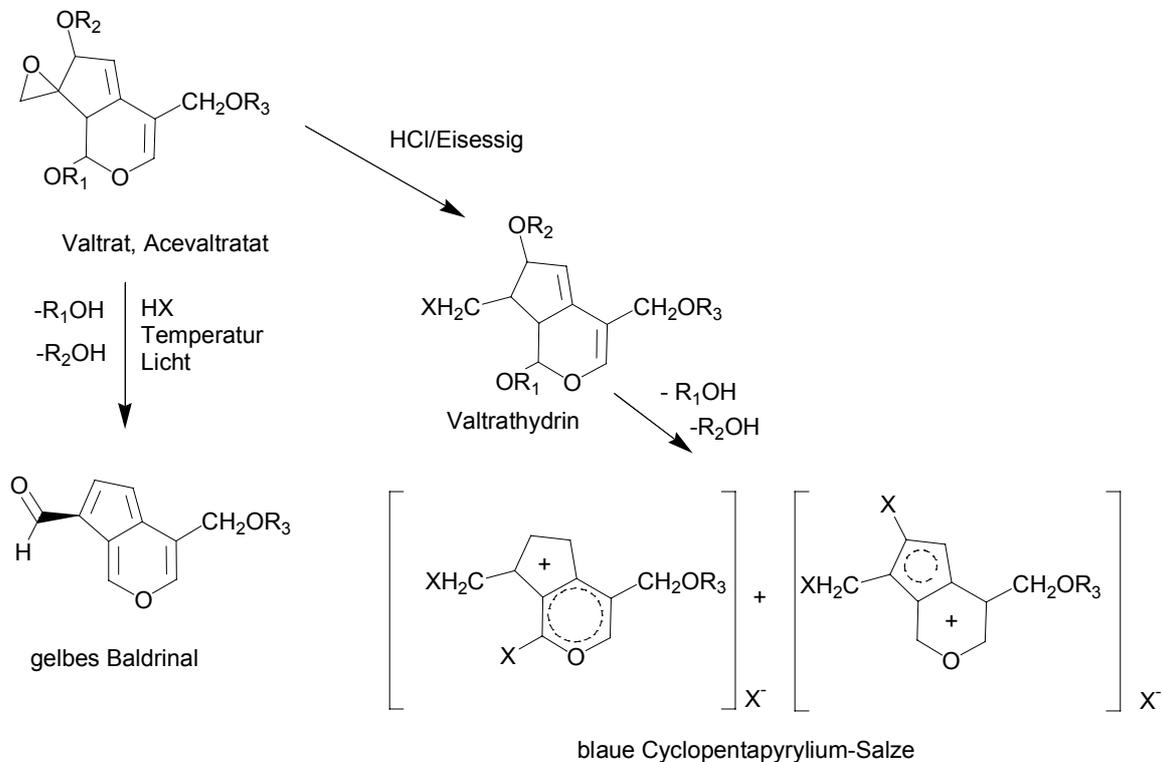


Abb. 20: Reaktionsschema des Abbaus der Valepotriate nach THIES (1969)

Als isolierbares Zwischenprodukt konnte WILLEMS (1980) eine Verbindung isolieren, die er Valtroxal nannte (Abb. 21). Von THIES (1969) wird als weitere Möglichkeit des Abbaus der Valepotriate die Umwandlung in Polyaldehyde (Abb. 22) oder die völlige Verharzung der Alkohole zu braunschwarzen Niederschlägen postuliert.

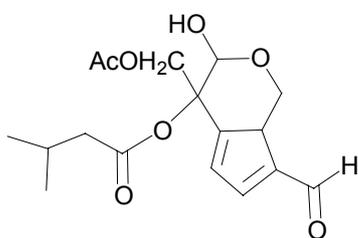


Abb. 21: Valtroxal nach WILLEMS (1980)

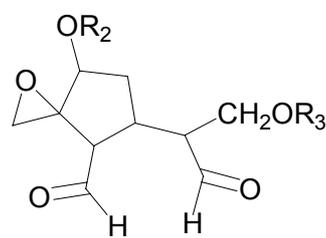


Abb. 22: Polyaldehyd nach THIES (1969)

Dass diese Abbaureaktionen außerordentlich schnell ablaufen, bestätigt GODAU (1991), der bereits während des Auftragens von Valepotriatlösungen bei Tageslicht auf die DC-Platte einen deutlichen Abbau erkennen konnte, nachdem zusätzlich deutlich gelbe Flecken

(Baldrinale) während der Trennung auftraten. Eine zweidimensionale DC-Methode zum Nachweis dieser photooxidativen Zersetzung der Valepotriate stellen ADAM und BECKER (2000) vor. Nach dem Prinzip der Trennung-Reaktion-Trennung (TRT-Technik) werden die Valepotriate zunächst getrennt und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Nach einer zweiten Trennung in orthogonaler Richtung können die lichtempfindlichen Inhaltsstoffe und die resultierenden Abbauprodukte detektiert werden. Die von BOS et al. (1996) untersuchte Stabilität von Valepotriaten in Lösung erwies sich auch als außerordentlich gering. Bei Kühlschrankaufbewahrung waren nach einem Monat Lagerung bereits 65% der Ausgangsmenge zersetzt worden. Bei 36°C konnten bereits nach 2 Wochen keine Valepotriate mehr nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass diese Zersetzung nur in Anwesenheit von Wasser in der Lösung ablief. Rein ethanolische Lösungen zeigten sich stabil. Gleichzeitig mit der Zersetzung konnte im HPLC-Chromatogramm eine Zunahme von Baldriinalen festgestellt werden.

Durch die Hydrolyse der Valepotriate führt eine vermehrte Freisetzung von Isovaleriansäure gleichzeitig zu einer Verstärkung des unangenehmen Geruches bei überalterten Drogen [SCHNEIDER et al. (2002a)].

Auch KIEFL (1998) konnte in seiner Arbeit über die Veränderung der Baldrianwurzel während der Lagerung bei 25°C / 60% rF eine deutliche Abnahme der Valepotriate in geschnittener Droge beobachten. Als Stabilitätsparameter benutzte er das Verhältnis von Isovaltrat zu Valerensäure, das innerhalb eines Jahres von 3:1 auf 1:1 abnahm. Nach einem weiteren Jahr der Lagerung waren keine Valepotriate mehr zu messen. Die bei Raumtemperatur gelagerte Ganzdroge hingegen wies auch nach zwei Jahren der Lagerung noch deutlich messbare Anteile an Valepotriaten auf.

Weiterhin untersuchte KIEFL (1998) die Abnahme der Valerensäuren an zwei Messzeitpunkten und konnte dabei einen Verlust von 30% an Valerensäure und 25% Acetoxyvalerensäure nach einer Lagerung über zwei Jahre von geschnittener Droge in Weißblechdosen feststellen. Eine zweite Charge ergab eine Abnahme von 18% Valerensäure und 20% Acetoxyvalerensäure. Bei pulverisierter Droge verlief der Verlust an Valerensäuren deutlich stärker, mit einer Abnahme von 60% der Acetoxyvalerensäure und 70% an Valerensäure.

Der Gehalt an ätherischem Öl nahm bei der Lagerung unter 25°C / 60% rF linear ab und fiel bei geschnittener Droge im Laufe von zwei Jahren auf maximal 82% des Ausgangsgehaltes. Stärkere Abnahmen zeigten analog der Betrachtung der Valerensäuren die pulverisierten Proben. Hier zeigte sich bei Lagerung in Papierbeuteln eine Abnahme von 33%, bei Lagerung in Blechdosen sogar um 55% am Ätherischöl-Gehalt.

3.2.5.2. Vorausgehende Untersuchungen

IM Vorfeld wurde pulverisierte Baldrianwurzel bei 70°C im Trockenschrank eingelagert und mittels HPLC auf auftretende Abbauprodukte untersucht. Dabei zeigten alle Inhaltsstoffe deutliche Abnahme außer Hydroxyvalerensäure, Pinoresinol und Hydroxypinoresinol, die zunehmende Peakflächen aufwiesen (Abb. 23).

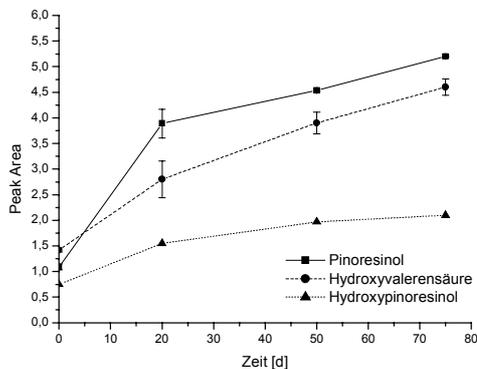


Abb. 23: Zunehmde Peaks unter der Lagerung bei 70°C

Die Hydroxyvalerensäure stellt das Abbauprodukt der Acetoxyvalerensäure dar. Pinoresinol und Hydroxypinoresinol sind Aglyka der für Baldrianwurzel beschriebenen Lignanglykoside. Als empfindlichste Strukturen gegenüber den Lagerungseinflüssen sind demnach die vorhandenen Ester- und Glykosidbindungen einzustufen.

3.2.5.3. Ergebnisse der HPLC Untersuchungen

Alle HPLC-Untersuchungen wurden nach der unter 3.2.4.1 beschriebenen Methode durchgeführt.

Der erste wichtige Parameter stellt die quantitative Erfassung der Cyclopentan-Sesquiterpene dar. In den Abb. 24, Abb. 25 und Abb. 26 ist der zeitliche Verlauf der Peakflächen der drei Valerensäuren für die drei Klimazonen grafisch dargestellt. Hieraus wird deutlich, dass für jede der drei Säuren ein charakteristischer Verlauf abgeleitet werden kann, der konkrete Aussagen über die Stabilität des Materials zulässt. Als die stabilste Verbindung stellt sich die Valerensäure dar (Abb. 24). Es kann eine Abnahme über 18 Monate von etwa 20%, unabhängig von den Einlagerungsbedingungen festgestellt werden. Zu einem ähnlichen Wert kam KIEFL (1998) bei seinen Untersuchungen an eingelagerter Baldrianwurzel.

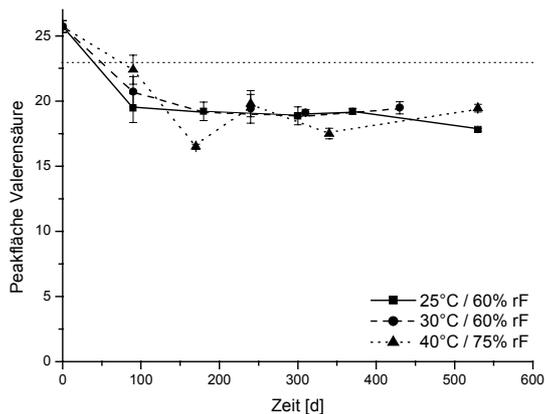


Abb. 24: Abbau der Valerensäure in pulverisierter Baldrianwurzel (gepunktete Linie gibt eine Veränderung von 10% zum Ausgangswert wieder)

Die Valerensäure zeigt keine unterschiedliche Empfindlichkeit unter den verschiedenen Lagerungsbedingungen. Anders verhält es sich bei der Acetoxyvalerensäure (Abb. 25), die angesichts des Vorhandenseins einer Esterbindung eine labilere Struktur aufweist. Diese Tatsache spiegelt sich in einer lagerbedingungs-abhängigen Abnahme der Peakfläche über die Zeit wieder. Während bei 25°C / 60% rF lediglich eine Abnahme von ca. 40% zu beobachten war, belief sich die Abnahme bei gleicher Lagerzeit bei 40°C / 75% rF auf ca. 70 %

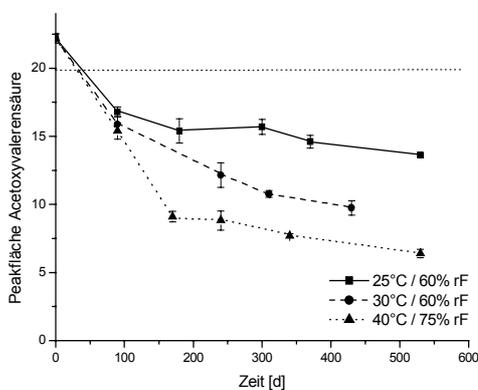


Abb. 25: Abbau der Acetoxyvalerensäure in pulverisierter Baldrianwurzel

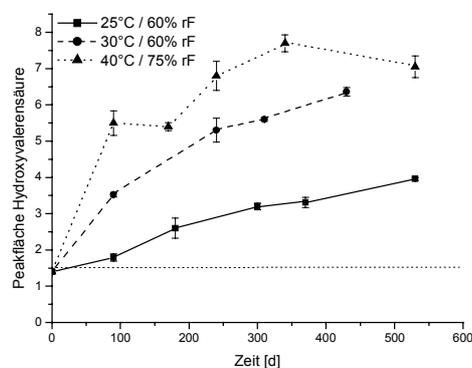


Abb. 26: Zunahme der Hydroxyvalerensäure in pulverisierter Baldrianwurzel

(gepunktete Linie gibt eine Veränderung von 10% zum Ausgangswert wieder)

Noch deutlicher werden die Unterschiede bei der Zunahme des Abbauproduktes Hydroxyvalerensäure aus der Esterhydrolyse der Acetoxyvalerensäure. Bei 25°C / 60% rF ist eine Steigerung um 180% zum Ausgangswert, hingegen bei 40°C / 75% bei gleicher Lagerzeit auf über 400% nachweisbar. Für den Verlauf der Hydroxyvalerensäure ist bei dieser Temperatur zu vermuten, dass bereits nach 350 Tagen ein Maximum überschritten ist, und dass von diesem Zeitpunkt an neben der Zunahme als Abbauprodukt die Degradation dieser

von diesem Zeitpunkt an neben der Zunahme als Abbauprodukt die Degradation dieser Verbindung relevant wird (Abb. 26).

Betrachtet man den Gehalt an Gesamtvalerensäuren für die drei Einlagerungsbedingungen im Vergleich zum Ausgangswert (aus Abb. 27 ist die Situation nach ungefähr 12 Monaten ersichtlich) und den darin enthaltenen Prozentsatz an Hydroxyvalerensäure ergibt sich eine interessante Tatsache: Der Gesamtgehalt an Valerensäuren ist, unabhängig von den Lagerbedingungen, nahezu gleich, was bei alleiniger Betrachtung des Gesamtgehaltes zu der Annahme verleiten kann, dass die Stabilität unter allen Einlagerungsbedingungen gleich ist. Dass dies ein Irrtum ist, zeigt die deutlich lagerbedingungsabhängige Zunahme der Hydroxyvalerensäure (dunkler Flächenanteil) am Gehalt der Gesamtvalerensäuren.

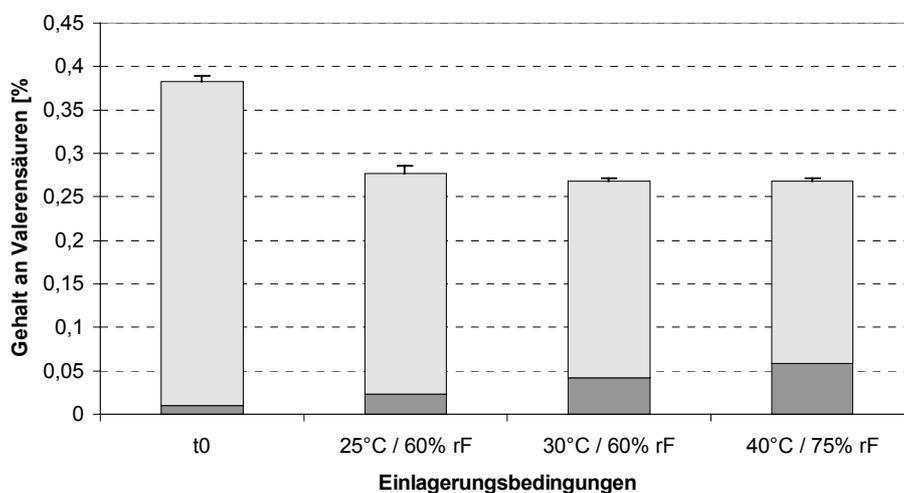


Abb. 27: Anteil der Hydroxyvalerensäure (dunkler Flächenanteil) am Gehalt der Gesamtvalerensäuren (berechnet als Valerensäure) in pulverisierter Baldrianwurzel nach einer Lagerungszeit von 300 Tagen

Die alleinige Betrachtung der Gesamtvalerensäuren (Abb. 28) zeigt in den ersten 150 Tagen unter allen klimatischen Bedingungen einen Abfall auf ca. 70% des Ausgangswertes. Dieser Wert bleibt für den anschließenden Beobachtungszeitraum konstant, wobei sich in der Folge Abbau und Zunahme der Abbauprodukte die Waage halten. Der von der PH.EUR (2002a) geforderte Mindestgehalt von 0,17% Sesquiterpensäuren wurde für alle Einlagerungsbedingungen bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes eingehalten.

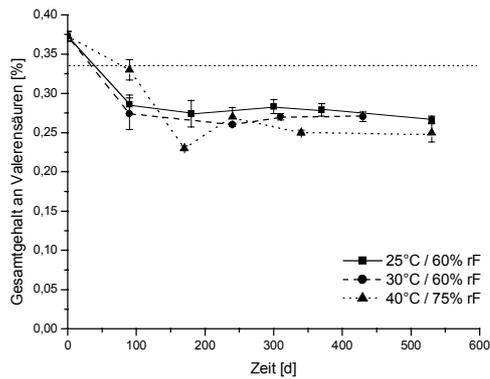


Abb. 28: Verlauf des Gehaltes der Gesamtvalerensäuren in pulverisierter Baldrianwurzel (gepunktete Linie verdeutlicht eine Abnahme um 10% im Gehalt)

Der Vergleich des relevanten Bereiches der Fingerprint-Chromatogramme bestätigt die oben aufgeführten Veränderungen (Abb. 29). Interessant sind dabei die Peaks bei einer Retentionszeit von 58 min bzw. 68 und 71 min. Der Peak bei 71 min repräsentiert die Hydroxyvalerensäure, die im Vergleich zum Ausgangswert stark zugenommen hat. Die Acetoxyvalerensäure (bei 76 min) hat dagegen signifikant abgenommen, während die Valerensäure (bei 88min) sich in der Fläche nur geringfügig verändert. Im Chromatogramm der degradierten Probe zeigen sich, wie bereits erwähnt, noch zwei weitere Peaks bei 58 min und 68 min, die im Ausgangsmaterial kaum sichtbar sind. Es handelt sich um die Peaks 10 und 11, die in den nachfolgenden Untersuchungen als die von BODESHEIM (1996) beschriebenen Lignan-aglyka Hydroxypinoresinol und Pinoresinol identifiziert werden konnten (vgl. 3.2.7), so dass infolgedessen eine Auswertung der Veränderungen im Lignanspektrum als sinnvoll erschien.

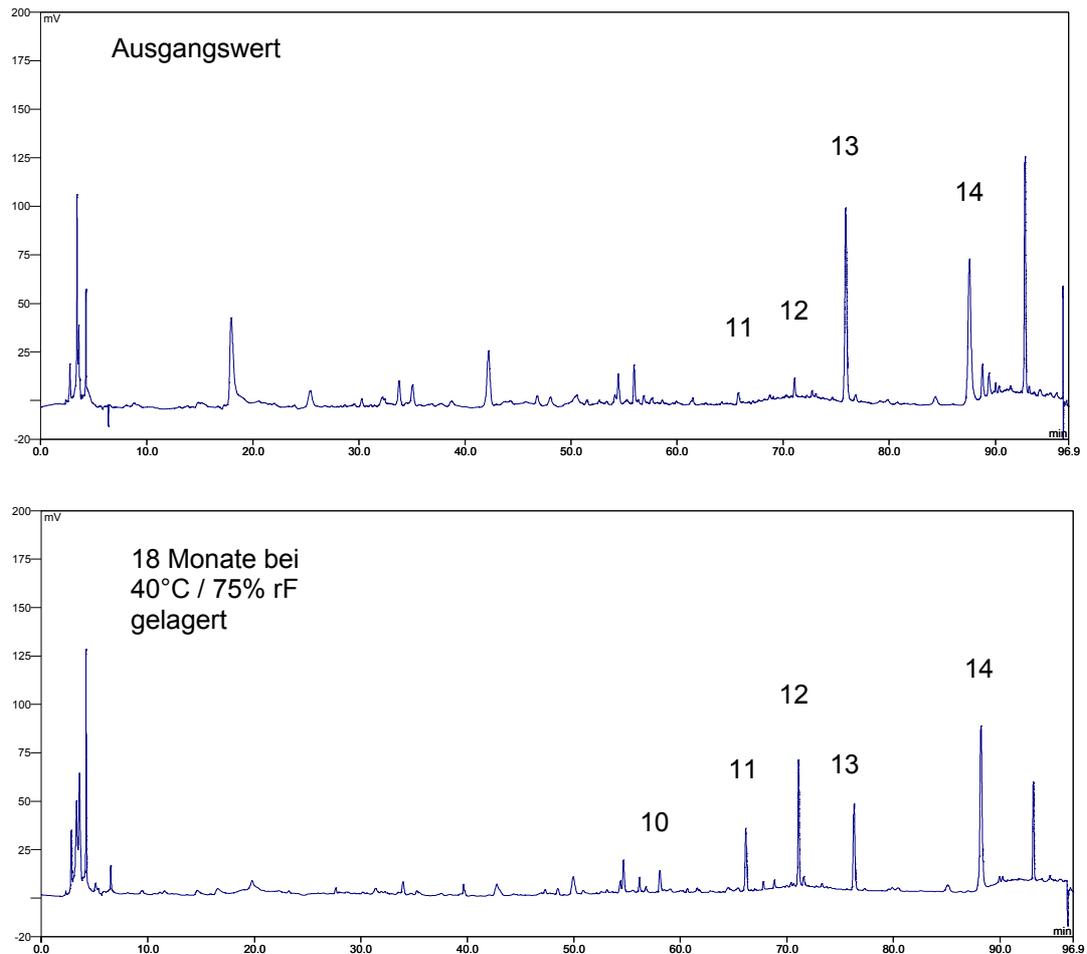


Abb. 29: Overlay der HPLC-Fingerprint-Chromatogramme der Einsatzdroge und der bei 40°C / 75% rF gelagerten Droge (nach 12 Monaten)

10: Hydroxypinoresinol, 11: Pinoresinol, 12: Hydroxyvalerensäure, 13: Acetoxyvalerensäure, 14: Valerensäure

Zum Vergleich der grafischen Auswertung der Peakflächenzunahmen von Pinoresinol und Hydroxypinoresinol ist die Abnahme eines weiteren Lignans, des Pinoresinol-diglucosids, für die drei Einlagerungsbedingungen dargestellt (Abb. 30). Es zeigte sich, daß das hydrolyseempfindliche Glykosid lagerungsabhängig abnehmende Tendenz zeigte. Mit einer Abnahme von 40% bei 25° / 60% rF und 85% bei 40°C / 75% rF scheint diese Verbindung noch labiler zu sein als der Ester Acetoxyvalerensäure. Pinoresinol (Abb. 31) und Hydroxypinoresinol (Abb. 32) zeigten, analog der Hydroxyvalerensäure, abhängig von den Lagerbedingungen zunehmende Kurvenverläufe. Bei 25°C / 60% rF kam es für Pinoresinol zu einem Anstieg um 80%, bei 30°C / 60% rF um 300% und bei 40°C / 75% rF sogar auf 400% über dem Ausgangswert. Auch Pinoresinol und Hydroxypinoresinol können daher als Leitsubstanzen für Stabilitätsuntersuchungen herangezogen werden. Als mögliche Ausgangsverbindungen kommen die von BODESHEIM (1996) beschriebenen Pinoresinolmono- und diglykoside sowie die Hydroxypinoresinolglykoside in Frage.

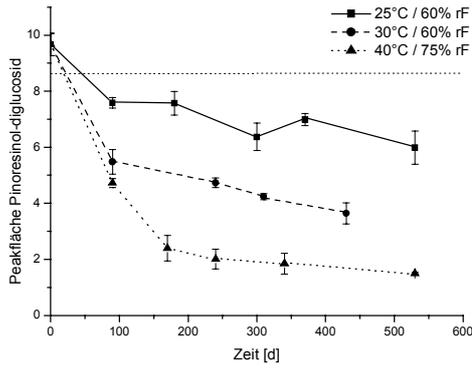


Abb. 30: Abbau von Pinoresinol-diglucosid in pulverisierter Baldrianwurzel

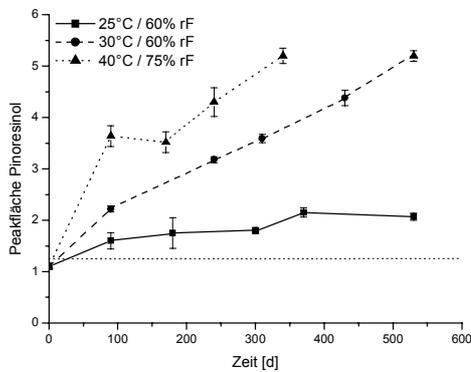


Abb. 31: Zunahme der Peakfläche von Pinoresinol in pulverisierter Baldrianwurzel

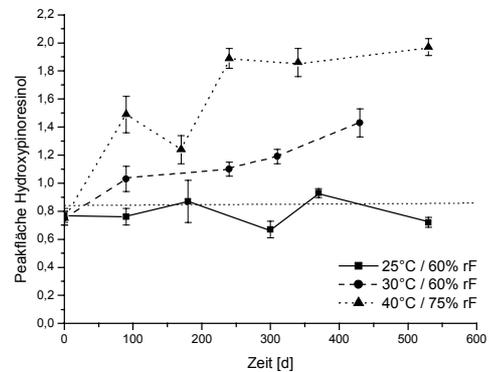


Abb. 32: Zunahme der Peakfläche von Hydroxypinoresinol in pulverisierter Baldrianwurzel

(gepunktete Linie gibt eine Veränderung von 10% zum Ausgangswert wieder)

Als Vergleich zur oben genannten irreführenden Auswertung über die Erfassung der Gesamtvalerensäuren, wurde analog der Gehalt an Gesamtlignanen im Vergleich zur Summe der Gehälter an Pinoresinol und Hydroxypinoresinol ausgewertet. Im Unterschied zu den Valerensäuren (Abb. 27) zeigen die Lignane in ihrer Summe einen deutlich lagerbedingungsabhängigen Abbau (Abb. 33). Der prozentuale Anteil an Hydrolyseprodukten hingegen nimmt dabei deutlich stärker zu. Bei Pinoresinol und Hydroxypinoresinol nimmt der Gehaltsanteil unter gleichen Beobachtungsbedingungen von ursprünglich 4,6% auf 45,8% zu. Der Gehaltsanteil an Hydroxyvalerensäure nimmt dagegen von ursprünglich weniger als 2,5% innerhalb von 12 monatiger Lagerung bei 40°C / 75% rF nur auf etwa 24 % zu. Die Hydrolyse der Lignanglykoside verläuft also in stärkerem Maße ab als die Hydrolyse der Esterbindung der Acetoxyvalerensäure.

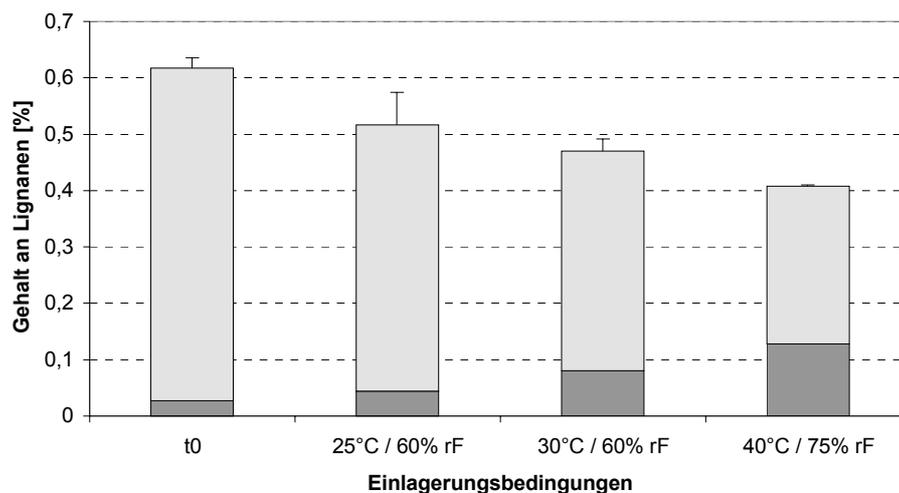


Abb. 33: Anteile des Pinoselinols und Hydroxypinoselinols (dunkler Flächenanteil) am Gehalt der Gesamtlignane (berechnet als Pinoselinol) in pulverisierter Baldrianwurzel nach einer Lagerungszeit von 300 Tagen

Die oben aufgeführten heftigen Veränderungen im Spektrum der Valerensäuren und Lignane entsprachen den Veränderung nach Einlagerung bei trockener Hitze von 70°C. Diese Degradation konnte im Trockenschrank schon nach kurzer Zeit beobachtet werden (siehe vorausgehende Untersuchungen). Unterschiede in der Art des Abbaus wurden dabei nicht sichtbar. Daher konnte auf diese Art und Weise degradiertes Material für die spätere Isolierung von Abbauprodukten (Hydroxypinoselinol, Pinoselinol, Hydroxyvalerensäure) genutzt werden.

Valepotriate sind bereits beim ersten Probenentnahmezeitpunkt unter allen eingesetzten Lagerungsbedingung nicht mehr nachweisbar gewesen.

3.2.5.4. **DC-Untersuchungen der Einsatzdroge**

Die dünnschichtchromatografisch nachweisbaren Veränderungen wurden mittels drei verschiedener Trennsysteme auf Kieselgel-Platten durchgeführt, um die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen zu bestätigen, und um zu evaluieren, ob die DC ein ausreichend empfindliches Verfahren zur Beurteilung der Stabilität von Baldriandrogen und -präparaten darstellt. Das Problem der Wiederholpräzision wurde dadurch zu umgehen, indem die DC-Untersuchungen erst nach Beendigung aller Prüfzeitpunkte aus tiefgefrorenen Mustern der einzelnen Prüfzeitpunkte erstellt wurden. Die Prüflösungen wurden alle gemeinsam im Vergleich mit einem Gefriermuster des Ausgangsmaterials auf einer Platte aufgetrennt. Unterschiede in Laufhöhe und Detektion durch Sprühreagenzien, die die Interpretation kleiner Veränderungen unmöglich machen, waren somit von untergeordneter Bedeutung.

Mittels der wie folgt modifizierten Arzneibuchmethode [PH.EUR. (2002a)] sollten die Ergebnisse in Bezug auf die Valerensäuren verifiziert werden: Auf die Probenaufbereitung nach Arzneibuch musste verzichtet werden, denn dort wird zunächst die Acetoxyvalerensäure durch Einsatz von Säure hydrolysiert, so dass im Anschluß nur noch Hydroxyvalerensäure detektiert werden kann. Um die Veränderung der Hydroxyvalerensäure erfassen zu können, muss daher auf diesen Schritt verzichtet werden. In Abb. 34 ist die Veränderung der pulverisierten Baldriandroge für die Lagerbedingungen bei 25°C und bei 40°C für die ersten vier Entnahmezeitpunkte dargestellt. Die Zuordnung der drei Flecken erfolgte durch Vergleich mit den jeweiligen Referenzsubstanzen und entsprach der Beschreibung von SCHIMMER (1992) bzw. der PH.EUR (2002a).

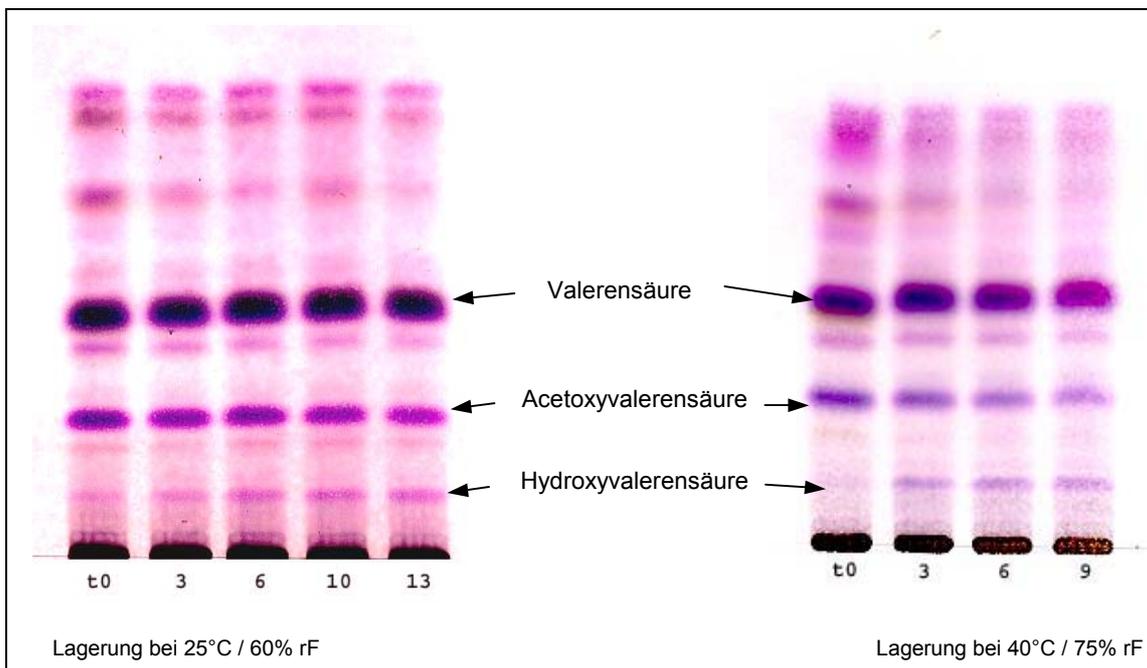


Abb. 34: DC-Trennung nach 5.5.5.1 zum Nachweis der Valerensäuren (Zahlen unter der Startlinie gibt die Lagerzeit in Monaten an)

Für die Einlagerung bei 25°C / 60% rF (linke Abbildung) sind über die Zeit nur geringfügige Veränderungen nachweisbar. Die Lagerung bei 40°C / 75% rF zeigt hingegen deutlichere Veränderungen. Wie in den HPLC-Untersuchungen (vergl. 3.2.5.3) gezeigt wurde, kommt es unter Zunahme der Hydroxyvalerensäure zu einer lagerbedingungsabhängigen Abnahme der Acetoxyvalerensäure. Die Zunahme der Hydroxyvalerensäure ist in den Vergleichschromatogrammen zu sehen, kann aber in den quantitativen Unterschieden zwischen den beiden Lagerbedingungen nicht so deutlich abgelesen werden, wie bei der HPLC-Methode. Der Vergleich der anderen beiden Valerensäuren ist schwerer zu deuten. Bei 25°C / 60% rF gelagerter Droge ist eine stärkere Abnahme der Acetoxyvalerensäure als unter 40°C / 75% rF erkennen.

Die zweite DC-Trennmethode soll die unter 3.2.5.3 beobachtete Zunahme des Pinoresinols überprüfen (Abb. 35). Dazu wurden die Trennbedingungen nach BODESHEIM (1996) modi-

fiziert (siehe 5.5.5.3). Die Detektion erfolgte mit Anisaldehyd/ Schwefelsäure-Reagens, da Dragendorffs- Reagens nicht die ausreichende Empfindlichkeit aufwies. Zusätzlich mussten auch höher konzentrierte Extrakte als bei der Methode der Ph. Eur. eingesetzt werden, um diese Inhaltsstoffe geringen Gehaltes noch adäquat detektieren zu können.

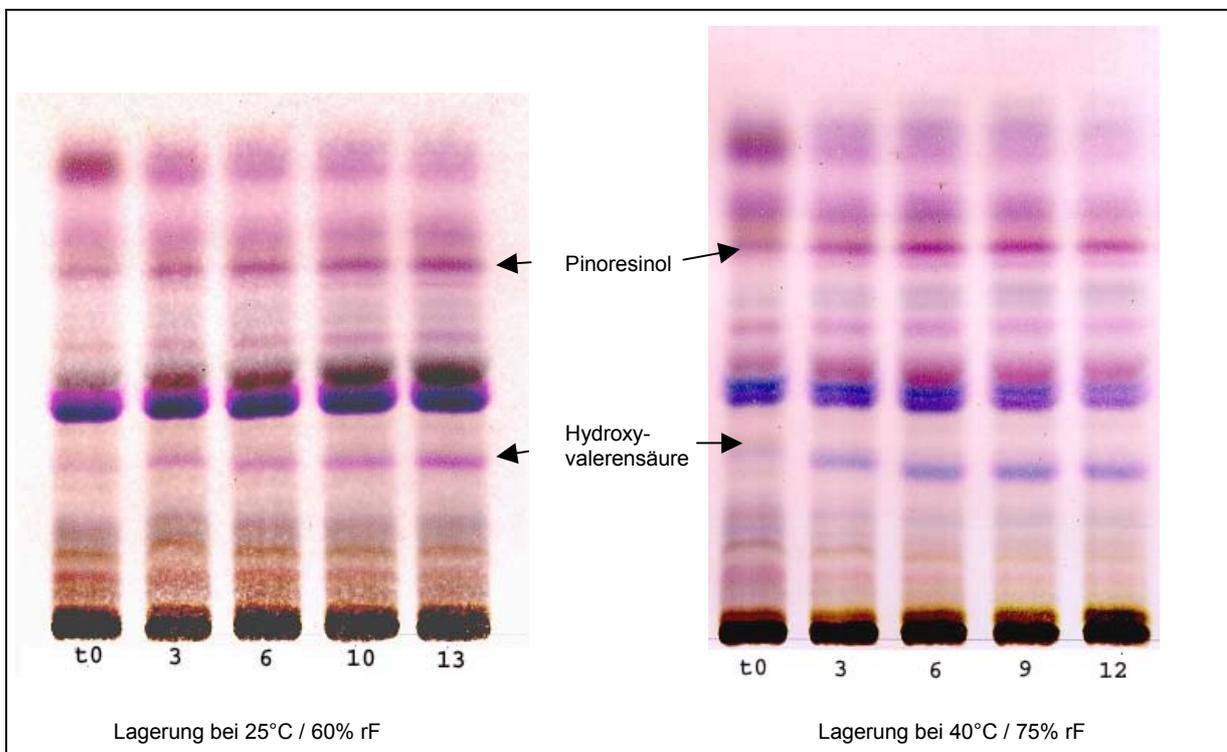


Abb. 35: DC-Trennung nach 5.5.5.3 zum Nachweis der Lignane (Referenzsubstanzen aus der Isolierung unter 3.2.7) (Zahlen unter der Startlinie geben die Lagerzeit in Monaten an)

Mit diesem DC-Trennsystem können die wesentlichen Veränderungen besser nachgewiesen werden. Wie aus Abb. 35 zu ersehen, können die Abbauprodukte Hydroxyvalerensäure ($R_f = 0,42$) und Pinoresinol ($R_f = 0,75$) in ihrer Intensitätszunahme bei 40°C / 75% rF gut nachgewiesen werden. Die geringfügigeren Intensitätszunahmen der beiden Substanzen bei 25°C / 60% rF Lagerung können aber auch hier nur unzureichend detektiert werden. Hydroxypinoresinol kann aufgrund seines geringen Gehaltes in diesem System nicht adäquat ausgewertet werden.

Die dritte DC-Methode sollte eventuelle Veränderungen in der stark polaren Fraktion, insbesondere im Spektrum der enthaltenen Aminosäuren belegen (nach LAPKE (2000) siehe 5.5.5.2). Die Detektion erfolgte mit Ninhydrin- Reagens (Abb. 36).

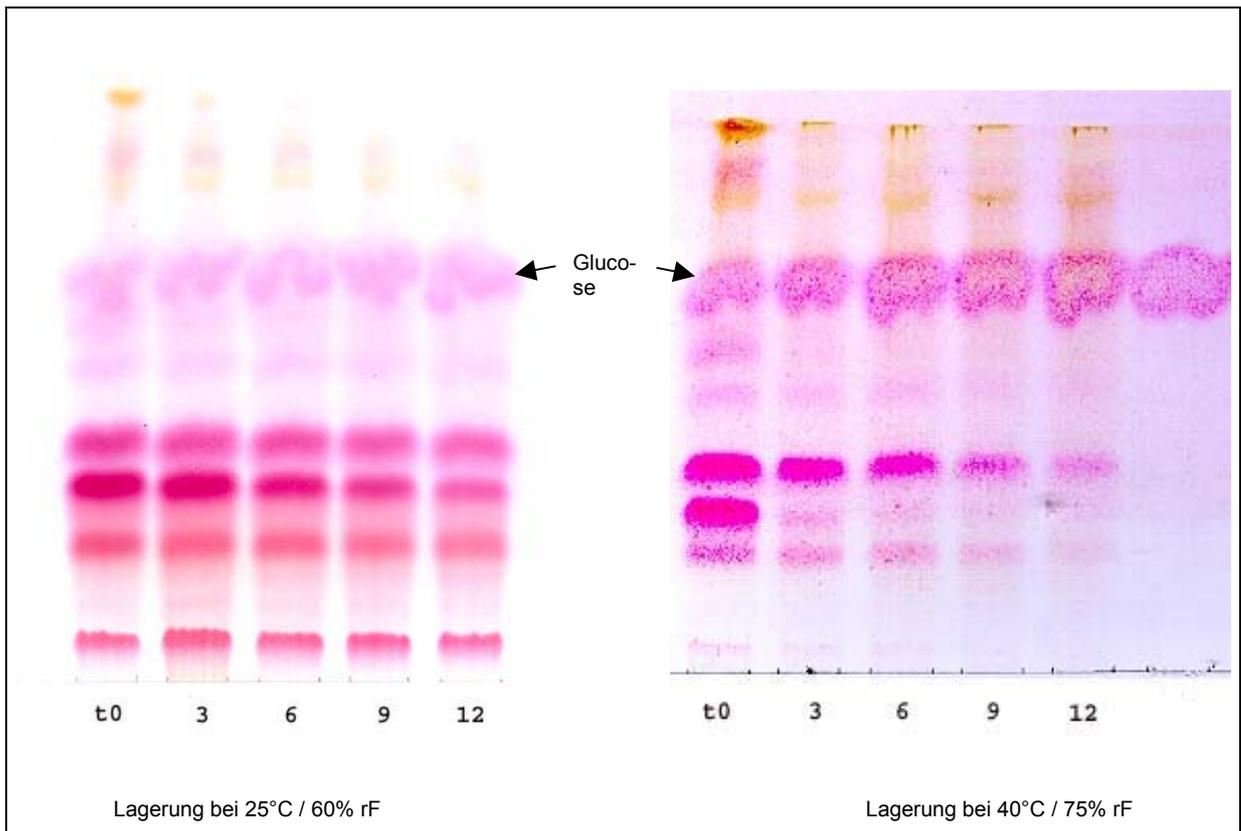


Abb. 36: DC-Trennung nach 5.5.5.2 zum Nachweis der Aminosäuren (Zahlen unter der Startlinie geben die Lagerzeit in Monaten an)

Der Vergleich der Aminosäurefraktion (Banden bis $R_f=0,42$) bei unterschiedlicher Lagerung zeigte deutliche Unterschiede. Während bei $25^\circ\text{C} / 60\% \text{ rF}$ kaum Veränderungen über die Zeit festgestellt werden konnten, zeigte sich bei $40^\circ\text{C} / 75\% \text{ rF}$ nach 12 Monaten Lagerung der fast vollständige Abbau dieser Inhaltsstoffe. Gleichzeitig trat unter dieser Bedingung eine Substanz bei $R_f=0,70$ deutlicher hervor. Diese, auf Grund der Rotfärbung mit Ninhydrin zunächst als Amin angenommene Substanz, konnte nach weiteren Untersuchungen als Glucose bestimmt werden. Da allein die Freisetzung des Pinoresinols aus verschiedenen Glykosiden resultieren dürfte, ist ein Anstieg der Glucose plausibel.

3.2.5.5. Ätherisches Öl

Ergänzend zur Betrachtung der Veränderung der Inhaltsstoffe wurde die Veränderung des Ätherischölgehaltes untersucht. In Abb. 37 ist der Gehalt nach 12 Monaten Lagerung in den drei Klimabereichen im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen dargestellt. In allen drei Fällen kam es unabhängig von den Lagerbedingungen zu einer über 60%igen Abnahme. Diese Reduktion der ätherischen Öle ist im Vergleich mit den von KIEFL (1998) für $25^\circ\text{C} / 60\% \text{ rF}$ ermittelten Werten höher. Allerdings sind bereits von KIEFL (1998) verpackungsabhängige Unterschiede im Abbau wahrgenommen worden. Die Verpackung in PE-

Weithalsflaschen wurde dabei nicht untersucht, ein direkter Vergleich ist somit erschwert. Die von KIEFL (1998) getesteten Verpackungen sind möglicherweise besser für die Lagerung geeignet.

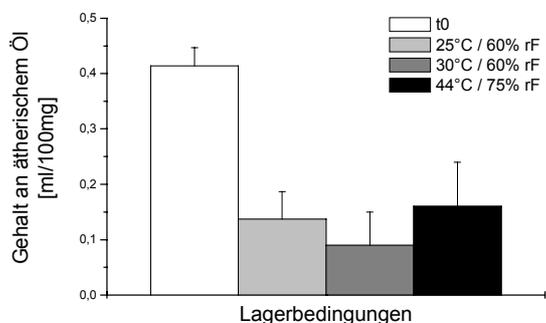


Abb. 37: Veränderung des Ätherischölgehaltes in pulverisierter Baldrianwurzel bei unterschiedlichen Lagerbedingungen nach 1 Jahr Lagerzeit

3.2.5.6. Aussagen zur Stabilität der Einsatzdroge

Die graphische Auswertung der Verläufe der Baldrianinhaltsstoffe lässt erkennen, dass in den meisten Fällen, die 10%-Grenzen nach kurzer Zeit überschritten sind. Der Flächenanteil der Gesamtvalerensäuren fällt für alle Lagerbedingungen bereits innerhalb der ersten 100 Tage unter 90% des Ausgangswertes. Analog verhält es sich mit der einzeln bestimmten Valerensäure, Acetoxyvalerensäure und dem Pinosesinol-diglucosid. Für den Verlauf der Hydroxyvalerensäure wurden die Kurven linear extrapoliert, um genauere Werte zu erhalten. Für das Überschreiten von 110% des Ausgangswertes ergibt sich demnach bei einer Lagerung von 25°C / 60% rF eine Dauer von 24 Tagen, bei 30°C / 60% rF 10 Tage und bei 40°C / 75% rF ist bereits nach 4 Tagen dieser Wert überschritten. Der Anstieg der Lignanaglyka ist flacher. Pinosesinol überschreitet bei gleicher Einlagerung die Grenze bei 63, 15 und 9 Tagen. Bei Hydroxypinosesinol bleiben die Werte bei 25°C / 60% rF sogar unter 110% nach Extrapolation über den gesamten beobachteten Zeitraum. Demzufolge sollte Hydroxyvalerensäure, als die empfindlichste Leitsubstanz für Stabilitätsprüfungen von pulverisierter Baldrianwurzel angesehen werden.

Der als Qualitätskriterium von der Ph. Eur. geforderte Mindestgehalt von 0,17% Sesquiterpensäuren war für alle untersuchten Proben bis Ende des Untersuchungszeitraumes noch gegeben. Würde man als Spezifikationsparameter die Einhaltung von ± 10 Grenzen zum Ausgangswert annehmen, wäre die Droge bei den vorliegenden Untersuchungen in allen Fällen außerhalb der Spezifikation.

3.2.6. Stabilitätsuntersuchungen zu Baldrianwurzelextrakten

3.2.6.1. HPLC Untersuchungen

Im Folgenden wurden die Extrakte aus Baldrianwurzel dahingehend untersucht, ob sich die für die pulverisierte Einsatzdroge ermittelten Entwicklungen auch für Extrakte bestätigen lassen.

Die Baldrianextrakte zeigten unter den Stressbedingungen zum Teil erhebliche physikalischen Veränderungen. Zu dieser Problematik und deren Einfluss auf die Stabilitätswerte wird in Kapitel 3.5 Stellung genommen.

Die folgenden HPLC-Daten beziehen neben den drei klimatischen Bedingungen auch die vier unterschiedlichen Verpackungen mit ein. Da sich bei den Extrakten für jede Bedingung und Verpackung andere Trocknungsverluste ergaben, wurden diese in die Auswertung der Peakflächen mit eingerechnet.

3.2.6.2. Stabilitätsuntersuchungen an methanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt

In Abb. 38 sind die Verläufe der Peakflächen der Valerensäure für den methanolischen Baldrianwurzel-trockenextrakt gezeigt. Ähnlich wie bei der pulverisierten Droge ist unter den verschiedenen Lagerbedingungen nur ein geringfügiger Abbau zu beobachten, der keine gravierenden Unterschiede erkennbar werden lässt. Lediglich geringfügig stärkere Abnahmen sind bei Einlagerungen in PE-Beuteln und den unverpackten Kontrollen zu bemerken.

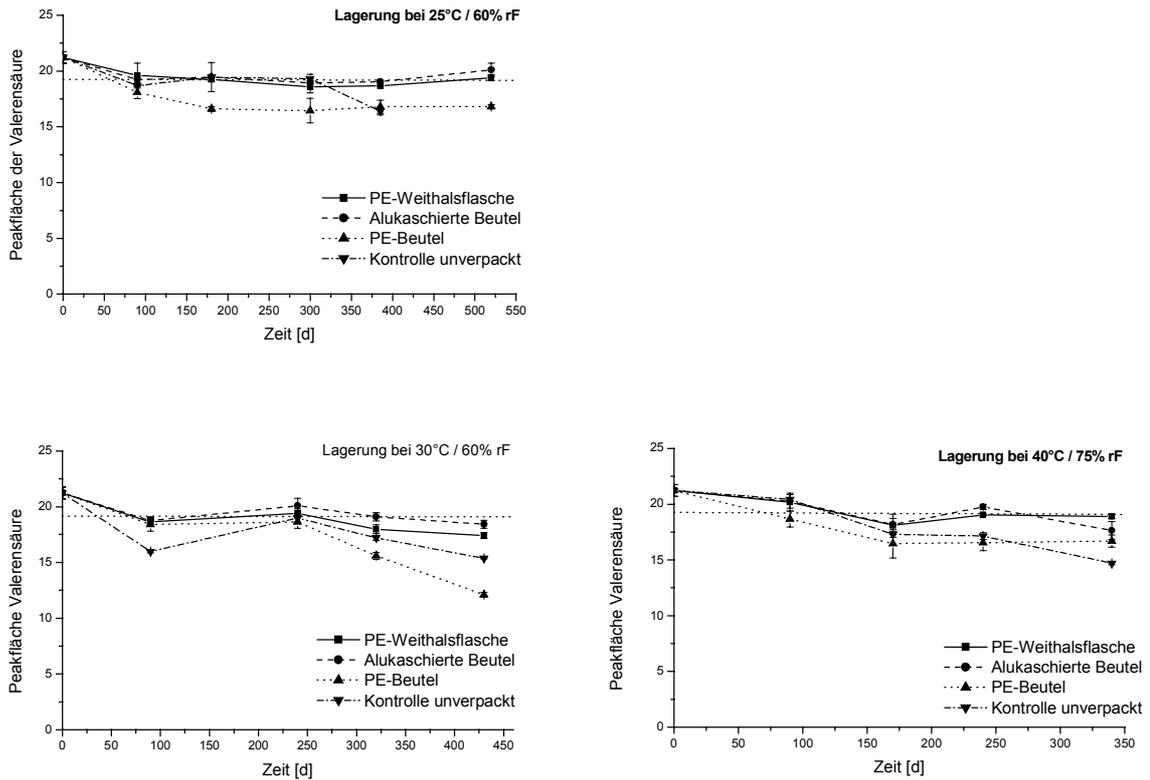


Abb. 38: Veränderungen der Peakflächen der Valerensäure bei methanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt in Abhängigkeit von Lagerbedingungen und Verpackung (gepunktete Linie gibt eine Veränderung von 10% zum Ausgangswert wieder)

Wesentlich aussagekräftiger ist, wie bei der gepulverten Einsatzdroge, die Auswertung der Veränderungen von Acetoxy- und Hydroxyvalerensäure (Abb. 39), da lagerungs- und verpackungsbedingte Unterschiede nachweisbar sind. Während bei 25°C / 60% keine signifikanten Veränderungen zu erkennen sind, zeigen sich bereits bei 30°C / 60% rF sowohl deutliche Abnahmen der Acetoxyvalerensäure als auch deutliche Zunahmen der Hydroxyvalerensäure. Allerdings sind diese Veränderungen auf die Verpackung in PE-Beuteln und die unverpackten Kontrollen beschränkt. Die Extrakte, die in den alukaschierten Beuteln und den PE-Weithalsflaschen gelagert werden, zeigen diese Veränderungen so gut wie nicht. Die Zunahme der Hydroxyvalerensäure beträgt für die unverpackten Extrakte bei 30°C nach etwa 12 Monaten 160%, bei 40°C 270% im Vergleich zum Ausgangswert. Die in PE-Beuteln verpackten Extrakte zeigen bei 40°C eine identische Veränderung, bei 30°C hingegen mit 86% deutlich niedriger als unverpackte Muster.

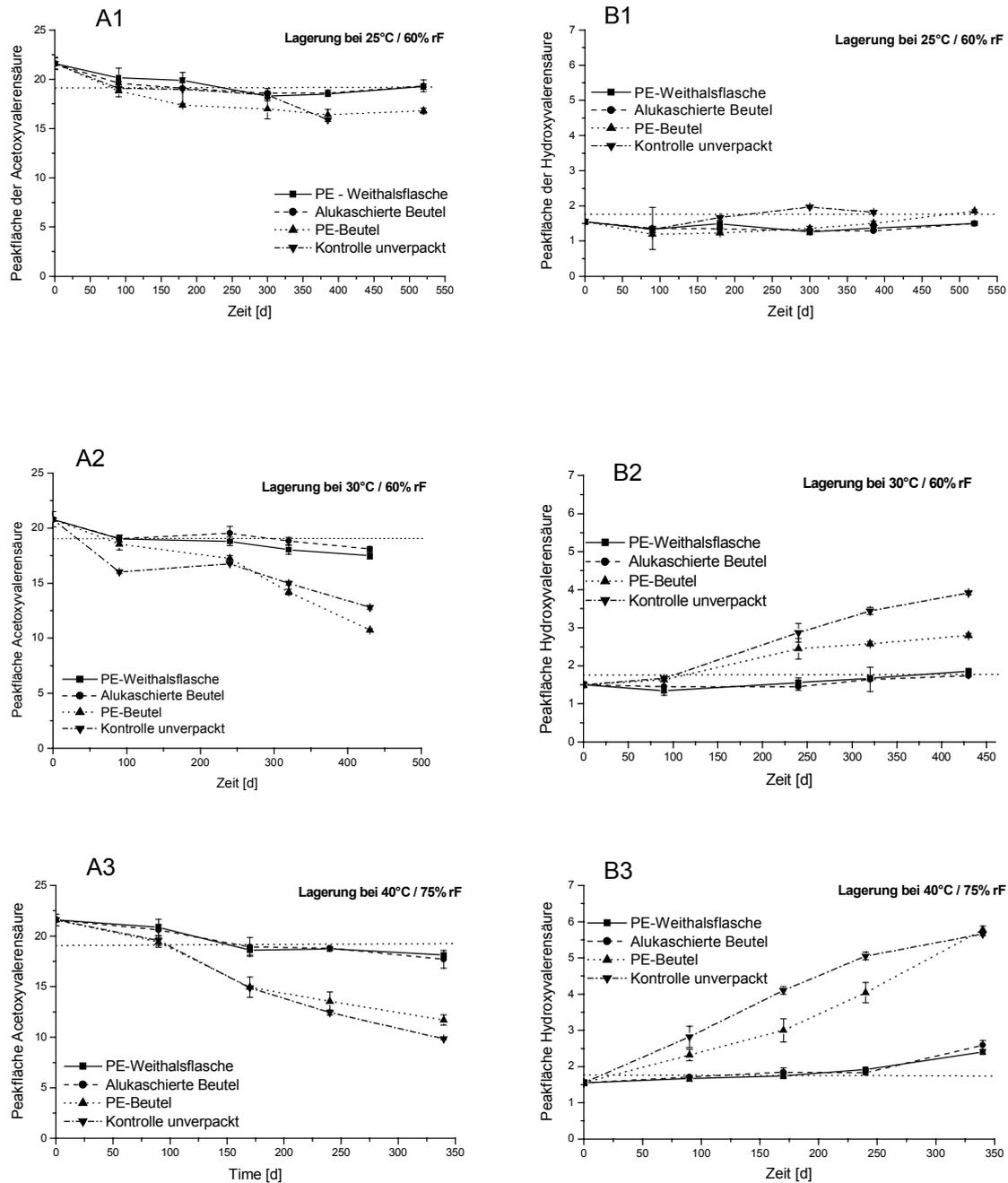


Abb. 39: Veränderungen der Peakflächen von Acetoxy- (A) und Hydroxyvalerensäure (B) bei methanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt abhängig von Temperatur und Verpackung
 1: 25°C / 60% rF 2: 30°C / 60% rF 3: 40°C / 75% rF (gepunktete Linie gibt eine Veränderung von 10% zum Ausgangswert wieder)

Analog der pulverisierten Droge wurde geprüft, ob eine Fehlinterpretation in Bezug auf die lagerungsabhängigen Veränderungen vorliegen kann, falls nur die Gesamtvalerensäuren als Parameter bestimmt werden (Abb. 40). Dargestellt ist der Gesamtgehalt an Valerensäuren nach 12 Monaten Lagerung im Vergleich zum Ausgangswert für die drei Lagerungsbedingungen. Zusätzlich kann der Einfluss der verschiedenen Verpackungsmaterialien untersucht werden: Die in PE-Weithalsflaschen und in den alukaschierten Beuteln gelagerten Extrakte zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf. Ihr Gesamtvalerensäuregehalt fiel um ca. 16% in

allen Klimabedingungen ab, so dass man irrtümlich von einem lagerungs- und verpackungsunabhängigen Abbau ausgehen könnte. Der Anteil an Hydroxyvalerensäure zeigt aber, dass dies zumindest für die Einlagerung bei 40°C / 75% rF nicht gilt, da sich unter diesen Bedingungen, bei gleichbleibendem Gesamtgehalt an allen drei Valerensäuren, der Anteil an Hydroxyvalerensäure in etwa verdoppelt. Die Extrakte in den PE-Beuteln zeigen mit 33% einen deutlich höheren Verlust an Gesamtvalerensäuren. Die Ungenauigkeit hinter der Bestimmung der Gesamtvalerensäuren allein zeigt sich bei dieser Verpackung bereits schon bei 25°C / 60% rF. Der Anteil an Hydroxyvalerensäure am Gesamtgehalt hat sich zu diesem Zeitpunkt in etwa verdoppelt. Bei Lagerung unter 40°C / 75% rF steigt der Gehaltsanteil auf 20%. Der Gesamtvalerensäuregehalt bleibt für die drei Klimabereiche aber auf gleichem Niveau. Lediglich bei unverpackten Extrakten spiegelt sich die stärkere Degradation der Acetoxyvalerensäure bei extremeren Bedingungen auch in einer Abnahme des Gesamtvalerensäuregehaltes wieder. So nimmt die Gesamtkonzentration bei 40°C / 75% rF bei gleichzeitiger Zunahme des Anteils an Hydroxyvalerensäure auf 22% um fast 50% ab. Nach 12 Monaten bei 25°C / 60% rF liegt dieser Anteil, bei einem gleichzeitigen Gesamtverlust an Valerensäuren um 17%, lediglich bei 5,1%.

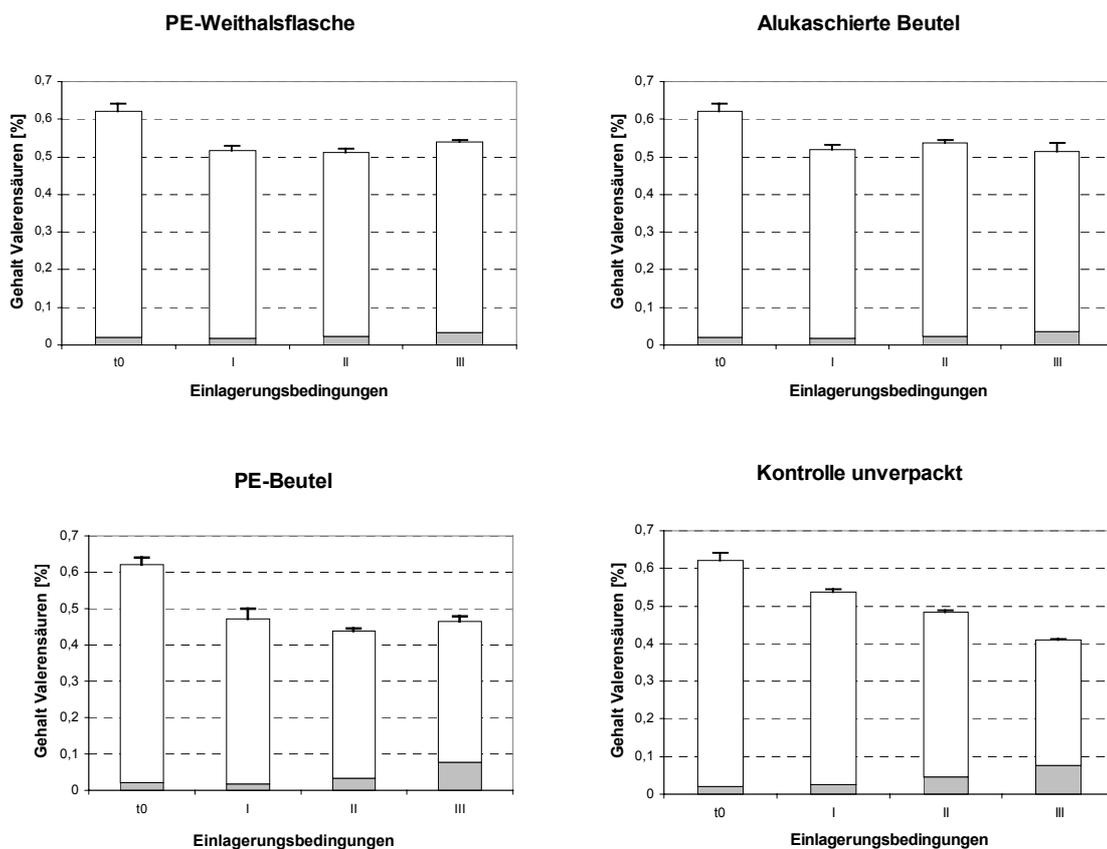


Abb. 40: Lagerung mit verschiedenen Verpackungen und Lagerbedingungen: Unterschiede im Gehalt an Hydroxyvalerensäure (graue Fläche) an den Gesamtvalerensäuren bei methanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt nach 300 Tagen I: 25°C / 60% rF, II: 30°C / 60% rF, III: 40°C / 75% rF

Die Bedeutung dieser Veränderungen werden aus Abb. 41 deutlich. Der Verlauf der Gesamtvalerensäuren ist für die zwei Verpackungen mit den deutlichsten Unterschieden dargestellt. Bei anforderungsgerecht verpackten Extrakten, wie in PE-Weithalsflaschen oder alukaschierten Beuteln zeigen sich kaum unterschiedliche Verläufe aufgrund der Einlagerungsbedingungen. Interessant ist, dass, wie bereits bei der pulverisierten Droge nachgewiesen, der Gesamtgehalt zunächst schnell abfällt, um dann in einen flacheren Verlauf überzugehen. Dabei sinkt der Gehalt nur minimal unter 90% des Ausgangswertes ab. Unverpackter Extrakt hingegen sinkt deutlich unter diese Grenze und zeigt auch einen stärkeren Abfall unter Stressbedingungen.

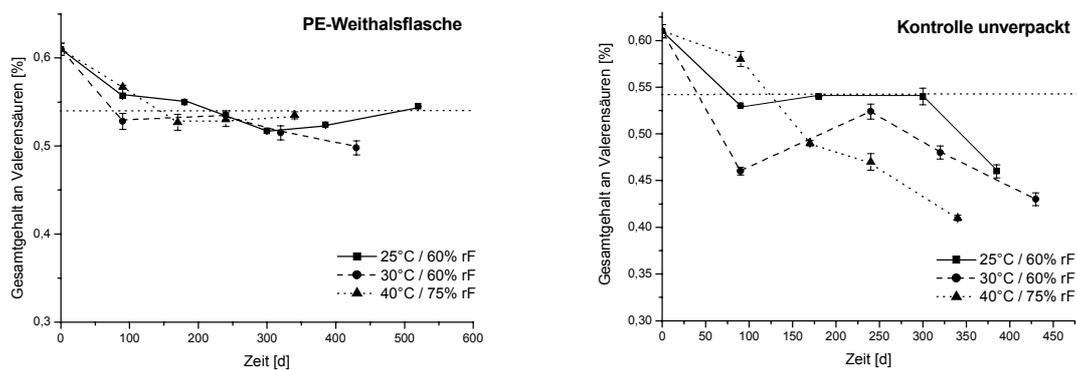


Abb. 41: Verlauf des Gesamtgehaltes an Valerensäuren in methanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt verpackt in PE-Weithalsflaschen und unverpackt unter den drei Klimabedingungen (gepunktete Linie gibt eine Veränderung von 10% zum Ausgangswert wieder)

3.2.6.3. Stabilitätsuntersuchungen an ethanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt

Die Veränderungen der Valerensäure in den drei Klimazonen bei unterschiedlicher Verpackung waren minimal (Abb. 42). Während der methanolische Extrakt für den ungünstigsten Fall, unverpackt bei 40°C / 75% gelagert, eine Abnahme an Valerensäure von ca. 30% zeigte, verringern sich die Peakflächen des unter gleichen Bedingungen gelagerten ethanolischen Extraktes im Mittel nur um 10% zum Ausgangswert.

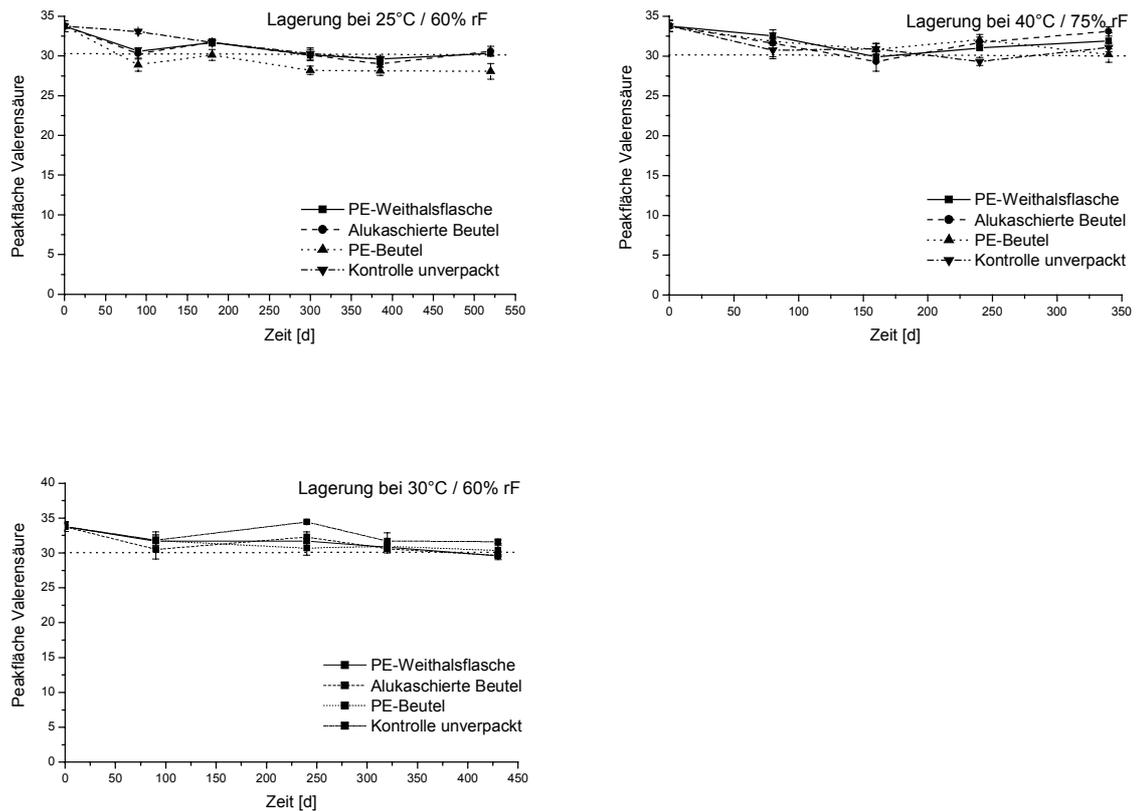


Abb. 42: Veränderung der Peakfläche von Valerensäure bei ethanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt in Abhängigkeit von Lagerbedingungen und Verpackung (gepunktete Linie gibt eine Veränderung von 10% zum Ausgangswert wieder)

Auch die Beobachtung der Acetoxyvalerensäure und Hydroxyvalerensäure (Abb. 43) lässt auf eine geringere Degradation schließen. Während die Peakfläche der Acetoxyvalerensäure beim unverpackten methanolischen Extrakt bei 40°C / 75% rF auf 45% des Ausgangswertes abfiel, blieb der unverpackte und in PE-Beuteln verpackte ethanolische Extrakt bei 63,1%. Eine Zunahme der Hydroxyvalerensäure kann auch hier als guter Stabilitätsparameter angesehen werden. Analog dem methanolischen Extrakt zeigen die Extrakte in den PE-Weithalsflaschen und alukaschierten Beuteln nur einen geringfügigen Anstieg, während die unverpackten und in PE-Beuteln gelagerten Extrakte eine deutlichen Zunahme an Hydroxyvalerensäure als Abbauprodukt zeigen. Wiederum ist der Anstieg um 170% der Fläche des unverpackten ethanolischen Extraktes bei 40°C / 75% rF wesentlich geringer als beim methanolischen, wo bei gleichen Bedingungen eine Zunahme um 270% zu verzeichnen ist.

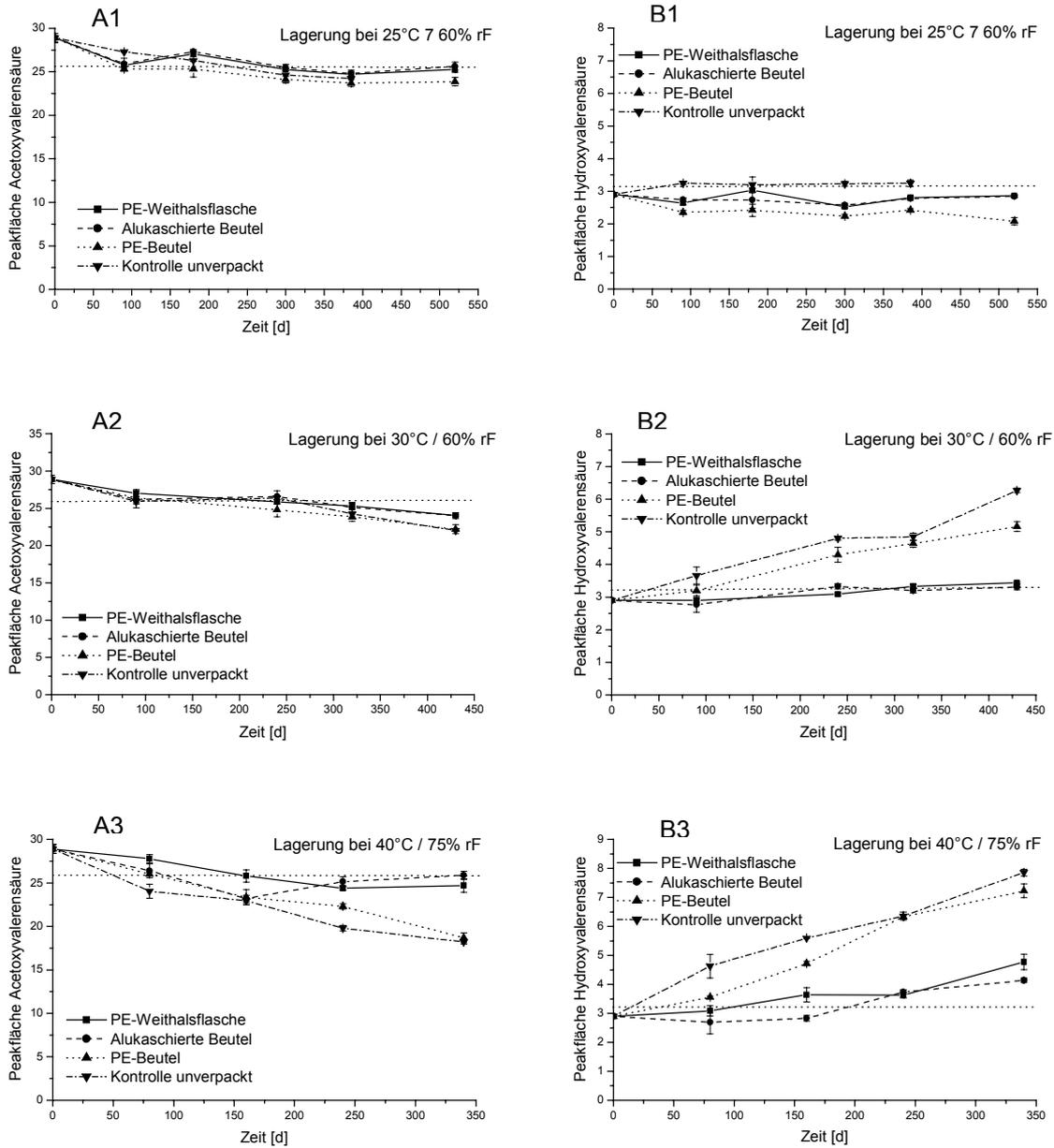


Abb. 43: Verlauf der Peakflächen von Acetoxy- und Hydroxyvalerensäure bei ethanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt abhängig von Temperatur und Verpackung (gepunktete Linie gibt eine Veränderung von 10% zum Ausgangswert wieder)
 1: 25°C / 60% rF 2: 30°C / 60% rF 3: 40°C / 75% rF

Die geringere Instabilität lässt sich auch durch die Erfassung der Gesamtvalerensäuren dokumentieren (Abb. 44). Interessanterweise zeigt dieser Extrakt nach 12 Monaten der Lagerung einen für alle Klimazonen und Verpackungen in etwa gleichwertigen Abfall des Gehaltes an Gesamtvalerensäuren um 14-20%. Die alleinige Betrachtung der Gesamtvalerensäuren lässt erneut die Veränderungen von Lagerung und Verpackung unabhängig erscheinen. Der Anteil der Hydroxyvalerensäure am Gesamtvalerensäuregehalt verhält sich abhängig von der Verpackung allerdings deutlich unterschiedlich. Bei Lagerung in PE-Weithalsflaschen und alukaschierten Beuteln nimmt der prozentuale Anteil an Hydroxyvale-

rensäure kaum zu. Die unverpackten Extrakte und die Extrakte in den PE-Beuteln zeigen einen Anstieg von ursprünglich 4,4%, auf ca. 7% bzw. ca. 9% für eine Lagerung bei 30°C / 60% rF bzw. 40°C / 75% rF. Die relative Zunahme ist aber dennoch wesentlich geringer als bei den methanolischen Extrakten.

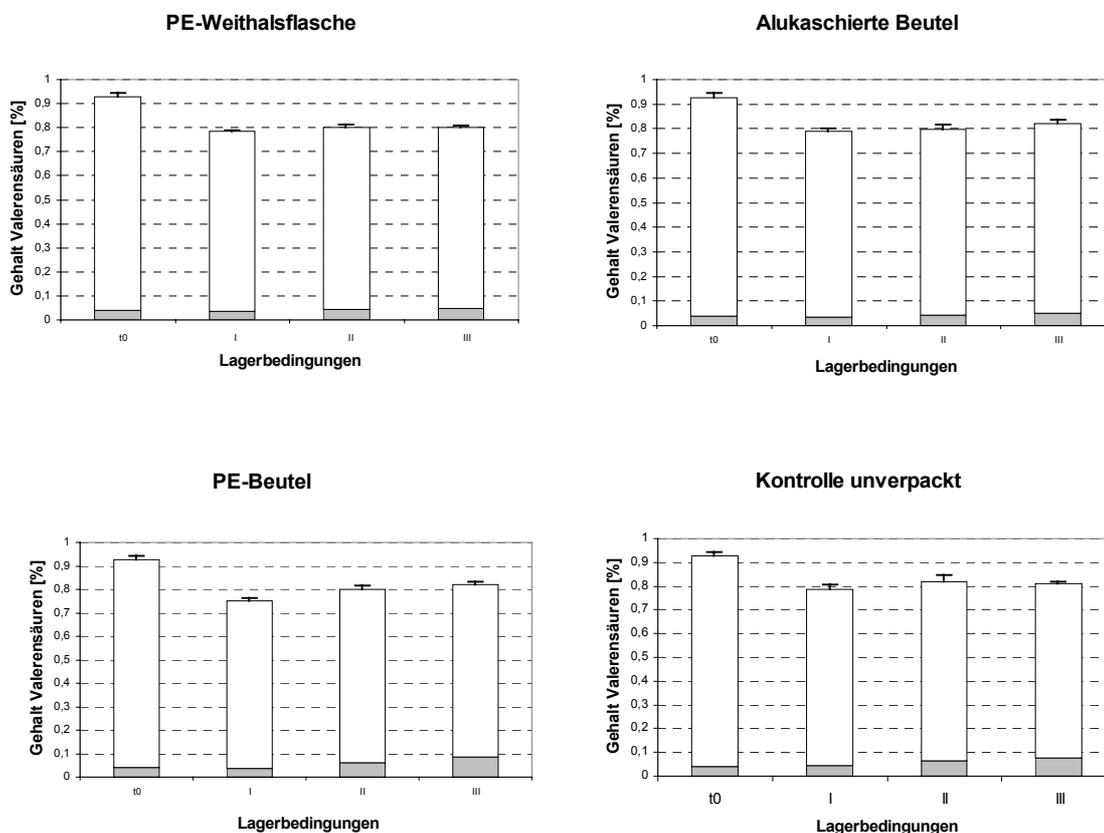


Abb. 44: Unterschiede im Gehalt an Hydroxyvalerensäure (graue Fläche) an den Gesamtvalerensäuren nach 300 Tagen Lagerung in verschiedenen Verpackungen und Lagerbedingungen in ethanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt
I: 25°C / 60% rF, II: 30°C / 60% rF, III: 40°C / 75%rF

In Abb. 45 ist der Verlauf der Gesamtvalerensäuren bei zwei Verpackungen dargestellt. Es zeigte sich, dass die ethanolischen Extrakte in beiden Verpackungen in Ihrem Gesamtvalerensäuregehalt während der Lagerzeit im wesentlichen über der 90%-Grenze blieben. Allerdings war für die Extrakte im 25°C / 60% rF-Klima zu bemerken, dass diese dem Anschein nach den stärksten Abfall zeigten. Eine Erklärung hierfür kann man aus dem Verlauf der Hydroxyvalerensäure ablesen. Bei 25°C zeigten alle drei Säuren des unverpackten Extraktes eine Abnahme. Die zuvor beobachtete Zunahme der Hydroxyvalerensäure trat nicht auf. Unter diesen Klimabedingungen konnten lediglich die, für alle Inhaltsstoffe nachweisbaren, natürlichen Alterationen beobachtet werden. Die spezifische Hydrolyse der Acetoxyvalerensäure zu Hydroxyvalerensäure konnte nicht nachgewiesen werden. Da also alle drei Säuren abnehmen, nimmt auch ihre Summe ab. Bei den anderen klimatischen Bedingungen liegt

immer auch eine geringfügige Zunahme der Hydroxyvalerensäure vor, die sich in der Summe bemerkbar macht, und einen gewissen Anteil der Degradationsprozesse ausgleicht.

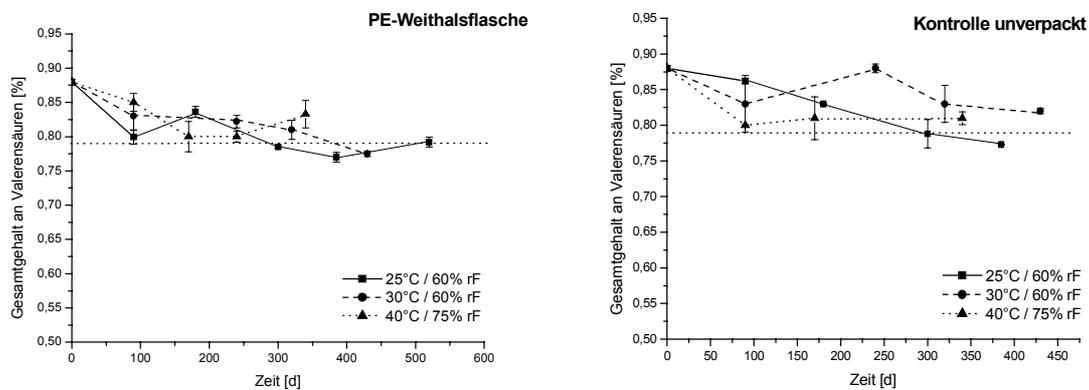


Abb. 45: Verlauf des Gesamtgehaltes an Valerensäuren in ethanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt verpackt in PE-Weithalsflaschen und unverpackt unter den drei Klimabedingungen (gepunktete Linie gibt eine Veränderung von 10% zum Ausgangswert wieder)

Der Vergleich des HPLC-Fingerprint-Chromatogramms der pulverisierten Einsatzdroge zwischen Nullwert und degradiertes Droge ließ neben der Zunahme der Hydroxyvalerensäure auch noch die Zunahme des Pinoresinols und Hydroxypinoresinols erkennen (vgl. Abb. 29). Während die Zunahme der Hydroxyvalerensäure, wie oben gezeigt, auch bei den Extrakten zu beobachten war, konnte hier keine vergleichbare Veränderung des Anteils an Lignaglyka beobachtet werden. Abb. 46 zeigt den Peakflächenverlauf des Pinoresinols in den beiden Extrakten für die Lagerbedingung bei 40°C / 75% rF, da hier die größten Veränderungen zu erwarten sind. Die Ungenauigkeiten im Kurvenverlauf und die zum Teil hohen Werte für die Standardabweichung resultieren aus dem geringen Peakflächenanteil, wodurch die Selektivität beeinflusst ist. Dennoch ist eine Aussage über die mögliche Veränderung des Pinoresinols möglich. Eine Zunahme, wie sie für die pulverisierte Baldriandroge beobachtet wurde, ist nicht zu beobachten, sondern eine in ihrem Verlauf von der Art der Verpackung abhängige Abnahme der Peakfläche. Die unverpackten Extrakte zeigen in diesem Fall den stärksten Abfall, die alukaschierten Beutel und PE-Weithalsflaschen den geringsten. Das lässt die Vermutung zu, dass hier nicht die gleichen Degradationsprozesse ablaufen, wie bei der Einsatzdroge. Anscheinend kommt es zu keiner Glykosidspaltung, da möglicherweise die verantwortlichen Glykosidasen durch den Herstellungsprozess inaktiviert wurden.

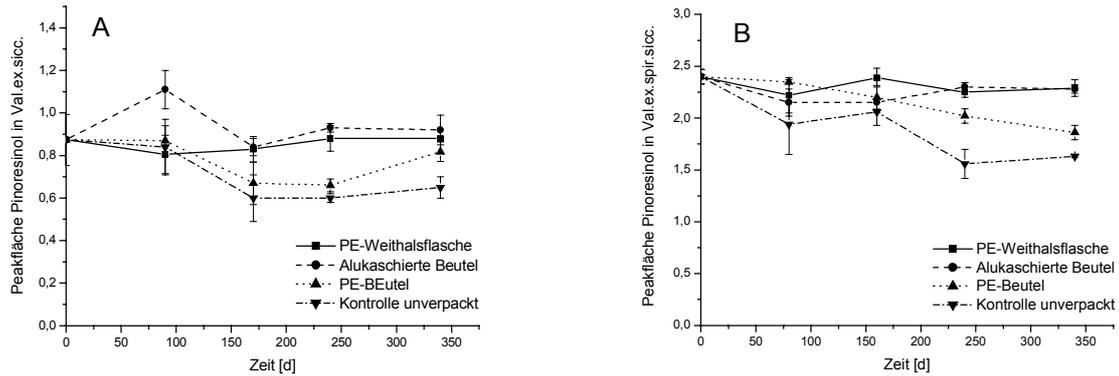


Abb. 46: Verlauf von Pinoselin in methanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt (A) und ethanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt (B) gelagert bei 40°C / 75 rF

Um den möglichen Einfluss von Hilfsstoffen auf die Stabilität abzuklären wurden zwei weitere native Extrakte mit 55% bzw. 85% Ethanol hergestellt (5.4.3.3). Diese Extrakte zeigten, wie bereits unter 3.2.4.3 beschrieben, eine hohe Restfeuchte und waren sehr hygroskopisch, was vermutlich auf das Fehlen der Hilfsstoffe zurückzuführen war. Die daraus resultierende inhomogene Zusammensetzung erwies sich in Bezug auf die Probenaufbereitung als problematisch, führte zu größeren Standardabweichungen und einem meist nicht eindeutigen Kurvenverlauf.

In Abb. 47 sind die Veränderungen der Peakflächen der drei Valerensäuren für die zwei nativen Extrakte dargestellt. Im Gegensatz zu den handelsüblichen Extrakten zeigten sich stärkere Instabilitäten, die in ihrem Ausmaß zwischen der pulverisierten Einsatzdroge und den handelsüblichen Extrakten einzuordnen sind. Als relativ stabil ist auch hier die Valerensäure zu beurteilen. Die Peakfläche der Acetoxyvalerensäure nahm mit 26% bei 30°C / 60% rF bzw. 33% bei 40°C / 75% rF in beiden Extrakten lagerungsabhängig etwa gleich stark ab. Bei der Zunahme der Hydroxyvalerensäure ergaben sich Unterschiede zwischen den beiden nativen Extrakten. Während im 85%-ethanolischen Extrakt nach einem Jahr Lagerung bei 25°C / 60% rF lediglich eine Steigerung von 20% zu beobachten war, waren es im 55%-ethanolischen Extrakt bereits 80%. Bei Stress-Belastung unter 40°C / 75% rF war der Unterschied mit einer Zunahme von 190% beim 55%- und 150% beim 85%-ethanolischen Extrakt geringer. Die im Vergleich zu den handelsüblichen Extrakten höhere Instabilität kann auf den höheren Restwassergehalt zurückgeführt werden.

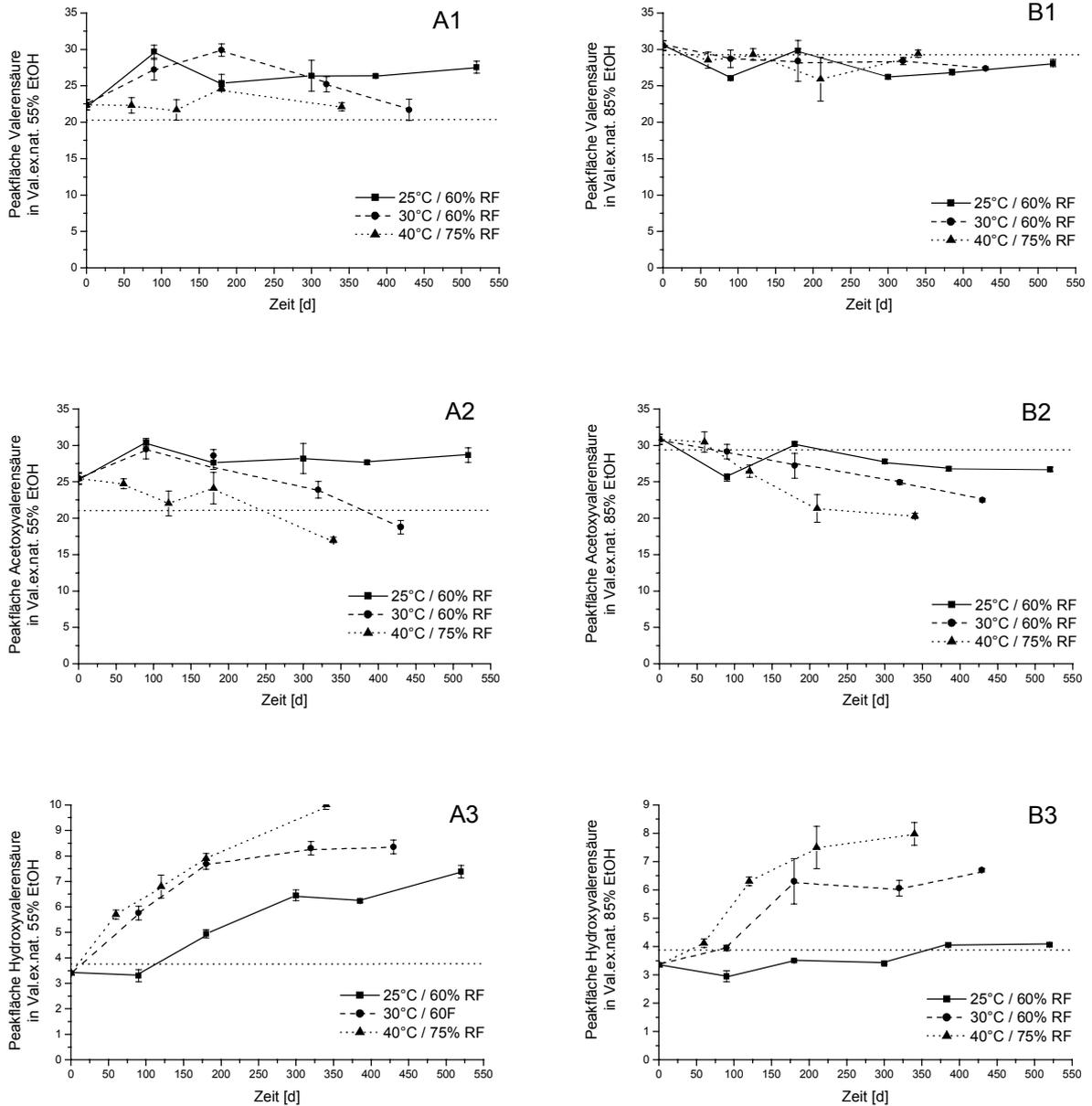


Abb. 47: Vergleich des Verlaufs der Valerensäuren in nativen ethanolschen Extrakten.
 A: Auszugsmittel 55% EtOH, B: Auszugsmittel 85% EtOH, 1: Valerensäure, 2: Acetoxyvalerensäure, 3: Hydroxyvalerensäure
 (gepunktete Linie gibt eine Veränderung von 10% zum Ausgangswert wieder)

3.2.6.4. DC-Untersuchungen des methanolischen Baldrianwurzel-Trockenextraktes

Im folgenden wurde untersucht, ob sich die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen hinsichtlich der Veränderungen der Valerensäuren durch die dünnschichtchromatografische Untersuchung bestätigen lassen. Es wurden dazu lediglich die unverpackten Extrakte und die in PE-Weithalsflaschen verpackten Extrakte bei 25°C / 60% rF und 40°C / 75% rF untersucht, da diese die größten Unterschiede im HPLC-Peakflächenverlauf zeigten.

Bei einer Lagerung unter 25°C / 60% rF sollten sich nach den HPLC-Ergebnissen keine gravierenden Veränderungen im Anteil der Valerensäuren für beide Verpackungen zeigen. Die in Abb. 48 gezeigten Chromatogramme bestätigen dieses Ergebnis. Als signifikantes Merkmal hat sich in der DC-Untersuchung der Einsatzdroge die Veränderung der Hydroxyvalerensäure erwiesen (siehe 3.2.5.4). Für die entsprechende Bande ist für diese Lagerbedingung bei der Untersuchung des Extraktes keine Intensitätszunahme erkennbar, was für die Stabilität der Probe spricht.

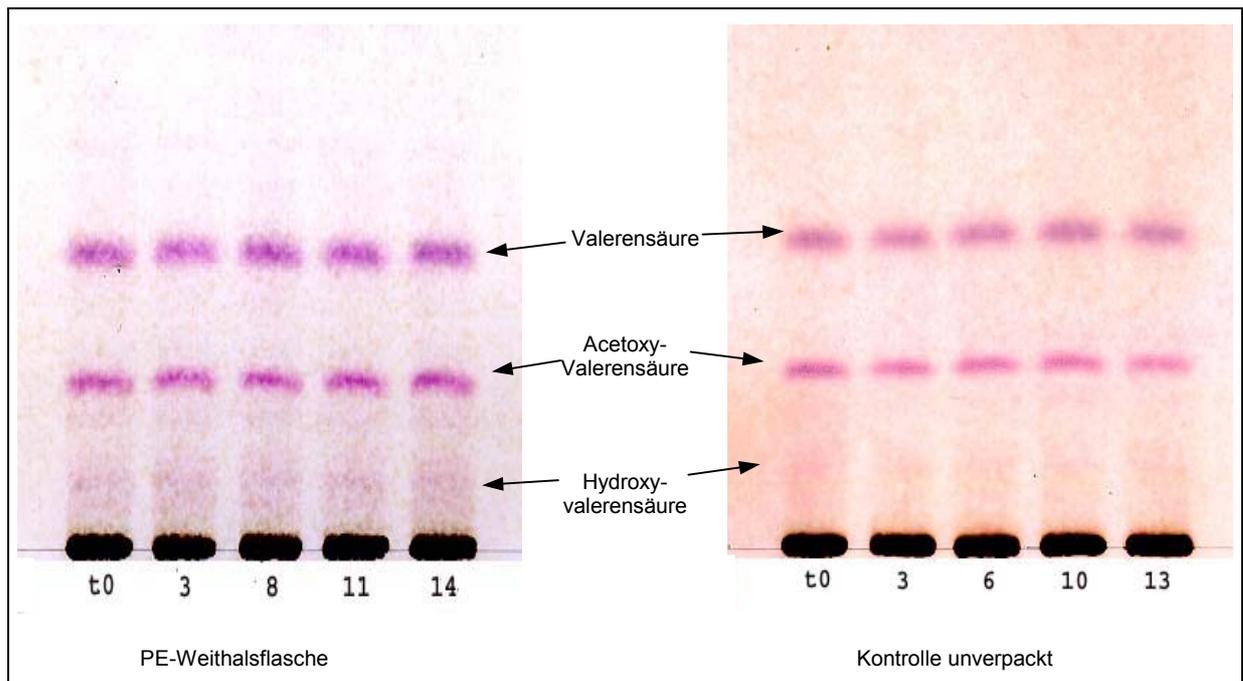


Abb. 48: DC-Vergleich zwischen Baldrianwurzel-Trockenextrakt verpackt in PE-Weithalsflaschen und unverpackt bei einer Lagerung unter 25°C / 60% rF (Zahlen unter der Startlinie geben die Lagerzeit in Monaten an)

Anders verhält es sich während der Lagerung bei 40°C / 75% rF (Abb. 49). Während der Extrakt in der PE-Weithalsflasche, wie aus den HPLC-Untersuchungen zu erwarten war, kaum Veränderungen hinsichtlich des Flecks der Hydroxyvalerensäure zeigt, ist für den unverpackten Extrakt diese Bande ab dem ersten Entnahmezeitpunkt deutlich zu erkennen. Das alleinige Vorhandensein einer Bande bei ca. $R_f=0,2$ unter diesen Probenaufbereitungsbedingungen könnte daher als Instabilitätskriterium genutzt werden. Allerdings ist die Methode zur Identifikation von Zunahmen von lediglich 5 bzw. 10%, wie es durch die ICH-guideline auch für pflanzliche Fertigarzneimittel gefordert wird, nach den vorliegenden Untersuchungen nicht gut geeignet. Der unverpackte Extrakt zeigt bereits bei 25°C / 60% ein Zunahme der Hydroxyvalerensäure von mehr als 10%, was aber nicht deutlich zu erkennen ist.

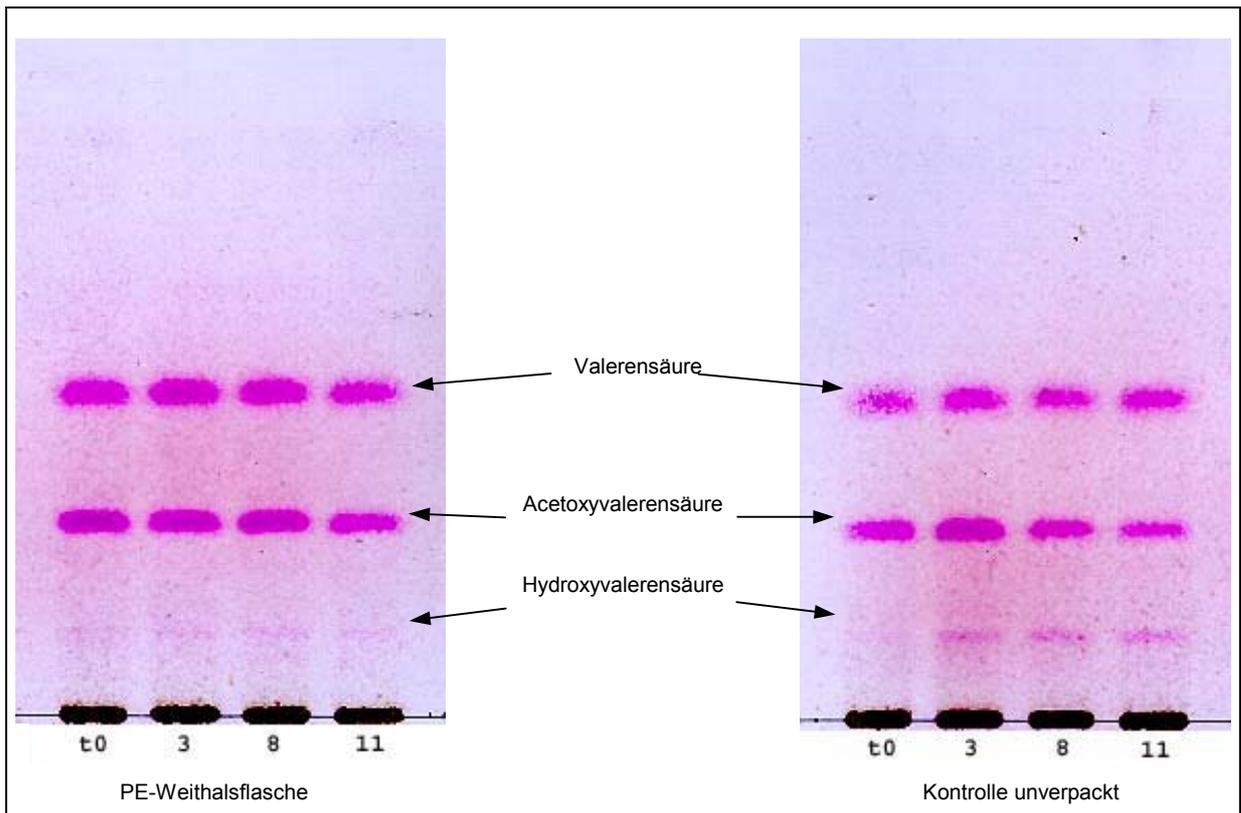


Abb. 49: DC-Vergleich zwischen methanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt verpackt in PE-Weithalsflaschen und unverpackt bei einer Lagerung unter 40°C / 75% rF (Zahlen unter der Startlinie geben die Lagerzeit in Monaten an)

Nachdem die Bestimmung der Lignane durch die HPLC-Methode keine stabilitätsrelevanten Ergebnisse brachten, ist auf die DC-Überprüfung dieser Inhaltsstoffe an dieser Stelle verzichtet worden.

3.2.6.5. Aussagen zur Stabilität von Baldrianextrakten

Wie bereits gezeigt, stellt die Auswertung der Gesamtvalerensäuren nur einen ungenügenden Parameter zur Beurteilung der Stabilität von Baldrianpräparaten dar. Genauere Daten erhält man nur nach Auswertung der einzelnen Valerensäuren. In Tabelle 2 sind die ermittelten Haltbarkeitswerte (Zeit bis zur Unter- bzw. Überschreitung der 10%-Grenze) aus der Extrapolation der Verlaufskurven der beiden Extrakte für die Acetoxy- und Hydroxyvalerensäure zusammengeführt. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der Haltbarkeitsdauer bei Erhöhung der Temperatur und der relativen Feuchte. In PE-Beuteln verpackte und unverpackte Extrakte können bei keiner der drei Klimabedingungen als ausreichend stabil erachtet werden, da innerhalb weniger Tage bzw. Wochen 90% des Ausgangswertes unter- bzw. 110% überschritten wurden. Extrakte in PE-Weithalsflaschen und alukaschierten Beuteln zeigen längere Haltbarkeiten. Lediglich der ethanolische Baldrianextrakt in PE-Weithalsflaschen und alukaschierten Beuteln zeigt für Hydroxyvalerensäure einen annä-

hernd gleichbleibenden Verlauf. Allerdings sinkt auch für diesen Extrakt der Anteil der Acetoxyvalerensäure schnell unter 90% des Ausgangswertes.

Extrakt	Verpackungsart	Acetoxyvalerensäure			Hydroxyvalerensäure		
		Lagerungsbedingungen			Lagerungsbedingungen		
		25°C / 60% rF	30°C / 60% rF	40°C / 75% rF	25°C / 60% rF	30°C / 60% rF	40°C / 75% rF
Val.ex.sicc.	PE-Weithalsflasche	221*	164*	203*	522*	340	102
	Alukaschierte Beutel	199*	228*	188*	228*	483	95
	PE-Beutel	92*	60*	64*	587	69	35
	Kontrolle unverpackt	137*	80*	65*	223	104	11
Val.ex.spir.sicc.	PE-Weithalsflasche	269*	249*	186*	3076*	267	83
	Alukaschierte Beutel	302*	260*	232*	3108*	208	148
	PE-Beutel	209*	178*	88*	53*	60	33
	Kontrolle unverpackt	211*	190*	57*	236	37	14

Tabelle 2: Zeit [d] bis zur Unterschreitung von 90% bzw Überschreitung von 110% des Ausgangswertes der beiden Valerensäuren, in Abhängigkeit von Verpackung und Lagerung der untersuchten handelsüblichen Extrakte

* Regression über fallende Gerade

Eine weiterer Aspekt sollte der Nachweis möglicher Unterschiede zwischen der Stabilität der Extrakte und der Einsatzdroge sein. Für die Verpackung in PE-Weithalsflaschen kann der Unterschied zwischen Einsatzdroge und Extrakt hinsichtlich der Stabilität bei den verschiedenen Lagerbedingungen aufgezeigt werden. Abb. 50 zeigt eine Gegenüberstellung der prozentualen Veränderung zum Ausgangswert der Valerensäuren bei den unterschiedlichen Lagerbedingungen. Es wird ersichtlich, dass bei gleicher Verpackung die pulverisierte Baldriandroge wesentlich empfindlicher ist als der untersuchte Extrakt. Bereits bei der relativ stabilen Valerensäure zeigen sich doppelt so große Abnahmen der Peakfläche. Die Abnahme der Acetoxyvalerensäure ist mit 72% gegenüber 17% für die bei 40°C / 75% rF gelagerten Proben bei der Einsatzdroge fast vier mal so hoch. Eine Vervielfachung der Zunahme findet sich auch im Falle der Hydroxyvalerensäure für die Pulverdroge im Vergleich mit dem Extrakt, der lediglich um 55% zunimmt. Bei der Baldrian-Pulverdroge zeigen sich lagerungsbedingt unterschiedlich steile Verläufe. Im Extrakt verhalten sich die Inhaltsstoffe für die unterschiedlichen Einlagerungsbedingungen bei dieser Verpackung im wesentlichen gleich.

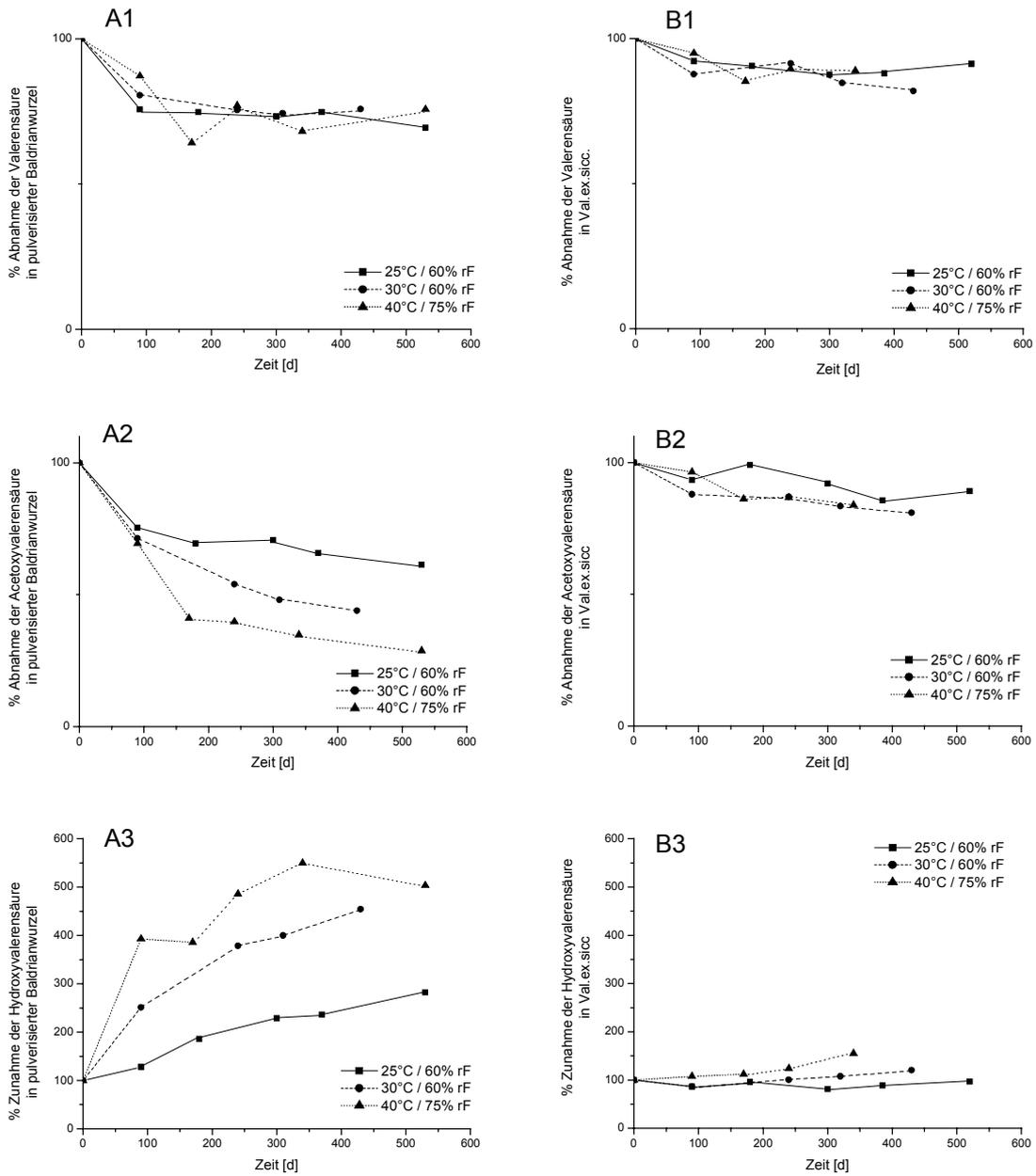


Abb. 50: Vergleich zwischen pulverisierter Baldrianwurzel (A) und methanolischem Baldrianwurzel-Trockenextrakt (B) hinsichtlich der Veränderungen der Valerensäuren in Prozent bei gleicher Verpackung (PE-Weithalsflasche)
 1: Valerensäure 2: Acetoxyvalerensäure 3: Hydroxyvalerensäure

Mögliche Ursachen für die verminderte Stabilität des Drogenpulvers könnten der wesentlich höhere Wassergehalt, oder das Vorhandensein von noch aktiven Enzymen sein.

3.2.7. Identifikation der unbekanntenen Inhaltsstoffe

3.2.7.1. *Fraktionierung der Baldrianextrakte*

Zur Isolierung der nicht identifizierten Inhaltsstoffe wurden zunächst vier Fraktionen unterschiedlicher Polarität mittels Soxhlet-Extraktion gebildet. Das Ausgangsmaterial war für zwei Monate bei 70°C im Trockenschrank degradierte pulverisierte Baldrianwurzel, die im HPLC-fingerprint die unter 3.2.5.3 gezeigten Veränderungen aufwies (Abb. 51). Ziel sollte es sein, die drei in Fläche und Höhe zunehmenden Peaks (10,11,12) zu isolieren und identifizieren. Der Gehalt der gesuchten Inhaltsstoffe lag jeweils unter 0,5% , so dass die Ausbeuten zum Teil nur sehr gering ausfielen. Zur Vorfraktionierung wurde das Drogenmaterial durch Soxhlet-Extraktion in Fraktionen unterschiedlicher Polarität geteilt. Die Extraktionsfolge bestand aus Hexan (Fraktion H1), gefolgt von Ethylacetat, Methanol und schließlich einer Mazeration des Drogenrückstandes in Wasser (Fraktion W1) (siehe dazu auch 5.6.1.1).

Wie die HPLC-Überprüfung der Fraktionen zeigte, waren mit Peak 11 und 12 zwei der gesuchten Verbindungen in der Hexanfraktion vereinigt (Abb. 52). Zur weiteren Abtrennung der unpolaren Anteile wurde der gewonnene Extrakt mit Methanol 50% ausgeschüttelt (Fraktion H1/M50). Im verbliebenen Extrakt waren infolgedessen nur noch die Peaks 11, 12 und 13 zu detektieren (Abb. 53).

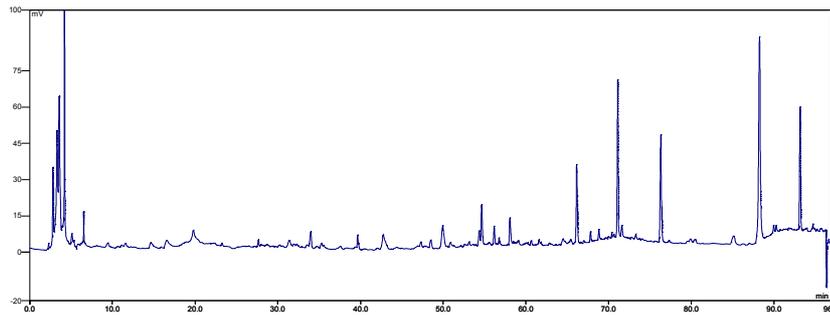


Abb. 51: Zwei Monate bei 70° gelagerte pulverisierte Baldrianwurzel

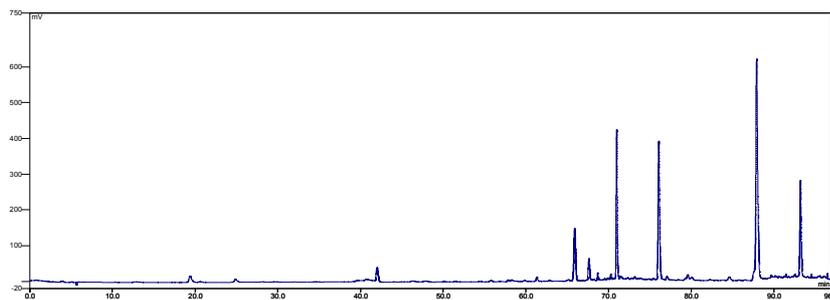


Abb. 52: Vorextraktion des Drogenmaterials mit Hexan (Fraktion H1)

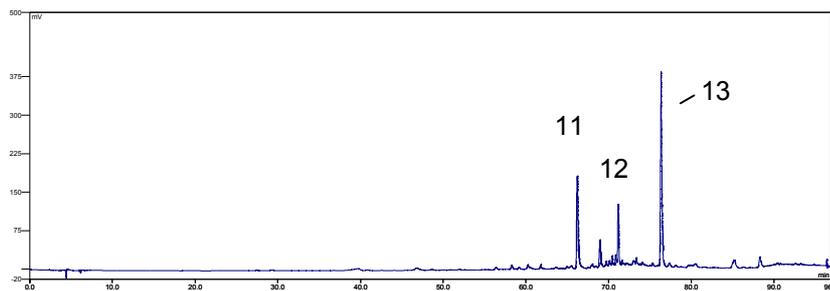


Abb. 53: Mit 50% Methanol ausgeschüttelte Hexanfraktion (Fraktion H1/M50)

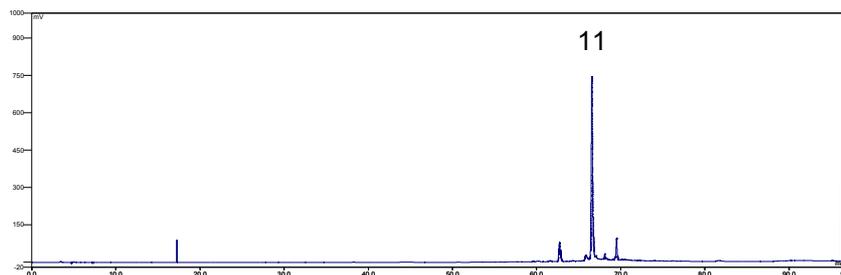
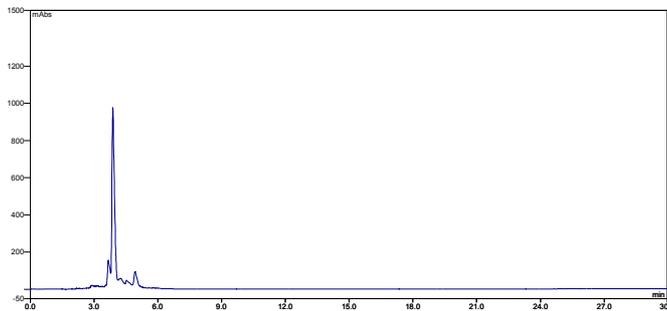


Abb. 54: Fraktion 13 der präparativen Säulenchromatographie (Peak 11) an RP 18-Material

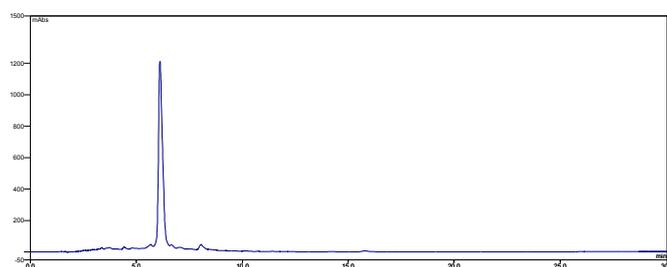
Fraktion H1/M50 wurde anschließend einer säulenchromatografischen Trennung mittels eines Methanol-Stufengradienten unterzogen, der 22 Sammelfraktionen hervorbrachte, die per HPLC untersucht wurden. Die drei Substanzen waren jeweils in einer der Fraktionen mit einer chromatografischen Reinheit von über 90% bei 225 nm wiederzufinden (Abb. 55). Für

die schnellere Überprüfung wurde eine kurze isokratische HPLC-Methode geschaffen (5.5.4.2).



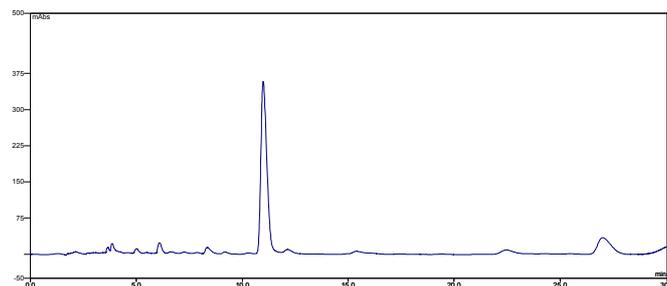
Fraktion 13

(entspricht Peak 11)



Fraktion 16

(entspricht Peak 12)



Fraktion 19

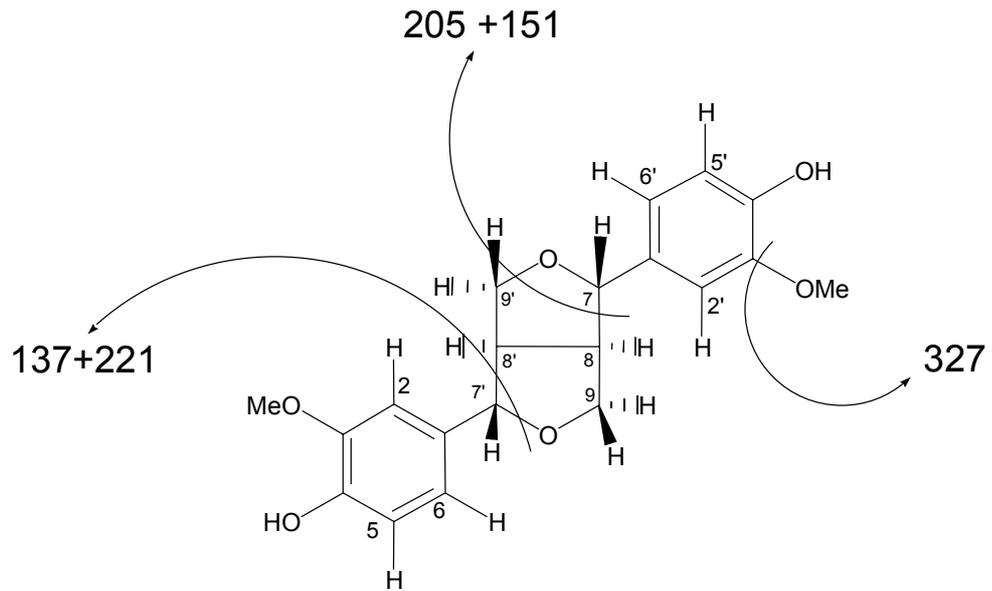
(entspricht Peak 13)

Abb. 55: Isokratische HPLC-Methode zur Untersuchung der Sammelfractionen nach Trennung auf RP18-Material

Die gewonnenen Reinsubstanzen konnten gleichzeitig über ihre spektroskopischen Daten (HPLC-DAD) den entsprechenden Substanzklassen zugeordnet und im Anschluss durch MS und NMR in ihrer Struktur bestätigt werden.

3.2.7.2. Identifikation der isolierten Abbauprodukte

Peak 11 zeigte mit Maxima im UV-Spektrum bei 230 nm und 279 nm das typische Spektrum eines Lignans. Um eine genaue Zuordnung zu treffen, wurde die Verbindung mittels negativ ESI-MS untersucht und das Signal des Moleküliions bei 356,9 m/z ermittelt. Daraufhin war zu vermuten, dass es sich um Pinoresinol mit einer Masse von 358 g/mol handeln müsse. Die Untersuchung per EI-MS (Tabelle 3) zeigte die entsprechenden Signale der Hauptfragmente.



Pinoresinol

Ion	m/z	rel.Int.	m/z (Lit.)*	rel.Int. (Lit.)*
M ⁺	358,1	42	358	32
[M-MeO] ⁺	327,2	5	327	15
[M-HO=CHAr(OH)OMe] ⁺	205,2	15	205	12
[HO=CHAr(OH)(OMe)] ⁺	151,1	100	151	100
[CH ₂ Ar(OH)(OMe)]	137,1	51	137	80
	131,1	32	131	26

Tabelle 3: EIMS-Daten der isolierten Substanz (Peak 11) und Pinoresinol [*BODESHEIM (1996)]
(Spektrum siehe Anhang 6.2.3)

Die anschließende Untersuchung mittels $^1\text{H-NMR}$ in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ und der Vergleich der resultierenden Signallagen und Kopplungskonstanten konnte die Identität von Pinoresinol zweifelsfrei bestätigen (Tabelle 4).

Proton	Anzahl der Protonen	Multiplizität	Verschiebung [ppm]	Kopplung	J [Hz]	Verschiebung [ppm] (Lit.)*	J [Hz] (Lit.)*
H-8 bzw 8'	2H	m	3,05-3,11	H-9 _{eq} , H-9 _{ax} , H-7	-	3,09	-
H-9 _{ax} bzw 9' _{ax}	2H	dd	3,7947	H-9 _{eq} H-8	9,1294 3,6259	3,8	9,0 3,6
2 × OMe	6H	s	3,8385	-	-	3,85	
H-9 _{eq} bzw 9' _{eq}	2H	dd	4,1951	H-9 _{ax} H-8	9,0996 7,1526	4,2	9,0 6,9
H-7 bzw H-7'	2H	d	4,6625	H-8	4,2915	4,67	4,1
H-5 bzw H5'	2H	d	6,7808	H-5, H-6	8,0864	6,79	8,1
H-6 bzw H-6'	2H	dd	6,8311	H-6, H-5 H-6, H-2 H-6, ?	8,0913 1,9322 0,6507	6,84	8,1 1,8
H-2 bzw H-2'	2H	d	6,9852	H-2, H-6	1,9471	6,99	1,8
2 × OH	2H	s	7,5970	-	-	7,53	-

Tabelle 4: $^1\text{H-NMR}$ -Daten der gefundenen Substanz (Peak 11) und Literaturdaten zu Pinoresinol [*NABETA ET AL. (1991)] (Spektrum siehe 6.1.2)

Die Peaks 12 und 13 zeigten beide mit Maxima bei 219 nm und 217 nm das typische UV-Spektrum der Valerensäuren. Aus dem Retentionsverhalten existierender HPLC-Trennsysteme [z.B. FREYTAG (1983)] und dem Flächenanteil konnte abgeleitet werden, dass es sich bei Peak 12 vermutlich um Hydroxyvalerensäure und bei Peak 13 um Acetoxyvalerensäure handeln müsste. Die Signale der Molekülonen nach ESI-MS der beiden isolierten Substanzen bestätigten mit 248,9 m/z für Peak 12 und 291,0 m/z für Peak 13 die vermuteten Identitäten. Valerensäure wurde mittels Coelution einer Referenzsubstanz zuvor identifiziert.

3.2.7.3. Identifikation weiterer Inhaltsstoffe

Die eindeutige Zuordnung von Peak 11 zu den Lignanen ließ hinter den anderen Peaks im HPLC-Spektrum, die das gleiche UV-Spektrum zeigten, weitere von BODESHEIM (1996) und SCHOLLE (1998) beschriebene Lignane vermuten. Von besonderem Interesse waren

dabei die Glykoside des Pinoresinols, da über ihre Gehaltsveränderung mögliche Rückschlüsse über die Abbauewege zum Pinoresinol, als dem markantesten Abbauprodukt, gezogen werden könnten.

Den größten Anteil der unbekanntesten Peaks zeigt die Wasser-Fraktion W1 aus der Vorextraktion des Baldrianpulvers. Diese Fraktion wurde analog der Fraktion H1 mittels methanolischer Stufen-Elution über eine RP18 Säule in 21 Sammelfraktionen aufgetrennt. Die nachfolgende HPLC-Überprüfung ergab wiederum drei Fraktionen mit isolierten Einzelsubstanzen, die alle das UV-Spektrum der Lignane zeigten (Abb. 56). Durch Vergleich der UV-Spektren und durch Coelution mit der Einsatzdroge konnten sie den Peaks 5, 7 und 10 zugeordnet werden.

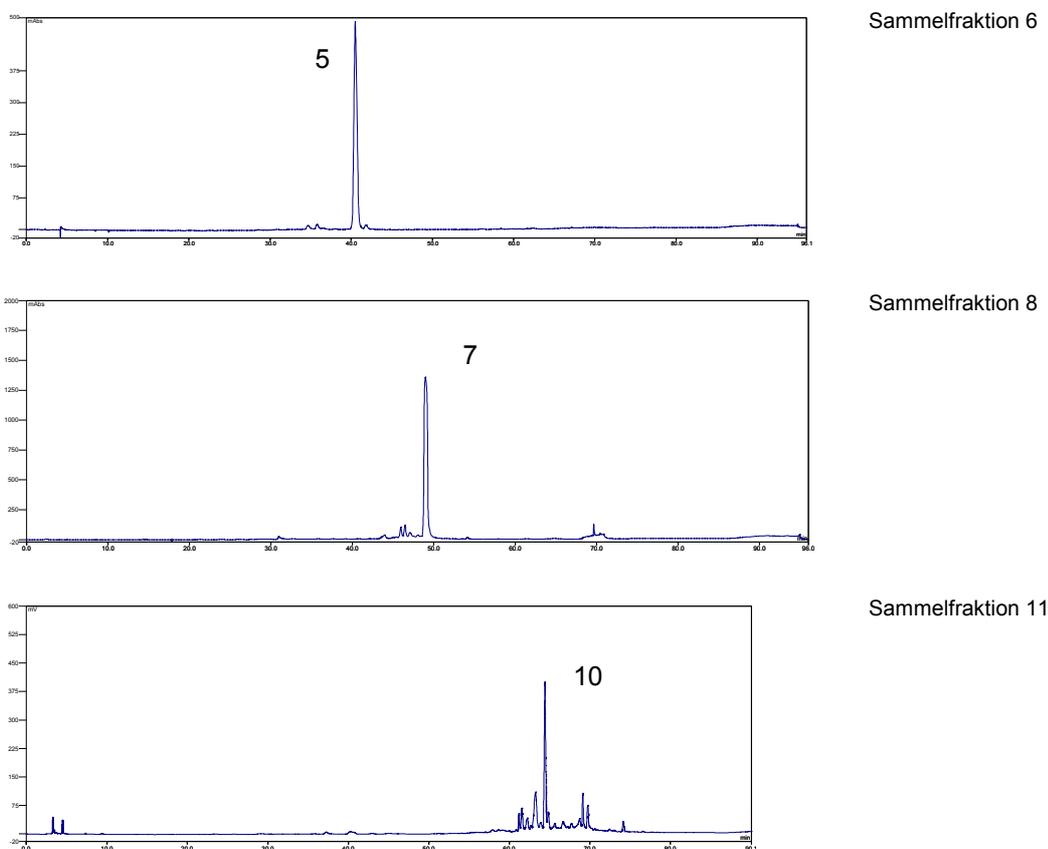


Abb. 56: Sammelfraktionen der Säulenchromatographie von Fraktion W1

Negatives ESI-MS der drei Verbindungen ließ als Fraktion 6 mit 681,3 m/z das Pinoresinol-4,4'-di-O- β -glucosid, hinter Fraktion 8 mit 535,2 m/z eines der 8-Hydroxypinoresinolglykoside identifizieren (siehe Anhang 6.2). Peak 10 konnte nicht als reine Einzelsubstanz isoliert werden, da sein Gehalt sehr gering war, und so wurde Fraktion 11 per LC-MS über APCI untersucht. Mit 373,1 m/z ließ sich der Peak dem 8-Hydroxypinoresinol zuordnen (siehe 6.2.4). Fraktion 5 konnte in ausreichender Quantität isoliert werden, um die Struktur durch $^1\text{H-NMR}$ in CD_3OD abzusichern (Tabelle 5).

Proton	Anzahl der Protonen	Multiplizität	Verschiebung [ppm]	Kopplung	J [Hz]	Verschiebung [ppm] (Lit.)*	J [Hz] (Lit.)*
H-8 bzw 8'	2H	m	3,1304	H- γ_{eq} , H- γ_{ax} , H- α	-	3,11	-
H-9 _{ax} bzw 9' _{ax}	2H	dd	3,921	H-9 _{eq} H-8	9,4756 3,4846	3,89*	-
2 × OMe	6H	s	3,8708	-		3,89	-
H-9 _{eq} bzw. 9' _{eq}	2H	dd	4,259	H-9 _{ax} H-8	6,7246 9,1669	4,24	6,95 8,9
H-7 bzw H-7'	2H	d	4,7644	H-8	3,7902	4,75	4,2
H-5 bzw H5'	2H	d	7,1471	H-5, H-6	8,3141	7,14	8,4
H-6 bzw H-6'	2H	dd	6,9194	H-6, H-5 H-6, H-2	8,3752 1,7729	6,91	8,5 2,0
H-2 bzw H-2'	2H	d	7,0294	H-2, H-6	1,9563	7,02	2,0
Glucose H-1' bzw 1''		d	4,8747		7,4582	4,84	7,2

* vom OCH₃ Signal überlagert

Tabelle 5: ¹H-NMR Daten zu Pinoresinoldiglusosid und Peak 5. *[SCHUHMACHER (2002)] (Spektrum siehe 6.1.1)

In folgendem Fließschema (Abb. 57) ist die Isolation der sechs identifizierten Substanzen im Zusammenhang dargestellt:

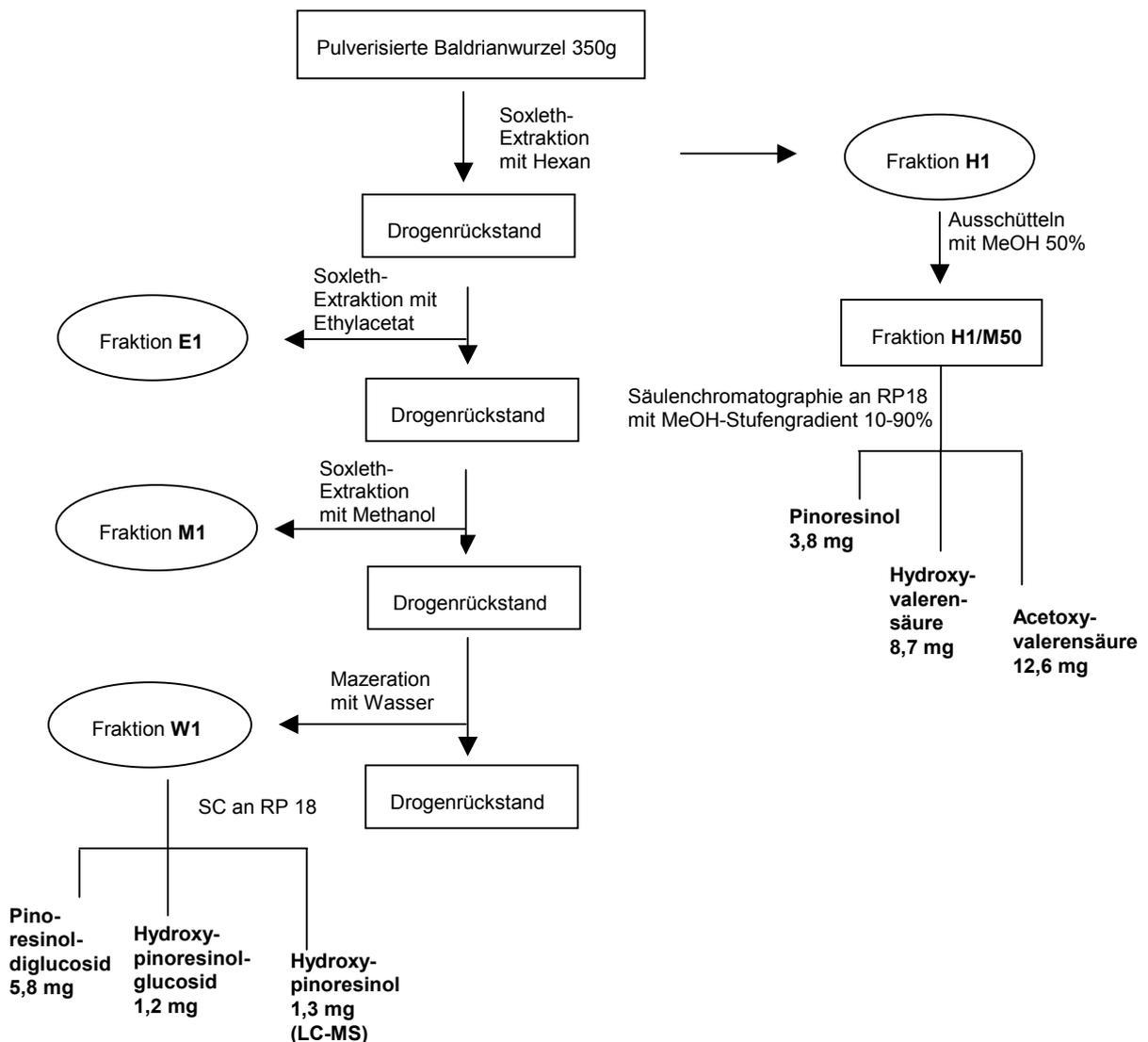


Abb. 57: Schema über die Fraktionierungsschritte der isolierten Substanzen

3.2.8. Zusammenfassung und Diskussion

Eine HPLC-Gradientenelution zur Erfassung unpolarer und mittelpolarer Inhaltsstoffe der Baldrianwurzel konnte auf RP-18 Material neu etabliert und validiert werden. Im HPLC-fingerprint können drei Valerensäuren und acht Lignane detektiert werden. Für einige dieser Verbindungen konnte die Identität nach Isolierung über Säulenchromatographie durch MS oder NMR abgeklärt werden. Die Lignane Pinoresinol und Hydroxypinoresinol, sowie die Hydroxyvalerensäure stellten dabei die wichtigsten stabilitätsrelevanten Inhaltsstoffe dar.

Die Beobachtung der Veränderungen einiger relevanter Inhaltsstoffe des Baldrians in Pulverdroge und Extrakten bei unterschiedlichen Lagerbedingungen und Verpackung ließen allgemeingültige Aussagen zum Stabilitätsverhalten dieser Präparate zu:

Die Inhaltsstoffe der pulverisierten Baldrianwurzel stellten sich in ihrem typischen Stabilitätsverhalten als empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen, wie erhöhter Temperatur und Feuchtigkeit heraus. Im Bereich der Valerensäuren zeigte sich bei der HPLC-Untersuchung eine, in ihrer Größe von den oben genannten Einflüssen abhängige Abnahme der Acetoxyvalersäure. Demgegenüber stand eine deutliche Zunahme des resultierenden Abbauproduktes Hydroxyvalerensäure, die sich gleichzeitig als die empfindlichste und damit am besten nutzbare Leitsubstanz für Stabilitätsprüfungen der Baldriandroge erwies. Die Valerensäure zeigte sich im Vergleich dazu relativ stabil.

Die alkoholischen Baldrian-Extrakte zeigten die gleiche Entwicklung, allerdings nicht in vergleichbar starkem Ausmaß. Die in PE-Weithalsflaschen und alukaschierten Beuteln gelagerten Extrakte erwiesen sich als gleichwertig verpackt und zeigten sich am wenigsten empfindlich gegenüber den unterschiedlichen Einlagerungsbedingungen nach ICH. In PE-Beutel verpackte und unverpackte Kontrolleextrakte können den derzeit gültigen Stabilitätsanforderungen in keiner Weise gerecht werden.

In Bezug auf verschiedene Leitsubstanzen können unterschiedliche Haltbarkeitswerte ermittelt werden, die aber in keinem Fall den Ansprüchen einer $\pm 10\%$ Grenze voll entsprechen könnten. Am ehesten kann der ethanolische Extrakt für die Lagerung bei $25^{\circ}\text{C} / 60\% \text{ rF}$, verpackt in PE-Weithalsflaschen oder alukaschierten Beuteln, im Rahmen der hier angesetzten Messgenauigkeit und unter Betrachtung der Hydroxyvalerensäure als Leitsubstanz als ausreichend stabil gesehen werden. Der methanolische Extrakt hingegen kann unter den gleichen Lagerungsanforderungen einer $\pm 10\%$ -Spezifikation nicht gerecht werden.

Es sollte eine Kennzeichnung angebracht werden, dass die Baldrianextrakte vor Feuchtigkeit und Wärme geschützt gelagert werden müssen.

Unter alleiniger Auswertung des Gehaltes an Gesamtvalerensäuren liegen die Extrakte zu meist über einer Abnahme von 10% zum Ausgangsgehalt. Die wirklichen Abbauvorgänge hingegen werden durch diese Betrachtungsweise verdeckt.

Die Befunde der HPLC-Untersuchungen können im wesentlichen durch dünnschichtchromatographische fingerprints bestätigt werden. Allerdings kann die Dünnschichtchromatographie als alleinige Methode die stabilitätsrelevanten Veränderungen nicht in ausreichendem Maße erfassen.

Neben der Veränderung im Bereich der Valerensäuren zeigte sich bei der pulverisierten Baldrianwurzel eine deutliche Veränderung im Lignanspektrum. Die Glykoside werden sehr

stark abgebaut, was zu einer deutlichen Zunahme der Aglyka Pinoresinol und Hydroxypinoresinol führte. Auch diese Entwicklung ist durch die Wahl der Lagerungsbedingungen beeinflussbar. Die methanolischen und ethanolischen Extrakte zeigten keine deutliche Zunahme dieser Aglyka, was wiederum auf eine erhöhte Stabilität dieser galenischen Formulierung schließen lässt.

3.3. Stabilität von pulverisierten Sennesblättern und Sennesblättertrockenextrakten

3.3.1. Beschreibung der Droge



Gemäß PH.EUR. (2002f) stehen zur Gewinnung der Blattdroge zwei Stammpflanzen zur Verfügung. Es handelt sich dabei um die in Afrika vorkommende Art *Cassia senna* L. (= *C. acutifolia*; Alexandriner-Sennes) und die aus Indien stammende Art *Cassia angustifolia* (Tinnevelly-Sennes). *Cassia angustifolia*-blätter stammen von einem bis zu 2 m hoch wachsenden Strauch, während die Stammpflanze für *C. senna*-blätter mit einer maximalen Wuchshöhe von 60cm wesentlich kleiner ist [WAGNER (1999b)]. Die eingesetzten Fiederblätter der beiden *Cassia*-Arten können mikroskopisch anhand geringfügiger morphologischer Unterschiede differenziert werden:

Die Blätter von *C. angustifolia* sind bis zu 2 cm breit und bis zu 4 cm lang, von gelbgrüner Farbe und mit wenigen bis zu 150 μm langen Haaren besetzt. Bei *C. acutifolia* hingegen finden sich Blätter mit einer maximalen Breite von 1 cm und einer maximalen Länge von 9 cm, die lang und schmal sind. Sie sind graugrün gefärbt und stärker behaart, mit Haaren, die bis 250 μm lang sind [HÄNSEL et al. (1999b)]. Die Tinnevelly-Droge gilt der Alexandrinerdroge derzeit als qualitativ überlegen, da sie in geeigneterer Kultur und nach sorgfältiger Ernte gewonnen wird [HÄNSEL et al. (1999b)].

3.3.2. Inhaltsstoffe

3.3.2.1. Sennoside

STOLL et al. (1949, 1950) identifizierten die für *Cassia*-Arten spezifischen Sennoside A und B erstmalig als Glykoside von Dianthronen. Das Grundgerüst besteht als Homo-dianthron aus zwei Molekülen Rhein. Diese als Sennidine von STOLL (1950) eingeführten Aglyka besitzen an den Positionen 10 bzw. 10' je ein Chiralitätszentrum, so dass mit Sennidin A und Sennidin A₁ (=G) [CHRIST et al. (1978), TANAKA et al. (1982)] zwei optisch aktive Isomere möglich sind. Sennidin B stellt die optisch inaktive meso-Form dar, da sich hier die entgegengesetzte optische Drehung der Aktivitätszentren kompensiert (Abb. 58) [HÄNSEL et al.

(1992b)]. Die Homo-dianthrone machen den mengenmäßig größten Anteil an Dianthron-aglyka aus.

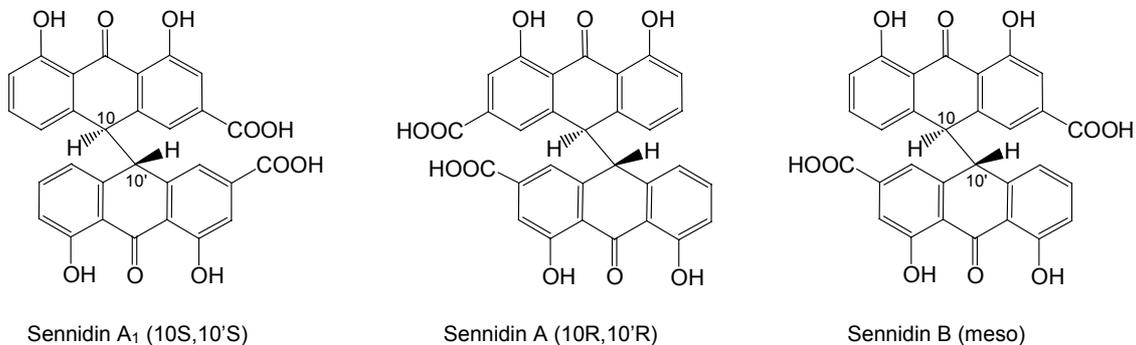


Abb. 58: Aglyka der Sennoside nach HÄNSEL et al. (1992b)

Die Sennidine sind an den Positionen 8 und 8' mit Glucose verknüpft. Die daraus resultierenden Sennoside A, A₁ und B machen in etwa 80% der Dianthronglykoside aus. In sehr geringem Anteil findet sich aus der Gruppe der Homo-dianthronglykosid, noch das Dianthron des Aloe-emodins [NAHAJIMA et al. (1985)].

Neben den Sennidinen existieren Hetero-Dianthrone, die formell aus je einem Molekül Rhein und Aloe-Emodin zusammengesetzt sind. Die daraus, nach Verknüpfung mit Glucose resultierenden, von SCHMID und ANGLIKER (1965) identifizierten Sennoside C, C₁ und D machen die restlichen 20% der Dianthronglykoside aus (Abb. 59).

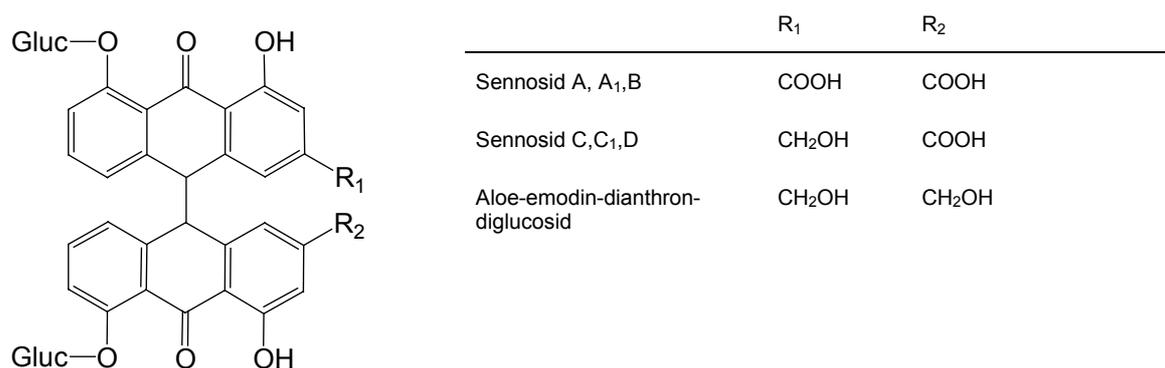


Abb. 59: Dianthrone aus Sennedrogen nach HÄNSEL et al. (1992b)

Um arzneibuchkonform zu sein, muss die Blattdroge einen Mindestgehalt von 2,5% Hydroxyanthracen-glykosiden, berechnet als Sennosid B und bezogen auf die getrocknete Droge, enthalten [PH.EUR (2002f)].

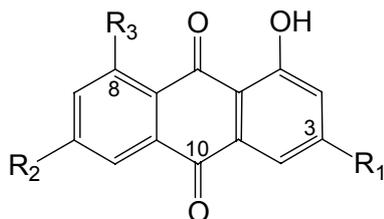
Neben den oben genannten Sennosiden sind noch weitere Dianthrone von sehr geringem Gehaltsanteil beschrieben: Mit Rheidin findet sich ein weiteres Hetero-dianthron-aglykon, das aus je einem Molekül Rhein und Emodin besteht [LEMLI (1986)]. Bei den Sennosiden E und F handelt es sich um mit Oxalsäure am Zucker veresterte Sennoside A und B, die erstmalig von OSHIO et al. (1974) im Rhabarber nachgewiesen wurden und als Inhaltsstoffe von Sennesblättern beschrieben sind. Ihre Wirkung soll doppelt so hoch sein wie die der anderen Sennoside, und sie gelten als gute prodrugs [WAGNER (1999b)].

Nach LEMLI und CUVELEE (1978) liegen die Dianthrone genuin nicht in der Pflanze vor, sondern werden erst während der Trocknung bei 20°C und 50°C gebildet. Die Frischpflanze enthält nur die Anthronglykoside. Diese Transformation ist enzymatischen Ursprungs, wobei die dianthronbildenden Enzyme in der lebenden Pflanze getrennt von den Anthronen lokalisiert sind. Die Transformation findet erst nach dem Absterben der Pflanze und der Aufhebung der Kompartimentierung statt [RIMPLER (1999)]. ATZORN et al. (1981) bestätigten die Ergebnisse von LEMLI und CUVELEE (1978) durch radioimmuno assay. Für Rhein-8-glykosid konnte obendrein bewiesen werden, dass dieses Anthrachinon-glykosid in gleicher Menge in frischer und getrockneter Pflanze vorliegt, und somit der Aufbau der Dianthrone aus monomeren Anthrachinonglykosiden als unwahrscheinlich gelten kann. Scheinbar stellen die Sennoside und die Monoanthrachinonglykoside laut ATZORN et al. (1981) ein für die physiologischen Abläufe der Pflanze wichtiges Redoxsystem dar.

Die Gehaltsbestimmung der 1,8-Anthrachinonderivaten muss gemäß PH.EUR. (2002f) nach der modifizierten Bornträger Reaktion durchgeführt werden. Dazu werden zunächst aus dem wässrigen Drogenextrakt die Anthrachinonaglyka mittels Chloroform abgetrennt. Die in der wässrigen Phase verbliebenen Dianthron-Glykoside werden mit Eisen-(III)-chlorid oxidativ in die monomeren Anthrachinon-glykoside gespalten. In einem letzten Schritt werden die glykosidischen Verknüpfungen durch saure Hydrolyse gespalten, so dass die freien Aglyka vorliegen. Nach erneutem Ausschütteln mit Ether wird nach Zugabe von Magnesiumacetat der resultierende rote Komplexfarbstoff spektrophotometrisch bei 515 nm vermessen. Nach den Untersuchungen von MEILHAMMER (2003) hat die Methode einige Nachteile, wie die große Streubreite der Ergebnisse, den Zeitaufwand und einen hohen Verbrauch toxikologisch problematischer Lösungsmittel. Außerdem besteht keine Möglichkeit die einzelnen Inhaltsstoffe unabhängig voneinander zu bestimmen. Neben den Sennosiden wird auch das mengenmäßig bedeutende Rhein-8glykosid mitbestimmt. Für die Gehaltsbestimmung und Stabilitätsprüfung empfiehlt sich daher eher die Bestimmung mittels HPLC.

3.3.2.2. Anthrachinone

Neben den Dianthronen finden sich mit den Anthrachinonen auch die oben aufgeführten Grundbausteine für die möglichen Dimeren (Abb. 60). Rhein, Aloe-Emodin, Chrysophanol und Physicon sind charakteristische Inhaltsstoffe aller *Cassia* Untergattungen und Arten. Sie können als Mono- und Diglucoside, sowie in der Anthronform in der Pflanze gefunden werden [CRELLIN et al. (1961)]. Daneben wurde von KINJO et al. (1994) das Emodin-sophorosid als weiteres Anthrachinon-diglucosid aus Tinnevelly-Sennesblättern identifiziert.



	R1	R2	R3
Rhein	COOH	H	OH
Aloe-emodin	CH ₂ OH	H	OH
Chrysophanol	CH ₃	H	OH
Physicon	CH ₃	OCH ₃	OH
Rhein-8-glucosid	COOH	H	β-D-Glucose
Aloe-emodin-8-glucosid	CH ₂ OH	H	β-D-Glucose
Emodin-8-O-sophorosid	CH ₃	OH	Sophorose

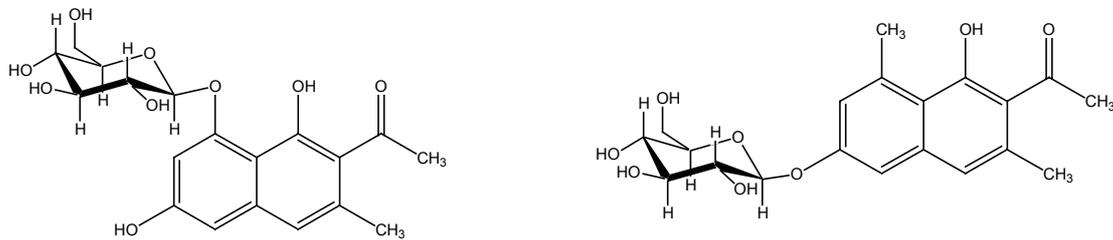
Abb. 60: Anthrachinonderivate aus *Cassia senna* nach SCHNEIDER et al. (1992c)

Der durch HPLC-Methode ermittelte Gehalt an Anthrachinonderivaten in Sennesblättern beläuft sich nach GRIMMINGER und WITTHOLM (1993) für Rhein auf 0,03-0,11%, Rhein-8-glykosid 0,03-0,04%, Aloe-Emodin 0,01-0,04% und dessen Glykosid 0,01-0,18%. Während die freien Anthrachinone keine direkte Wirkung zeigen, tragen die Anthrachinonglykoside zur laxativen Wirkung bei [LENG-PESCHLOW (1988)].

3.3.2.3. Naphtalenderivate

Von analytischem Interesse sind die von LEMLI et al. (1981) identifizierten Naphtalenglykoside aus *C. senna* und *C. angustifolia*. Anhand ihres Vorkommens kann zwischen den beiden Arten dünnschichtchromatographisch unterschieden werden. Mit einem densitometrisch gemessenen Gehalt von 0,8% ist in den Blättern von *C.senna* nur das 6-Hydroxy-musizin

enthalten, während sich in den Blättern von *C.angustifolia* lediglich das Tinnevellinglykosid mit einem Gehalt von 0,4% findet (Abb. 61) [LEMLI et al. (1983)].



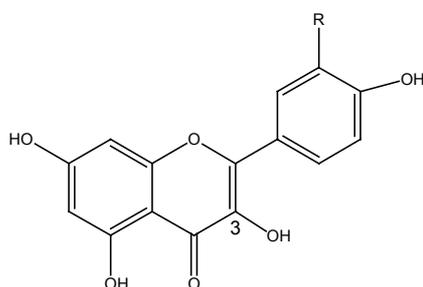
6-Hydroxymusizin-glucosid (C.Senna)

Tinnevellin-glucosid (C.angustifolia)

Abb. 61: Naphtalenglycoside aus *Cassia senna* und *Cassia angustifolia* nach LEMLI (1981)

3.3.2.4. Flavonoide

Nach KINJO et al. (1994) finden sich in den Blättern von *Cassia angustifolia* einige Flavonoid-glykoside und Aglyka. Es handelt sich um Flavonoid-Glykoside mit den Grundkörpern Isorhamnetin, Quercetin und Kämpferol (Abb. 62), die mit Gentiobiose an Position 3 des Grundgerüsts verknüpft sind.



	R
Isorhamnetin	OCH ₃
Quercetin	OH
Kämpferol	H

Abb. 62: In Sennesblättern vorkommende Flavonoide nach KINJO et al. (1994)

3.3.2.5. Weitere Inhaltsstoffe

Sennesblätter enthalten bis zu 0,05% ätherisches Öl, das u.a. aus Mono- und sesquiterpenen, Phenylpropanen und Fettsäuren besteht [SCHULTZE et al. (1996)].

MÜLLER et al. (1988) konnten in der wasserlöslichen Polysaccharidfraktion L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Glucose, Xylose, Mannose, D-Galaktose und D-Galakturonsäure sowie Polysaccharide, aufgebaut aus diesen Monomeren, und Schleimstoffe identifizieren.

Weitere nicht näher beschriebene Inhaltsstoffe sind laut EVANS (1989) β -Sitosterol und dessen Glykosid, Salicylsäure, Oxalsäure und Wachse.

Daneben werden von BRUNETON (1999) 10-12% mineralische Bestandteile und ein Polyol (Pinitol) angegeben.

3.3.3. Indikationen und Anwendung

Im 9. Jahrhundert wurde die Sennesdroge von arabischen Ärzten nach Europa eingeführt und wegen ihrer abführenden Wirkung benutzt [HILLER und MELZIG (2000)].

Inzwischen gehören Sennesblätter und Zubereitungen daraus zu den am häufigsten eingesetzten pflanzlichen Abführmitteln [WICHTL (2002)]. Die ESCOP Monographie (1997) zu Sennesblättern weist als Indikation die Anwendung für nicht mehr als 1-2 Wochen bei akuter Obstipation aus. Die Anwendung soll sich dabei auf Personen mit einem Alter über 10 Jahren beschränken. Als wirksame Inhaltsstoffe wurden die Dianthronglykoside angegeben.

Die Untersuchungen zur Pharmakokinetik der Sennoside zeigte, dass diese Gruppe von Wirkstoffen als prodrugs angesehen werden können [DE WITTE (1993)]. Dabei stellen die Dianthronglykoside und Anthrachinon-O-glykoside die Transportform dar, die erst während der Darmpassage in die entsprechenden Anthrone als Wirkform umgewandelt werden. Durch β -Glucosidasen werden dabei die glykosidischen Bindungen gespalten und die Aglyka freigesetzt, die anschließend in einem reduktiven Prozess zu den Anthronen reagieren. Als verantwortlich für diese Spaltung sind anaerobe Bakterien im Colon nachgewiesen worden [HATTORI et al. (1993)]. Die Anthrone sind ausreichend lipophil, um über die Darmwand resorbiert zu werden [SCHULZ et al. (1998)] und treten daher im Gegensatz zu den Sennosiden auch systemisch in Erscheinung. Neben einem geringen Anteil der ursprünglichen Anthrachinonderivaten, können in den Faeces farbige Ausscheidungsprodukte nachgewiesen werden, die vermutlich die Folge von Polymerisationsreaktionen im alkalischen sind [HIETALA et al. (1988)].

Die laxative Wirkung von 1,8-Dihydroxyanthracenverbindungen tritt erst nach Kontakt mit der Darmschleimhaut des Colon auf. Sie induzieren eine aktive Sekretion von Natrium und Wasser (=sekretagoge Wirkung) und hemmen die Rückresorption der Natrium-Ionen (anti-resorptive Wirkung), was zur Stuhlverflüssigung führt [SCHULZ (1998)]. Die Extrakte erzielen dabei einen stärkeren Effekt als aus ihrem Sennosidgehalt zu erwarten sein müsste, was auf synergistisch wirkende Begleitstoffe oder unbekannte laxative Prinzipien schließen lässt [FAIRBAIRN und MOSS (1970)]. Der abführende Effekt ist mit einer Verzögerung von etwa 8-12 h nach oraler Applikation zu erwarten, weswegen die Einnahme am Abend empfohlen wird [STANDARDZULASSUNGEN (1997)]. Die hierfür eingenommene Tagesdosis sollte

nach Kommission E eine Gesamtmenge an Hydroxyanthracenderivaten von 15-30mg pro Tag nicht überschreiten [BANZ (1993)].

Die abführende Wirkung geht mit einer Reihe von leichten Nebenwirkung einher. In den Angaben der STANDARDZULASSUNGEN (1997) finden sich neben krampfartigen Magen-Darm-Beschwerden, eine ungefährliche Rotfärbung des Harns durch Metaboliten. Bei längerer Anwendung tritt eine normalerweise reversible Pigmenteinlagerung in die Darmschleimhaut ein (pseudomelanosis choli). Allerdings kann der Dauergebrauch bzw. Missbrauch anthrachinonhaltiger Präparate zu schweren Störungen des Elektrolythaushaltes führen, was zu Muskelfunktionsstörungen und Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten führen kann.

Eine erhöhte Inzidenz von bösartigen Erkrankungen bzw. Präcancerosen des Colons konnte bisher noch nicht eindeutig ausgeschlossen werden, und wird weiterhin kontrovers diskutiert [WICHTL (2002); WESTENDORF (1993)]. In vitro konnten Emodin und Aloe-Emodin als die Substanzen identifiziert werden, die für die toxikologischen Effekte verantwortlich gemacht werden müssen. Da diese Substanzen nur in sehr geringer Konzentration vorhanden sind, und zum größten Teil als inaktive Polymere über die Faeces ausgeschieden werden, lässt sich kein relevantes kanzerogenes Risiko für den Menschen abschätzen [MENGS (1996)].

3.3.4. Charakterisierung des Ausgangsmaterials

3.3.4.1. Gehaltsverteilung der Inhaltsstoffe (Droge und Extrakte)

Die Gehaltsbestimmung der Inhaltsstoffe von Sennesblättern und –extrakten sollte mittels HPLC-Analytik durchgeführt werden. Hierzu wurden mehrere Systeme geprüft [METZGER et al. (1996), BALA et al. (2001), HAYASHI et al. (1980), TERREAUX et al. (2002), GRIMMINGER und WITTHOLM (1993), SUN und SU (2002)]. Das von MEILHAMMER (2003) entwickelte HPLC-Gradientensystem wurde am geeignetsten für die Stabilitätsprüfung befunden, da alle für die Stabilitätsanalytik relevanten Inhaltsstoffe selektiv nebeneinander bestimmbar sind. Die Detektion der Inhaltsstoffe erfolgte per UV-DAD. Die Vergleichsspektren wurden bei 270 nm aufgenommen. In Abb. 63 ist ein typischer HPLC-fingerprint eines Extraktes aus pulverisierten Sennesblättern dargestellt. Die Zuordnung der Inhaltsstoffe erfolgte über Coelution mit Referenzsubstanzen (Peak 5,6,7,8,9,10,12,13,16,19,20,21,22), durch Isolation und anschließende Bestimmung per ESI-MS (Peak 2,3,4 siehe 3.4.8). Daneben war es möglich, auf Grund des UV-Spektrums Zuordnungen zu Stoffgruppen zu treffen. Der Peak für das Flavonoid-aglykon Quercetin konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Diese Substanz ist in Peak 15 mit enthalten, wird aber von einer zweiten Substanz deutlich überlagert. Quercetin wurde daher in die Gehaltsberechnungen nicht mit einbezogen. In Tabelle 6 ist die Zuordnung der Peaks 1-22 zusammengefasst.

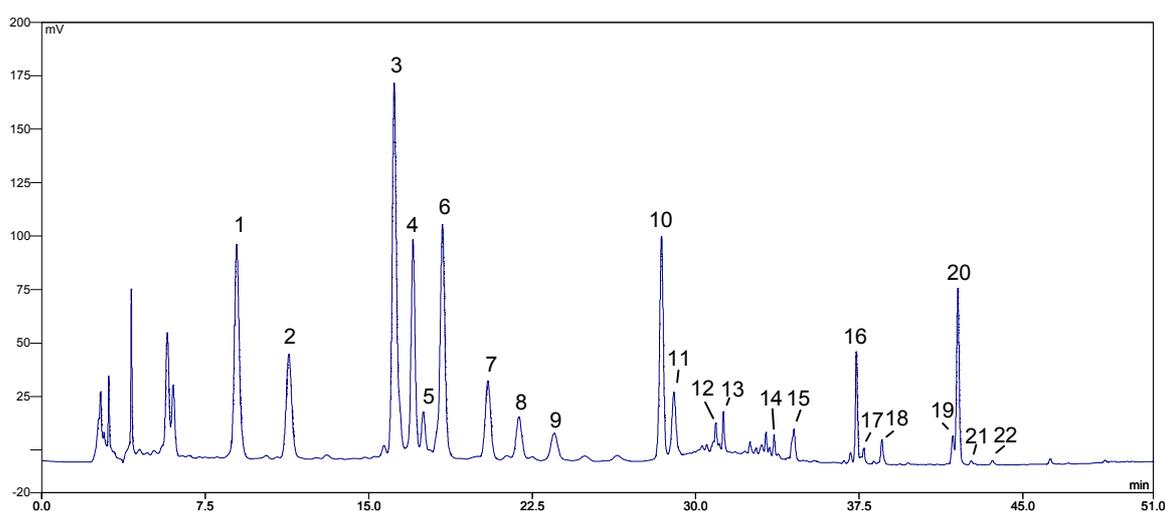


Abb. 63: HPLC-fingerprint eines Extraktes aus Sennesblättern bei 270 nm (nach MEILHAMMER 2003)

Peak Nr.	t _R [min]	Identität	UV-Maxima [nm]	MW	ESI neg [M-H ⁺]	Stoffgruppen-Zuordnung
1	9.29	n.b.	219,274,321			
2	11.78	Quercetin-gentiobiosid ²⁾	255, 263(S), 293(S), 354	626,3	625,1	
3	16.48	Kämpferol-gentiobiosid ²⁾	265, 290(S), 348	610,5	609,1	
4	17.38	Isorhamnetin-gentiobiosid ²⁾	254, 271(S), 297(S), 355	640,6	639,1	
5	17.91	Senosid D ¹⁾	266,353	847,72		
6	18.95	Senosid B ¹⁾	267,308,355	862,72		
7	20.82	Rhein-8-glykosid ¹⁾	230,261	446,35		
8	22.82	Senosid A1 ¹⁾	265,351	862,72		
9	23.98	Senosid C ¹⁾	268,332	847,72		
10	28.52	Senosid A ¹⁾	268,342	862,72		
11	29.14	n.b.	233,266(S),336			Naphtalenderivat ³⁾
12	30.91	Sennidin B-monoglykosid ¹⁾				
13	31.35	Sennidin A-monoglykosid ¹⁾				
14	33.66	n.b.				
15	35.58	n.b.				
16	37.41	Isorhamnetin ¹⁾	265,367			
17	37.74	n.b.	266,			Flavonoid ³⁾
18	38.58	n.b.	233,266(S)			Naphtalenderivat ³⁾
19	41.81	Aloe-Emodin ¹⁾	224,256,286	270,23		
20	42.81	Rhein ¹⁾	230,257	284,23		
21	42.64	Sennidin A ¹⁾		538,46		
22	43.61	Sennidin B ¹⁾		538,46		

Tabelle 6: Zuordnung und Identifizierung der Peaks im HPLC-fingerprint von Sennesblättern , nach Gradientenelution nach MEILHAMMER (2003)

¹⁾ identifiziert durch Coelution mit Referenzsubstanzen

²⁾ identifiziert nach Isolation durch MS siehe 3.4.8.3

³⁾ Zuordnung zu Inhaltsstoffgruppen anhand des UV-Spektrums (S = Schulter im UV-Spektrum)

Die Gehaltsbestimmung erfolgte durch Aufsummierung der entsprechenden Peakflächen und Auswertung über Eichgeraden der jeweiligen Referenzsubstanz (5.5.4.4).

In Abb. 64 ist der Gehalt an Sennosiden in Einsatzdroge und Extrakten dargestellt. Mit den Sennosiden liegen wirksamkeitsbestimmende Verbindungen vor. Dabei handelt es sich um Inhaltsstoffe, die im isolierten Zustand den gleichen oder einen ähnlichen therapeutischen Effekt ergeben wie ein Gesamtextrakt. Bei derartigen Inhaltsstoffen ist eine Normierung der Extrakte, d.h. die Einstellung auf einen Normwert innerhalb eines vorgegebenen Intervalls des Gehaltes der Substanzgruppe vorgeschrieben [GAEDCKE (2000)]. Entsprechend muss der eingestellte Sennesblättertrockenextrakt nach PH.EUR. (2002g) zwischen 5,5 und 8% Hydroxyanthracenglykoside, berechnet als Sennosid B, enthalten. Für die Droge ist mit mindestens 2,5% ebenfalls ein Mindestgehalt im Arzneibuch festgesetzt [PH.EUR. (2002f)]. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass unter den Bedingungen der spektroskopischen Methode nach PH.EUR. die Mono-anthrachinonglykoside, wie z.B. das mengenmäßig nicht unbedeutende Rhein-8-glykosid in die Bestimmung der Hydroxyanthracenderivate mit eingehen. Dieser Wert liegt dadurch höher als der abgebildete, mit HPLC bestimmte Gehalt der Sennoside allein. Dennoch soll im Weiteren der Gehalt an Sennosiden neben Rhein-8-glykosids betrachtet werden, da möglicherweise unterschiedliche Abbauege vorliegen und somit eine mögliche Verfälschung der Verläufe resultiert. Unter Einberechnung des Rhein-8-glykosides bei den mit HPLC ermittelten Ausgangswerten ergäben sich für die Einsatzdroge ein Gehalt an 1,8-Hydroxyanthracenderivaten von 2,9%, für den handelsüblichen Extrakt ein Gehalt von 8,7% und den nativen Extrakt ein Gehalt von 4,1%. Dabei zeigt sich, dass die beiden Extrakte nicht arzneibuchkonform sind. Der handelsübliche Extrakt liegt über dem geforderten Wert. Dieser hohe Wert kann aber auf die generell um 10% höheren Werte bei der HPLC-Methode zurückzuführen sein [MEILHAMMER (2003)]. Der native Extrakt liegt unterhalb des geforderten Gehalts-Intervalls, was auf die spezifische Herstellungsmethode zurückzuführen ist.

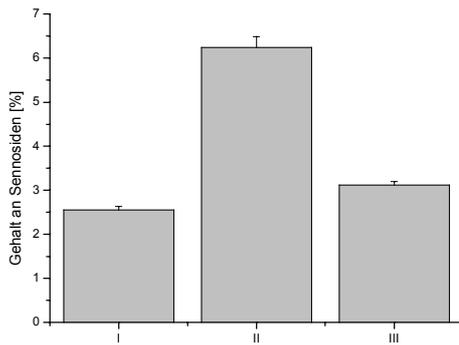


Abb. 64: Gehalt an Gesamtsennosiden der Einsatzdroge und der Extrakte berechnet als Sennosid B

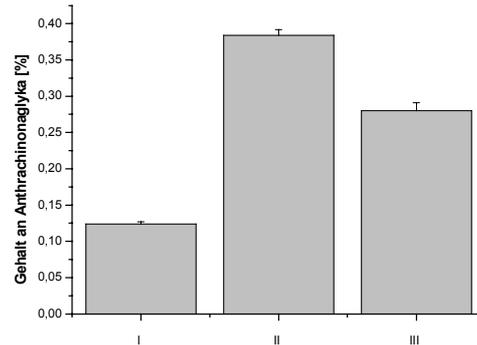


Abb. 65: Gehalt an Anthrachinonaglyka der Einsatzdroge und der Extrakte berechnet als Rhein

I: Sennesblätter pulverisiert; II: Methanolischer Sennesblättertrockenextrakt; III: Nativer ethanolischer Sennesblätterextrakt

Der Gehalt der Anthrachinonaglyka Rhein und Aloe-Emodin lag im Ausgangsmaterial mit 0,12% an der oberen Grenze des von GRIMMINGER und WITTHOLM (1993) festgesetzten Intervalls. Nativer und handelsüblicher Extrakt enthielten die drei- bzw. vierfache Menge an Anthrachinonaglyka (Abb. 65).

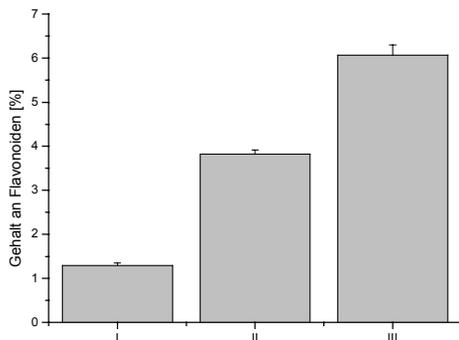


Abb. 66: Gehalt an Flavonoiden der Einsatzdroge und der Extrakte berechnet als Isorhamnetin

I: Sennesblätter pulverisiert; II: Methanolischer Sennesblättertrockenextrakt; III: Nativer ethanolischer Sennesblätterextrakt

Zum Gehalt an Flavonoiden liegen bisher keine Literatur-Daten vor. Der Gesamtgehalt bezogen auf die Summe aus zwei Aglyka und drei Glykosiden, berechnet als Isorhamnetin, ergab für die Eingangsdroge einen Wert von 1,3%, für den handelsüblichen Extrakt einen Wert von 3,6% und den nativen Extrakt einen Wert von 5,6%. Damit stellt die Fraktion der Flavonoide den größten Anteil im nativen Extrakt dar (Abb. 66).

3.3.4.2. Pulvereigenschaften

Analog zu den Baldrianpräparaten wurden zur Beobachtung der physikalischen Veränderungen die Pulvereigenschaften dokumentiert. Der Trocknungsverlust der Ausgangsdroge von 10,39% und des Extraktes mit 2,32% lag unter den vom Arzneibuch vorgeschriebenen Höchstgrenzen. Daneben wurde auch für die Sennespräparate eine Korngrößenverteilung durch Siebanalyse durchgeführt [PH.EUR. (2002d)]. Sie zeigt für die pulverisierte Einsatzdroge eine normalverteilte Korngrößenzusammensetzung (Abb. 67). Der Extrakt wiederum ist durch eine einheitliche Verteilung auf zwei Sieben charakterisierbar (Abb. 68).

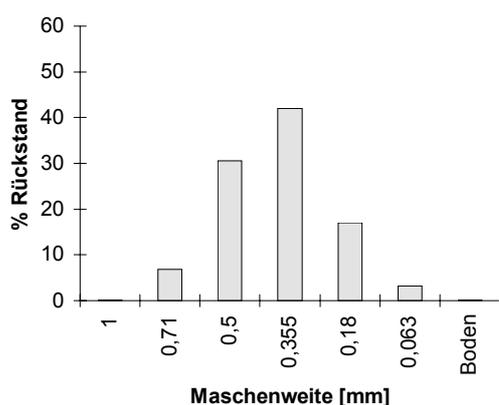


Abb. 67: Korngrößenverteilung der pulverisierten Sennesblätter

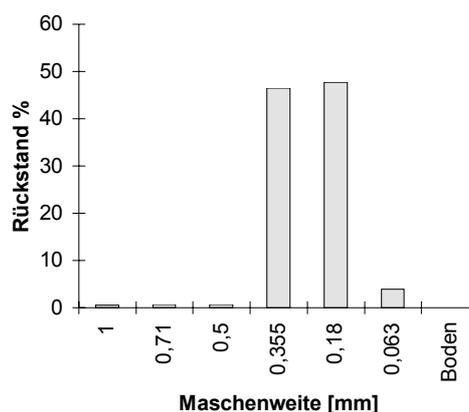


Abb. 68: Korngrößenverteilung des Sennesblätterextraktes

3.3.5. Stabilitätsuntersuchungen zu pulverisierten Sennesblättern

3.3.5.1. Vorhandene Untersuchungen zur Stabilität von Sennesdrogen

Die bereits oben erwähnten Untersuchungen zum Vorkommen der Dianthrone in Sennesblättern von LEMLI et al. (1978) zeigte eine Zunahme der Sennoside während der Trocknung bis 50°C. Der Gesamtanthrachinongehalt sowie der Gehalt an Sennosiden und Monoglykosiden verringerte sich bei Trocknung über dieser Temperatur deutlich. Gleichzeitig mit diesem Abbau steigt der Gehalt an Sennidinen, die die Abbauprodukte der Sennoside darstellen, an. Diesen Umwandlungen liegt ein spezifischer enzymatischer Abbau zu Grunde. Diese Untersuchung zeigte, dass die Sennoside deutlich temperaturabhängige Veränderungen zeigen.

MALINGRE [1968] liefert einen Überblick über mögliche Abbaureaktionen in Sennesextrakten. Die bei der Extraktion zur Verbesserung der Löslichkeit der Anthranoide zugegebene Natriumcarbonatlösung verursacht eine erhöhte Empfindlichkeit gegen oxidative Einflüsse. Allgemein lässt sich sagen, dass die Lagerung flüssiger Sennespräparate zu einem Verlust

an Anthrachinonglykosiden führt. Allerdings ließ sich dabei kein Anstieg der zu vermutenden Aglyka beobachten, woraus möglicherweise ein anderer Abbauweg als die reine Hydrolyse zu vermuten ist.

Stabilitätsaspekte von Sennosiden in Lösung untersuchte LAINONEN et al. (1988). Dabei konnte er für die chemische Stabilität dieser Substanzen in wässriger Lösung eine Abhängigkeit vom pH-Wert finden. Die günstigsten Bedingungen für eine stabile Lagerung bestehen dabei bei einem pH-Wert von 6,5. Die Haltbarkeit beträgt unter diesen Bedingungen dennoch lediglich 8,5 Monate. Ein sich während der Lagerung im wässrigen Milieu bildendes farbiges Abbauprodukt wies bei Mäusen eine höhere laxative Wirkung auf als die Sennoside allein (LAINONEN (1988b)].

Unter ähnlichen Voraussetzungen wie bei den in dieser Arbeit eingesetzten Lagerbedingungen und Verpackungsmaterialien hat ALERT (1985) die Stabilität von anthrachinonhaltigen Drogenmaterialien untersucht. Dabei konnte er während der Lagerung zunächst einen Anstieg glykosidisch gebundener Anthrachinone finden. Dies führte er auf die nicht vollständig abgelaufenen Umwandlungen während der vorgeschriebenen Lagerung der Droge (*Frangula alnus*) zurück. Gleichzeitig war aber auch die Zersetzung zu beobachten, weil das freie Aglykon anstieg. Gepulverte Drogen wiesen dabei höhere Empfindlichkeit als geschnittene Drogen auf. Die Verpackung in alukaschierten Beuteln zeigte bei niedriger Luftfeuchte keine Vorteile gegenüber Papierbeuteln. Bei hoher Luftfeuchte allerdings waren sie den Papierbeuteln überlegen. Ein Anstieg der Temperatur zeigte ohne Erhöhung der Luftfeuchte keinen Effekt. Bei erhöhter Luftfeuchte und erhöhter Temperatur setzen allerdings fulminante Degradationsprozesse ein. Neben Faulbaumrinde wurde Cascararinde untersucht. Die C-glykosidisch verknüpften Anthrachinonglykoside zeigten dabei eine wesentlich höhere Stabilität als die O-Glykoside aus *Rhamnus alnus*. Die Veränderungen von Aloepräparaten waren lediglich physikalischer und mikrobieller Art. Abhängig von den Lagerbedingungen zeigten die Extrakte Pilzbefall und Sinterung. Eine Veränderung der chemischen Zusammensetzung war dabei nicht festzustellen.

Für Rhein-8-glykosid wurde von BOVENTER (1988) ein stark schwankender Gehalt in Abhängigkeit von der Aufbereitungsart diagnostiziert. Besonders für Kaltauszüge lässt sich die Konzentration schwer bestimmen, woraus ein enzymatischer Abbau zu schließen war. Dabei scheint die Konzentration der entsprechenden Enzyme in Sennesfrüchten größer zu sein als in Blättern. MEILHAMMER (2003a) konnte eine enzymatisch bedingte komplette Degradation des Rhein-8-glykosid im Kaltansatz von Sennesblättertee nachweisen. Bei einer Extraktion, bei der die entsprechenden Enzyme vermutlich denaturiert werden, wie z.B. beim Heißwasserextrakt, läuft dieser Prozess nicht ab. Substrat für die Glucosidasen ist allein das Rhein-8-glykosid. Gleichzeitig mit der Degradation findet eine Zunahme des entsprechenden

Aglykons Rhein statt. Nach Ablauf der Degradation nimmt allerdings diese Substanz in ihrem Gehalt auch wieder ab, was für eine weitere Zersetzung spricht. Daneben weist MEILHAMMER (2003b) im Kaltansatz eine Zunahme der Sennidinmonoglykoside nach, was wiederum auf eine enzymatische Spaltung der Sennoside schließen lässt. Im Heißansatz werden diese Substanzen wiederum nicht gefunden.

Die von HIETALA et al. (1988) als Metaboliten nachgewiesenen Polymerisationsprodukte, müssen auch, als während der Lagerung möglicherweise auftretende Stoffe, in Betracht gezogen werden.

3.3.5.2. Vorausgehende Untersuchung

Um mögliche Abbaureaktionen zu forcieren wurde der methanolische Extrakt bei 70°C im Trockenschrank aufbewahrt und während vier Monaten beobachtet. Die Veränderung der Peakflächen ausgewählter Substanzen über die Zeit gibt Abb. 69 wieder. Wie nach LEMLI et al. (1978) zu erwarten war, zeigten sich diverse Transformationen. Die Sennoside nahmen in Bezug zum Ausgangswert deutlich ab. Dagegen zeigte, als mögliches Abbauprodukt aus den drei aufgeführten Sennosiden, das Rhein-8-glykosid zunächst einen Anstieg, um dann ebenfalls abzunehmen. Rhein hingegen nahm über die Zeit stetig zu.

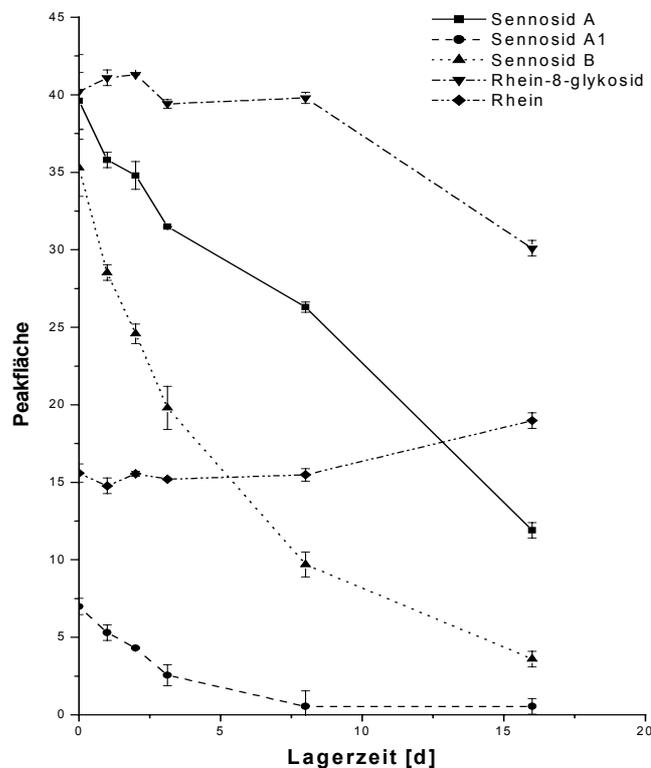


Abb. 69: Verlauf der Peakflächen relevanter Inhaltsstoffe eines bei 70°C im Trockenschrank gelagerten Sennesblättereextraktes

Der daraus ableitbare Abbauweg der Sennoside A, A1 und B könnte über das Rhein-8-glykosid zum Rhein ablaufen. Durch oxidative Spaltung der C-C Brücke im Dianthrongerüst würden je zwei Moleküle Anthrachinon-O-glykoside anfallen. Dies würde erklären, weshalb diese Substanz im Gehalt zunächst zunimmt. Erst nachdem die Sennoside weitgehend abgebaut sind, und demnach kein Rhein-8-glykosid mehr anfällt, kommt es zu einem Abbau des Rhein-8-glykosids.

3.3.5.3. HPLC Untersuchungen

Alle HPLC Untersuchungen wurden mit der unter 3.3.4 beschriebenen Methode durchgeführt.

Ausgehend von den Voruntersuchungen wurden die Veränderungen im Gehalt der Sennoside und Anthrachinonaglyka sowie der Peakflächen von Rhein-8-glykosid und den Sennidinen bestimmt. Wie aus Abb. 70 zu ersehen ist, ist ein lagerungsabhängiger Abbau der Sennoside zu beobachten. Während bei einer Lagerung bei 25°C / 60% rF eine Abnahme um 22% über die gesamte Laufzeit zu beobachten war, nahm bei 30°C / 60% rF der Gehalt um fast 50% ab. Bei 40°C / 75 % rF waren mit über 98% Abnahme kaum noch Sennoside vorhanden. Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Zunahme der Sennoside in den ersten drei Monaten Lagerung bei 25°C / 60% rF um 25%. Möglicherweise handelt es sich dabei um die von ALERT (1985) bereits bei seinen Untersuchungen an Rhamnus-Drogen festgestellte Oxidation restlicher Anthrone aus dem Pflanzenmaterial.

Gleichzeitig konnte eine Zunahme der Anthrachinonaglyka beobachtet werden (Abb. 71). Bei 25°C / 60% rF und 30°C / 60% rF nahm der Gehalt von Rhein und Aloe-Emodin um 40% bzw. 60% zu. Bei 40°C / 75% rF hingegen stieg der Gehalt zunächst auf über 200% des Ausgangswertes an, und nahm dann im Laufe der Zeit aber wieder auf 150% ab. Daraus lässt sich schließen, dass die anfängliche Zunahme vermutlich durch die Degradation eines Glykosides resultiert. Die Abnahme des Anthrachinongehaltes auf grund ihrer Zersetzung kommt somit erst verzögert zum tragen.

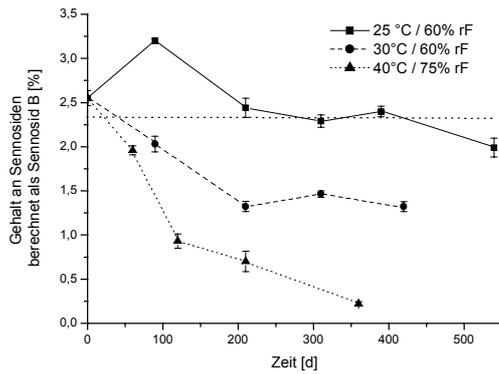


Abb. 70: Abnahme des Gehaltes an Sennosiden in pulverisierten Sennesblättern unter verschiedenen Einlagerungsbedingungen

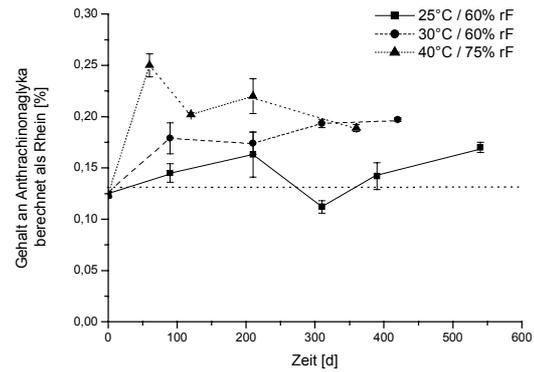


Abb. 71: Zunahme des Gehaltes der Anthrachinonaglyka Rhein und Aloe-Emodin in pulverisierten Sennesblättern unter verschiedenen Einlagerungsbedingungen

Die gepunktete Linie in beiden Abbildungen gibt die Grenze zur Unterschreitung von 90%, bzw. Überschreitung von 110% des Ausgangswertes an.

Wie in den Voruntersuchungen zu sehen war, zeigte der Verlauf des Rhein-8-glykosides zunächst einen leichten Anstieg, der schließlich in eine Abnahme überging. Die Beobachtung der Einsatzdroge unter weniger starker thermischer Belastung zeigte allerdings einen anderen Verlauf für Rhein-8-glykosid (Abb. 72). Unter allen drei Einlagerungsbedingungen konnte eine Abnahme beobachtet werden. Sie verhielt sich in ihrer prozentualen Abnahme in vergleichbaren Größenordnungen wie die Abnahme der Sennoside bei entsprechender Lagerung. Der aus den Voruntersuchungen mit dem Extrakt postulierte Abbau der Sennoside über Rhein-8-glykosid konnte für die Degradation der Einsatzdroge bei niedrigeren Temperaturen nicht bestätigt werden. Um den Abbau der Sennoside zu verfolgen, wurden die Peakflächen der Sennidinmonoglykoside ausgewertet (Abb. 73). Der Kurvenverlauf zeigt eine Zunahme dieser Substanzen in Abhängigkeit von den Lagerbedingungen. Der Verlauf der einzelnen Kurven ist vergleichbar mit den Verläufen des Gehaltes der Anthrachinonaglyka. Bei 25°C / 60% rF bzw. 30°C / 60% rF nahm die Peakfläche auf das doppelte bzw. 5,5-fache zu. Bei 40°C / 75% zeigte sich zunächst wieder ein starker Anstieg auf die fast sechsfache Fläche des Ausgangswertes, die aber mit der Zeit wieder um ein viertel der Fläche abnahm. Die Zunahme der Sennidinmonoglykoside als Abbauprodukte wurde bereits von MEILHAMMER (2003b) nachgewiesen.

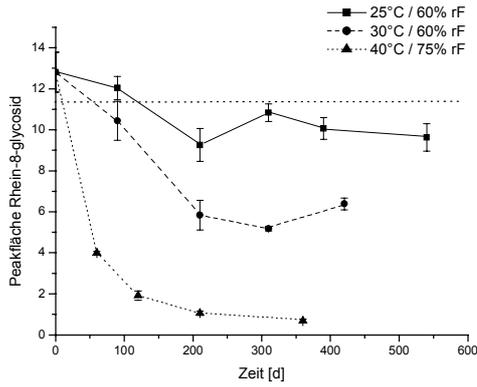


Abb. 72: Verlauf der Peakfläche von Rhein-8-glycosid in Abhängigkeit von den Einlagerungsbedingungen

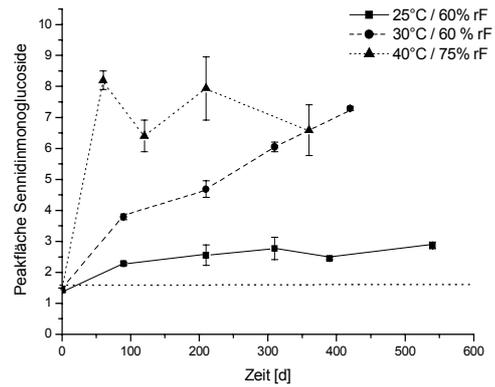


Abb. 73: Verlauf der Peakflächen der Sennidinmonoglycoside in Abhängigkeit von den Einlagerungsbedingungen

Die gepunktete Linie in beiden Abbildungen gibt die Grenze zur Unterschreitung von 90%, bzw. Überschreitung von 110% des Ausgangswertes an.

Um zu evaluieren, ob die Sennidinmonoglykoside weiter abgebaut werden, ist der Verlauf der Peakflächen der Sennidine in Abb. 74 wiedergegeben. Allerdings war für diese möglichen Abbauprodukte lediglich eine Abnahme bei allen klimatischen Bedingungen nachweisbar.

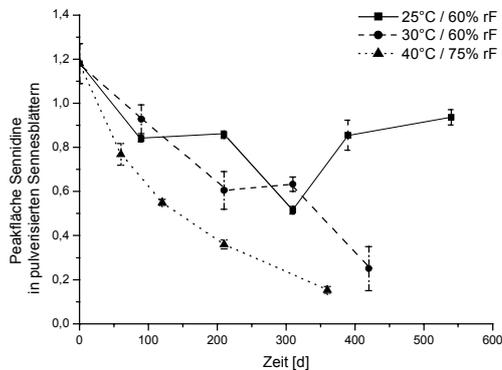


Abb. 74: Verlauf der Peakflächen der Sennidine in Abhängigkeit von den Einlagerungsbedingungen

Die beschriebenen Veränderungen können im HPLC-Fingerprint deutlich nachvollzogen werden (Abb. 75). Während die Peaks der Sennoside kaum mehr nachweisbar sind, gibt es einige Peaks im unpolaren Bereich, die eine Zunahme zeigen. Hierzu gehören die Sennidinmonoglycoside, die Anthrachinone Rhein und Aloe-Emodin und die Flavonoid-aglyka. Im Vergleich zu den Sennosiden nahmen die Peaks der Flavonoid-glykoside weniger stark ab.

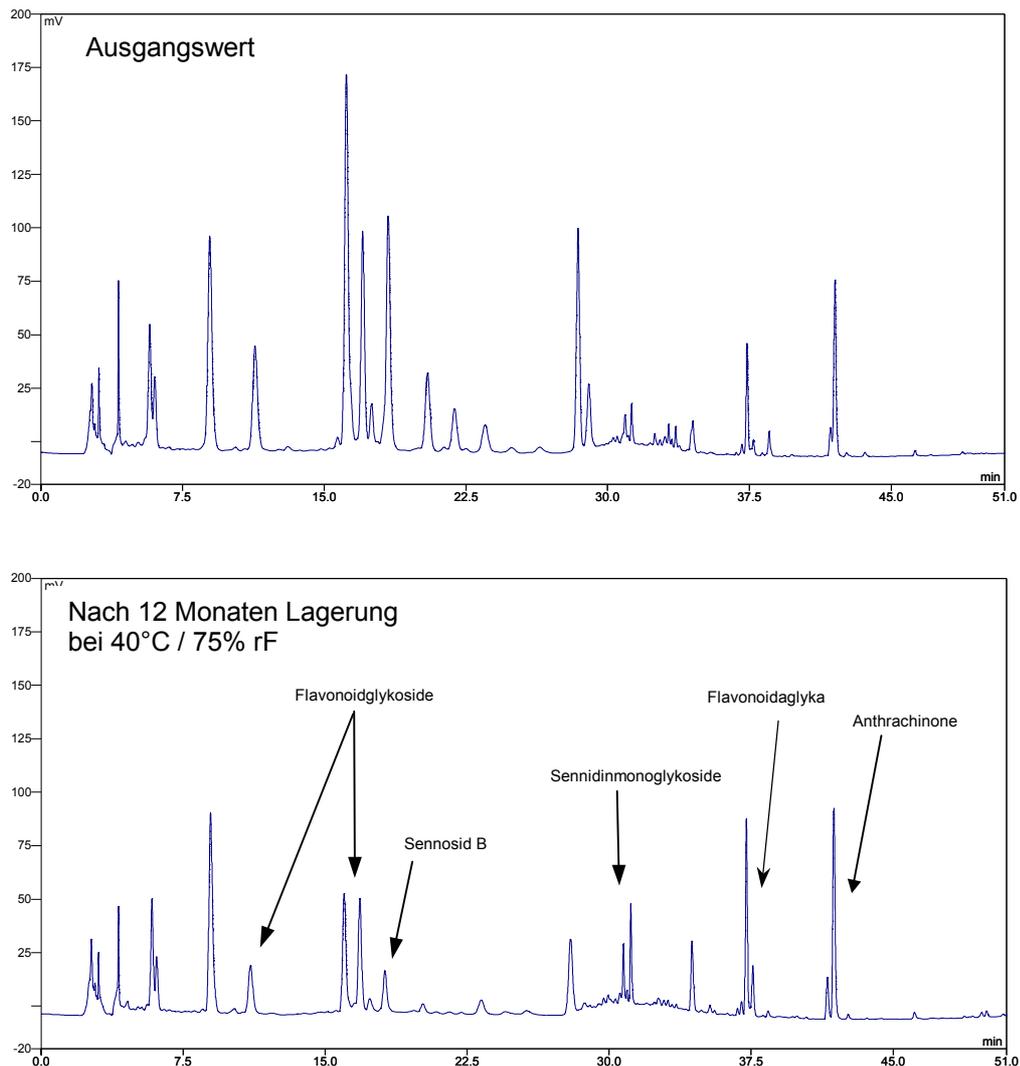


Abb. 75: Vergleich der Fingerprint-chromatogramme des Ausgangszustandes und der Zusammensetzung von Sennesblättern nach einer Lagerung von 12 Monaten bei 40°C / 75% rF

Aus den oben gezeigten Beobachtungen lassen sich für die Stabilität der Sennainhaltsstoffe die folgenden Schlüsse ziehen: Die Degradation der Sennoside erfolgt unter diesen Bedingungen nicht über Rhein-8-glykosid, sondern über die Sennidinmonoglykoside. Die darauf folgenden Abbaureaktionen können nicht weiter spezifiziert werden. Die Zunahme der Anthrachinone rührt vermutlich von der Zersetzung des Rhein-8-glykosides her. Die teilweise heftigen Abbaureaktionen bei 40°C / 75% rF, bei denen eine Kinetik 1. Ordnung zu vermuten ist, könnten auf einen enzymatischen Abbau zurückzuführen sein, da anscheinend spezifische Abbauprozesse ablaufen. Ein enzymatischer Abbau des Rhein-8-glykosides wurde von MEILHAMMER (2003) bereits nachgewiesen (siehe 3.3.5.1). Für eine oxidative Spaltung der Sennoside, wie dies nach die Voruntersuchungen vermutet werden konnte, wurden keine Anhaltspunkte gefunden. In Abb. 76 sind die möglichen Abbaupfade zusammengefasst.

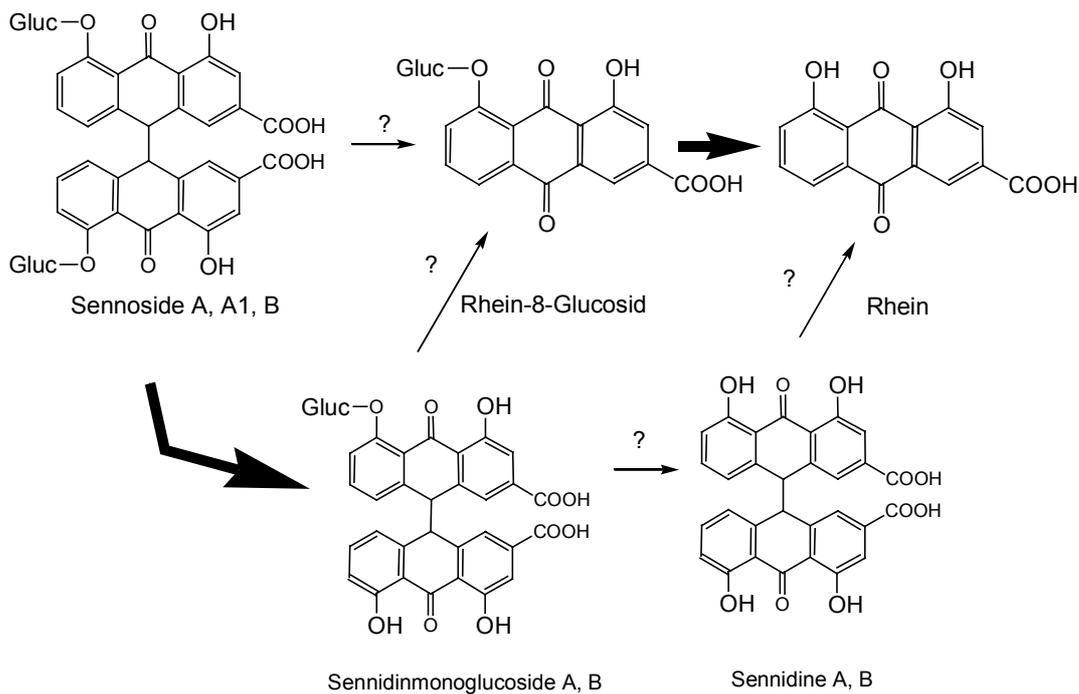


Abb. 76: Mögliche Abbauwege der Anthranoide in Sennesblättern (Die mit Fragezeichen gekennzeichneten Wege sind au Grund der erhaltenen Ergebnisse eher unwahrscheinlich)

Neben den Veränderungen im Anthranoidspektrum konnten auch für die Flavonoide Transformationen im Fingerprint-Chromatogramm beobachtet werden. Die Gruppe der Flavonglykoside zeigte in Abhängigkeit von der Lagerung unterschiedlich starke Abbauraten (Abb. 77). Die Hydrolyse dieser Glykoside scheint aber nicht so leicht von statten zu gehen wie die der Sennoside, denn die relativen Abnahmen waren geringer. Bei 25°C / 60% rF nahm der Gehalt im Mittel über die Zeit nicht signifikant ab. Bei 30°C / 60% rF und 40°C / 75% rF hingegen zeigten sich Gehaltsverluste, die aber selbst bei 40°C / 75% rF mit einem Verlust um 70% wesentlich geringer waren als der Verlust an Sennosiden bei gleicher Einlagerung. Gleichzeitig mit der Abnahme der Flavonoide bei 30°C / 60% rF und 40°C / 75% rF stieg auch der Gehalt an Flavonoidaglyka deutlich an (Abb. 78). Bei 25°C / 75% rF hingegen war kein deutlicher Anstieg zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse brachten die Untersuchungen von HEIGL (2003), in denen die Stabilität von Flavonoiden in getrocknetem Pflanzenmaterial untersucht wurde. Auch hier findet sich keine Veränderung im Flavonoidspektrum bei Lagerung von flavonoidhaltigen Pflanzen bei 25°C / 75% rF. Bei 40°C / 75% rF ist hingegen ein Verlust von über 50% nachweisbar.

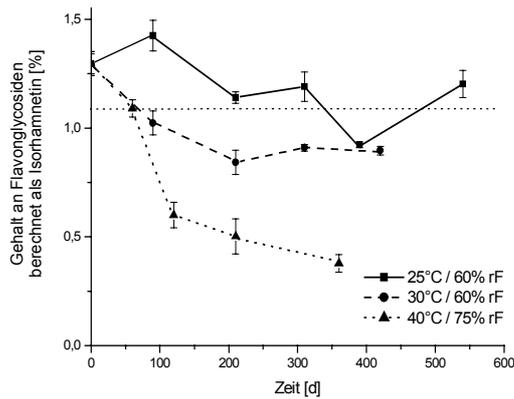


Abb. 77: Abnahme des Flavonglycosid-Gehaltes in pulverisierten Sennesblättern in Abhängigkeit von den Einlagerungsbedingungen

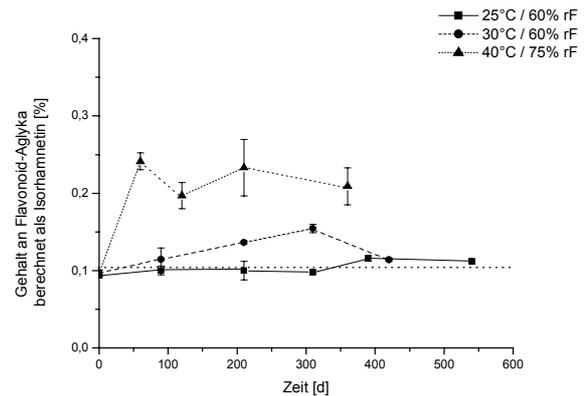


Abb. 78: Zunahme des Gehaltes an Isorhamnetin und Kämpferol als Flavonoidaglyka in pulverisierten Sennesblättern

Die gepunktete Linie in beiden Abbildungen gibt die Grenze zur Unterschreitung von 90%, bzw. Überschreitung von 110% des Ausgangswertes an.

Eine deutliche Zunahme von Flavonoidaglyka war bei den Voruntersuchungen nicht aufgefallen. Die Flavonoidglykoside nahmen in allen Peaks deutlich ab. Die Aglyka blieben von der Fläche her zunächst gleich und nahmen dann ab. Dies entspricht nicht den Untersuchungen mit Flavonoiden bei 70°C [HEIGL (2003)], wonach bei 70°C die Aglyka auch stark ansteigen. Dass die Peaks der Aglyka nahezu unverändert blieben kann aber dennoch ein Hinweis darauf sein, dass es sich um Abbauprodukte handelt. Die Degradation und die Zunahme halten sich solange die Waage, bis keine neuen Abbauprodukte mehr nachgebildet werden. Der Gehalt nimmt daher erst verzögert ab.

3.3.5.4. DC-Untersuchungen

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden analog der Sennesblätter-Monographie der PH.EUR. (2002f) durchgeführt (5.5.5.4). Die dabei beobachtbaren Veränderungen entsprachen den Ergebnissen der HPLC-Untersuchungen. Während unter der Lagerung von 25°C / 60% rF keine Veränderungen im Spektrum nachweisbar waren (Abb. 79) wurden bei Lagerbedingungen von 40°C / 75% rF Abbaureaktionen deutlich (Abb. 80). Entsprechend dem HPLC-Fingerprint ging der Gehalt der Sennoside zurück. Lediglich Sennosid B war noch in geringen Mengen zu detektieren.

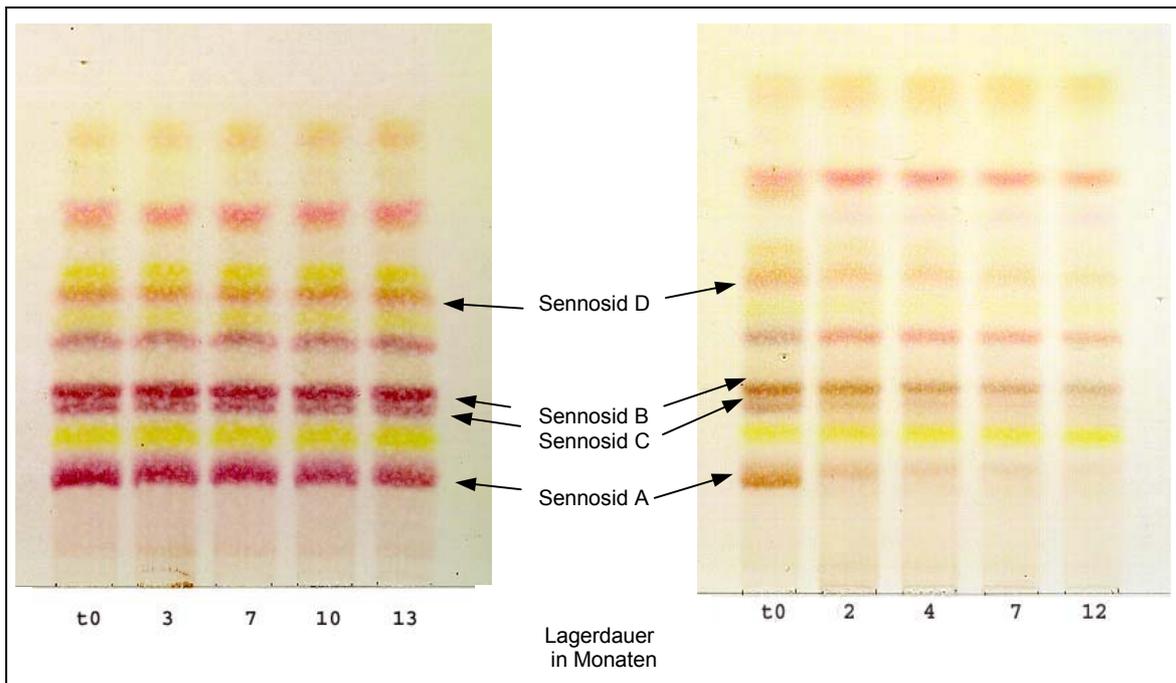


Abb. 79: DC von Sennesblättern gelagert bei 25°C / 60% rF

Abb. 80: DC von Sennesblättern gelagert bei 40°C / 75% rF

Die Zunahme der Anthrachinonaglyka ist bereits bei Betrachtung im Tageslicht nach der Trennung zu sehen. Alle hier schwach sichtbaren Flecken sind gelb gefärbt. Während sich bei 25°C / 60% rF keine deutlichen Unterschiede zeigen (Abb. 81) ist bei 40°C / 75% rF die Zunahme der Anthrachinone deutlich zu sehen (Abb. 82). Dabei zeigt sich schon bis zur ersten Probenentnahme eine deutliche Zunahme der Intensität, die dann langsam wieder abnimmt. Dieser Verlauf entspricht den mittels HPLC bereits ermittelten Werten. Daneben ist der Fleck des Aloe-Emodins ist nur unter diesen Bedingungen überhaupt nachweisbar.

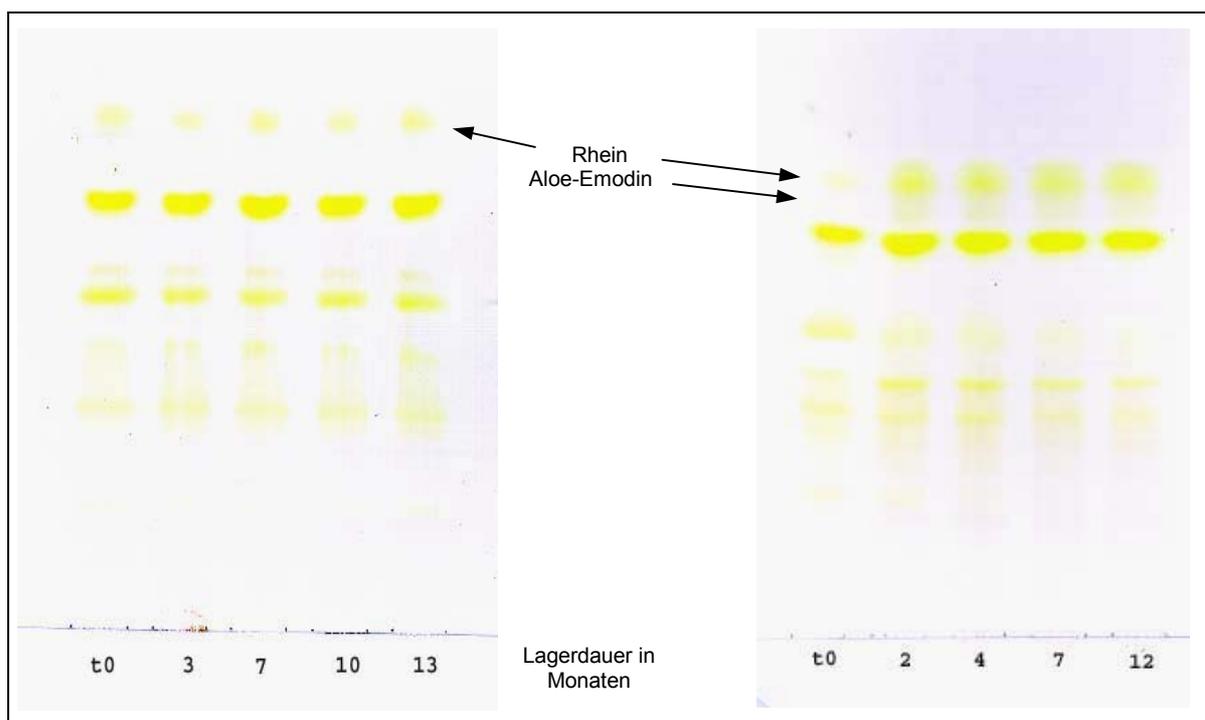


Abb. 81: DC von Sennesblättern bei 25°C / 60% rF unter Tageslichtbetrachtung

Abb. 82: DC von Sennesblättern bei 40°C / 75% rF unter Tageslichtbetrachtung

3.3.5.5. Aussagen zur Stabilität der Einsatzdroge

Während des Einlagerungszeitraums von 18 Monaten nahmen selbst bei 25°C / 60% rF die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe um 25% ab. Der vorgeschriebene Gehalt an 1,8-Hydroxyanthracenderivaten von mindesten 2,5% wird nur unter den Bedingung von 25°C / 60% rF über den Einlagerungszeitraum mit 2,56% knapp eingehalten. Wie bereits aus anderen Untersuchungen bekannt war, sind die Inhaltsstoffe als sehr empfindlich gegen erhöhte Luftfeuchte einzustufen. Auf sachgerechte Lagerung ist demgemäss besondere Rücksicht zu nehmen.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Einlagerungsbedingungen ausschlaggebend für die Art der Zersetzung der Sennoside sind. Bei hohen Temperaturen und geringer Luftfeuchte scheinen oxidative Prozesse zu überwiegen. Bei hoher Feuchte allerdings überwiegen hydrolytische Abbauprozesse, die möglicherweise enzymatischen Ursprungs sind. Die dabei zunehmenden Anthrachinonaglyka stellen geeignete Markersubstanzen für Stabilitätsangaben dar, da sie bereits nach wenigen Tagen sie um mehr als 10% zunehmen.

Obwohl die Flavonoidaglyka Isorhamnetin und Kämpferol als Abbauprodukte identifiziert wurden, stellt sich die Gruppe der Flavonoide als wesentlich stabiler dar und ist daher als Marker bei der Stabilitätskontrolle eher ungeeignet. Ein Anstieg der Flavonoidaglyka ist allerdings ein Hinweis dafür, dass erhöhte Stressbedingungen vorgelegen haben müssen, da

die Flavonglykoside bei 25°C / 60% rF noch stabil sind, und erst ab Einlagerungsbedingungen von 30°C / 60% rF oder höher Abbaureaktionen zeigen.

3.3.6. Stabilitätsuntersuchungen an Sennesblätter-Trockenextrakten

3.3.6.1. HPLC Untersuchungen

Die Untersuchung der Inhaltsstoffe der Sennesblätterextrakte des Handels ergab deutliche verpackungs- und lagerungsabhängige Veränderungen der Sennoside (Abb. 83), die in alukaschierten Beuteln und PE-Weithalsflaschen bei allen Klimazonen um 10-20% linear abnahmen. Deutlichere Verluste waren bei den Extrakten in PE-Beuteln zu verzeichnen, die bereits bei 25°C / 75% rF auf 65% des Ausgangsgehaltes absanken. Der unverpackte Extrakt fiel nach dem vierten Probenentnahmepunkt bei dieser Lagerbedingung auf 58% des Ausgangswertes. Bei 30°C / 60% rF waren die Unterschiede zu den beiden anderen Verpackungen mit Abnahmen auf 31% der Extrakte in PE-Beuteln und auf 20% bei unverpackten Extrakten wesentlich ausgeprägter. Bei 40°C / 75% rF enthielten nach 12 monatiger Lagerung die unverpackten und die in PE-Beuteln verpackten Extrakte nahezu keine Sennoside mehr. Für die unverpackten Extrakte kann aus dem exponentiell abfallenden Kurvenverlauf auf einen Abbau geschlossen werden, der einer höheren Kinetik folgt, als sie bei den milderen klimatischen Bedingungen nachweisbar war. Der Gehalt an Sennosiden fiel dabei bereits nach sechs Monaten unter 10% des Ausgangswertes. Ähnlich wie bei der Einsatzdroge zeigt sich bei den in alukaschierten Beuteln und in PE-Weithalsflaschen verpackten Extrakten zum ersten Probenentnahmezeitpunkt ein Anstieg der Sennoside. Möglicherweise vollzog sich eine geringfügige Neubildung aus Anthronen, wie ALERT (1985) postulierte.

Die Sennidinmonoglykoside traten bei keinem Extrakt im HPLC-Fingerprint in Erscheinung. Der bei der Einsatzdroge beobachtete Anstieg dieser Inhaltsstoffe konnte demnach bei den Extrakten nicht beobachtet werden. Falls der für die Einsatzdroge beschriebene Abbauweg von den Sennosiden zu den Sennidinmonoglykosiden bei den Extrakten auch durchlaufen wird, so muss die Zunahme der Sennidinmonoglykoside unter der Nachweisgrenze liegen. Da dies durch enzymatische Prozesse erfolgt, und das Vorhandensein von Enzymen im Extrakt auf Grund des Herstellungsverfahrens eher unwahrscheinlich ist, könnte die Degradation aber auch einem anderen Weg folgen. Bei den untersuchten Extrakten allerdings waren keinerlei Abbauprodukte nachweisbar.

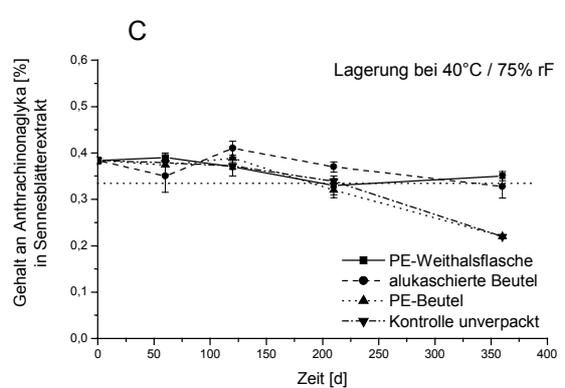
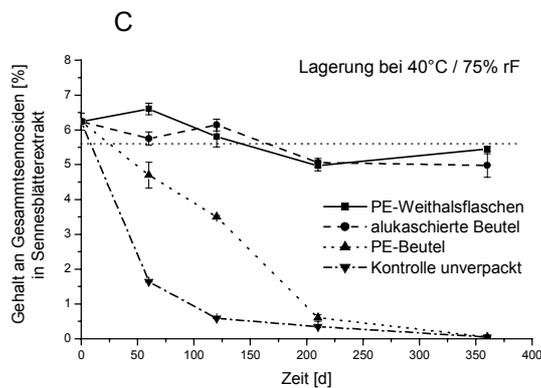
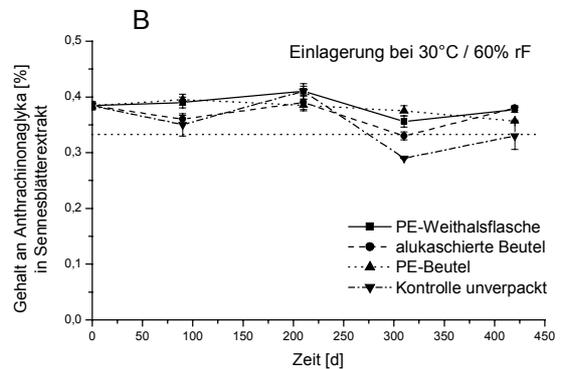
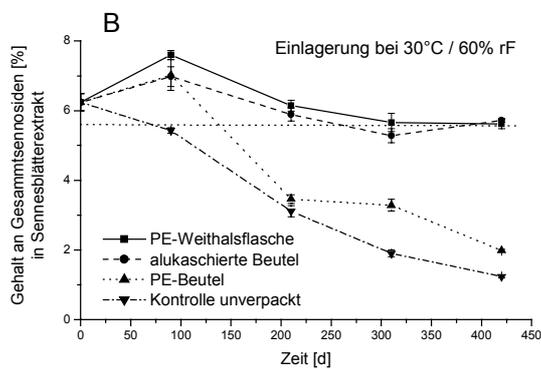
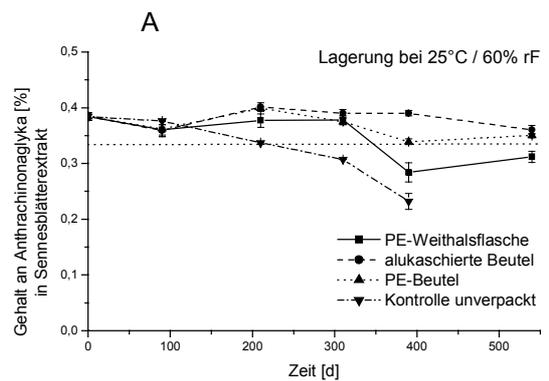
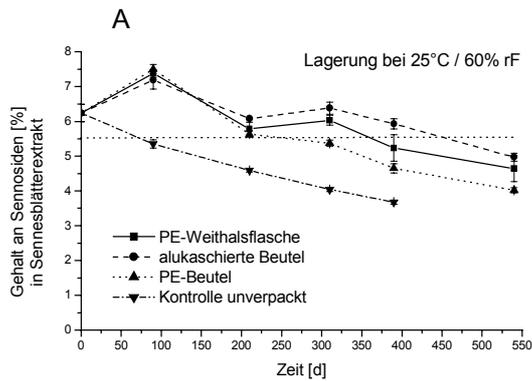


Abb. 83: Sennesblätterextrakte: Sennosidgehalt berechnet als Sennosid B in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung

Abb. 84: Sennesblätterextrakte: Gehalt an Anthrachinonaglyka berechnet als Rhein in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung

A: 25°C / 60% rF B: 30°C / 60% rF C: 40°C / 75% rF (Die gepunktete Linie gibt die Grenze zur Unterschreitung von 90% des Ausgangswertes an)

Auch die bei der Einsatzdroge im Gehalt zunehmenden Anthrachinone zeigen keine deutlichen Zunahmen (Abb. 84), wobei allerdings auch die Abnahme sehr gering ist. Für die Extrakte in alukaschierten Beuteln und PE-Weithalsflaschen bleibt der Gehalt bei allen Lagerbedingungen nahezu konstant. Lediglich die unverpackten und in PE-Beuteln verpackten Extrakte zeigen geringfügige Gehaltsabnahmen bei allen Lagerbedingungen. Die bei der Einsatzdroge beobachtete deutliche Zunahme kann bei den Extrakten nicht nachgewiesen

werden. Es zeigte sich aber, daß auch die dafür postulierte Ausgangssubstanz, das Rhein-8-glykosid in seinem Gehalt kaum abnahm (in Abb. 85 gezeigt für 40°C / 75% rF). Die drastischen Abnahmen, wie sie bei der Einsatzdroge nachweisbar waren konnten hier nicht beobachtet werden. Die Kurven des Rhein-8-glykosids und der Anthrachinonaglyka zeigen einen ähnlichen Verlauf, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass eine Umwandlung des Rhein-8-glykosids in Rhein stattgefunden hat.

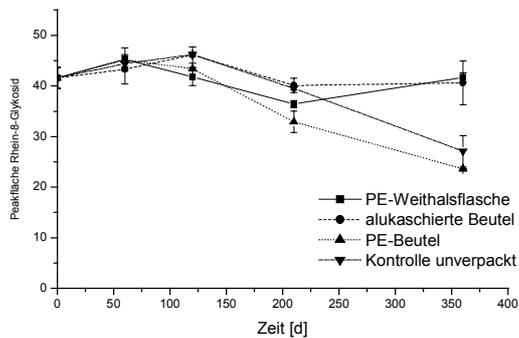


Abb. 85: Veränderungen der Peakfläche von Rhein-8-glykosid in Sennesblätterextrakt gelagert bei 40°C / 75% rF

Auch aus der Beobachtung der Flavonoidfraktion resultieren nicht die gleichen Veränderungen wie bei der Einsatzdroge. Für 25°C und 30°C / 60% rF zeigen sowohl Flavonglykoside (Abb. 86) als auch deren Aglyka (Abb. 87) bei allen Verpackungen einen geringfügigen Abbau von ca. 10%. Die in alukaschierten Beuteln und PE-Beuteln verpackten Extrakte zeigen diese nur leichten Veränderungen auch bei 40°C / 75% rF. Anders verhalten sich die unverpackten und die in PE-Beuteln verpackten Extrakte. Deren Gehalt an Flavonglykosiden sinkt unter diesen Bedingungen auf ca. 40% und an Aglyka auf etwa 30% des Ausgangsgehaltes. Die gerade bei diesen Einlagerungsbedingungen deutliche Zunahme der Aglyka bei der Einsatzdroge konnte für die Extrakte nicht beobachtet werden.

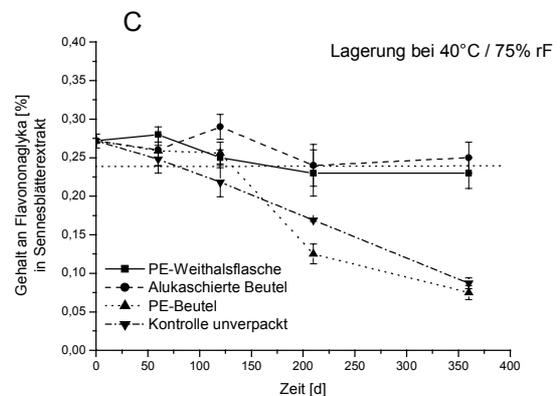
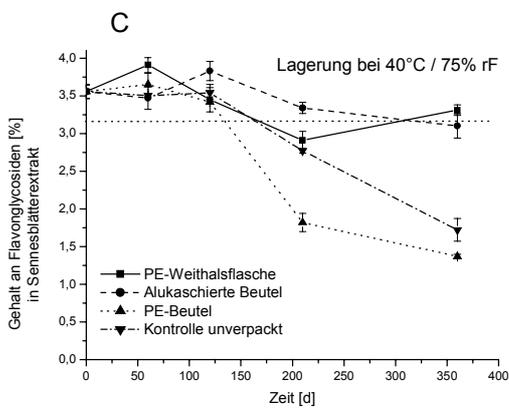
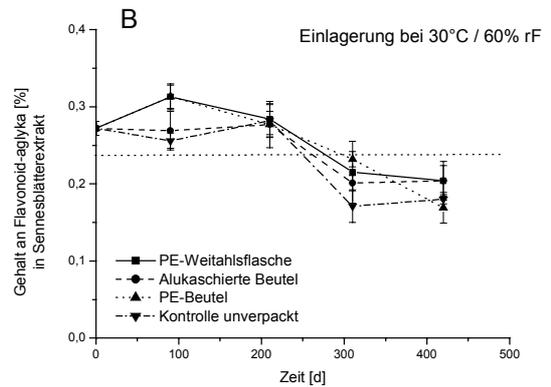
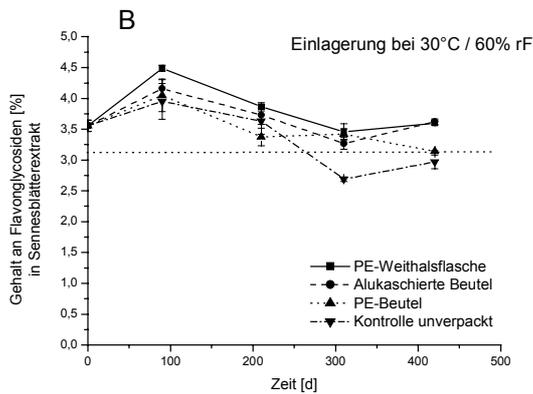
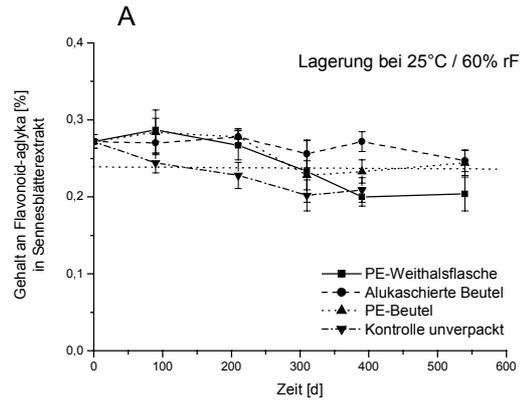
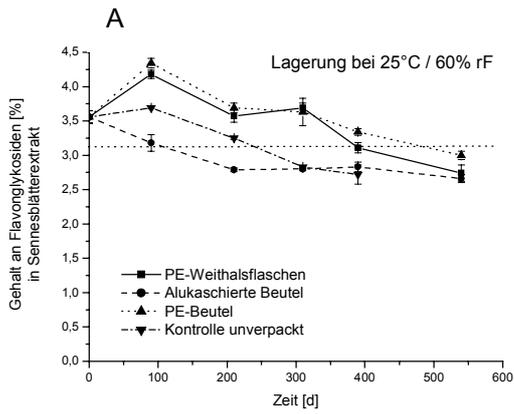


Abb. 86: Gehalt an Flavonglycosiden berechnet als Isorhamnetin in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung in Sennesblätterextrakt

Abb. 87: Gehalt an Flavonaglyka berechnet als Isorhamnetin in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung in Sennesblätterextrakt

A: 25°C / 60% rF B: 30°C / 60% rF 3: 40°C / 75% rF (Die gepunktete Linie gibt die Grenze zur Unterschreitung von 90% des Ausgangswertes an)

Zu ähnlichen Aussagen zur Stabilität kommt man nach der Betrachtung der nativen Extrakte. Die Sennoside zeigen einen den Lagerbedingungen entsprechenden Abbau (Abb. 88). Dabei nimmt der Gehalt bei 30°C / 60% rF um 53% , bei 40°C / 75% rF um 85% ab. Daraus lässt sich eine höhere Empfindlichkeit des nativen Extraktes gegen äußere Einflüsse ableiten, als bei den oben aufgeführten handelsüblichen Extrakten. Bei gleicher Verpackung zeigt dieser nur in etwa 10% Abbau der Sennoside unabhängig von den untersuchten klimati-

schen Bedingungen. Zunahmen der Sennidinmonoglykoside waren auch bei nativen Extrakten nicht nachweisbar.

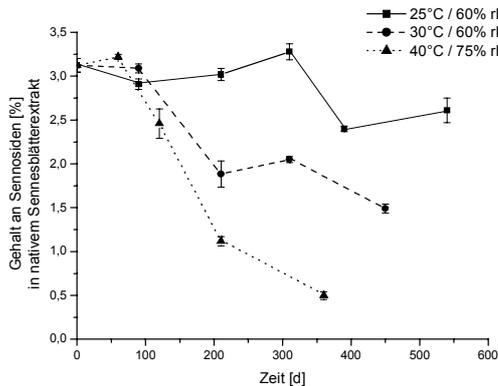


Abb. 88: Gehalt an Sennosiden berechnet als Sennosid B in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung in nativem Sennesblätterextrakt

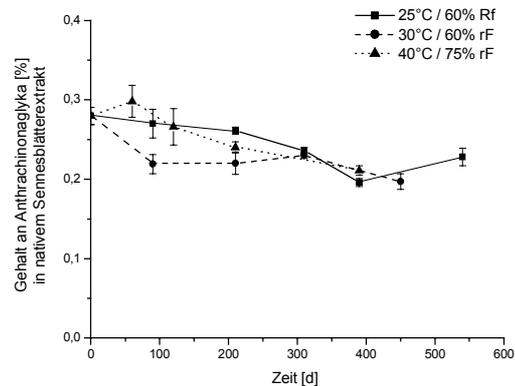


Abb. 89: Gehalt an Anthrachinonaglyka berechnet als Rhein in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung in nativem Sennesblätterextrakt

Die Anthrachinonaglyka wiesen unter allen Bedingungen einen Verlust von ca. 25% auf; Zunahmen konnten auch hier nicht beobachtet werden (Abb. 89).

Auch die Flavonglykoside (Abb. 90) und Flavonoidaglyka (Abb. 91) nahmen während der Lagerung ab. Dabei waren stärkere Abnahmen bei höherer Temperatur und Feuchte zu bemerken. Allerdings war die Abnahme bei 40°C / 75% rF der Glykoside mit 30% und der Aglyka mit 50% wiederum nicht so ausgeprägt wie bei den Sennosiden. Auch hier zeigte sich erneut die im Verhältnis höhere Stabilität von Flavonoiden gegenüber äußeren Einflüssen. Eine Zunahme der Aglyka wie bei der Einsatzdroge konnte auch für die nativen Extrakte nicht beobachtet werden.

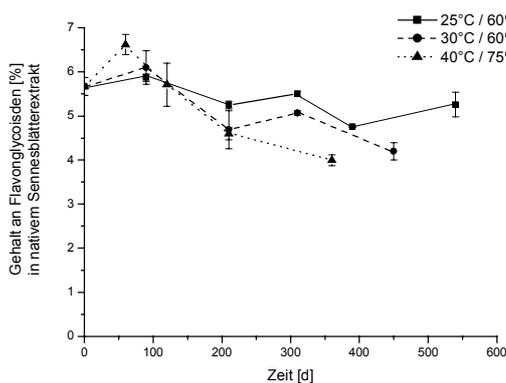


Abb. 90: Gehalt an Flavonglykosiden berechnet als Isorhamnetin in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung in nativem Sennesblätterextrakt

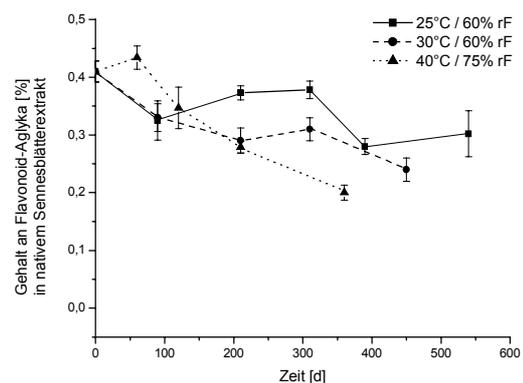


Abb. 91: Gehalt an Flavonoid-Aglyka berechnet als Isorhamnetin in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung in nativem Sennesblätterextrakt

3.3.6.2. DC-Untersuchungen der Sennesblätterextrakte

Hinsichtlich des Verlaufs des Sennosidgehaltes bestätigen die DC-Untersuchungen die gefundenen HPLC-Ergebnisse. Die in PE-Weithalsflaschen verpackten Extrakte zeigen sowohl bei 25°C / 69% rF (Abb. 92) als auch bei 40°C / 75% rF (Abb. 94) keine deutlich erkennbaren Abnahmen der Sennoside.

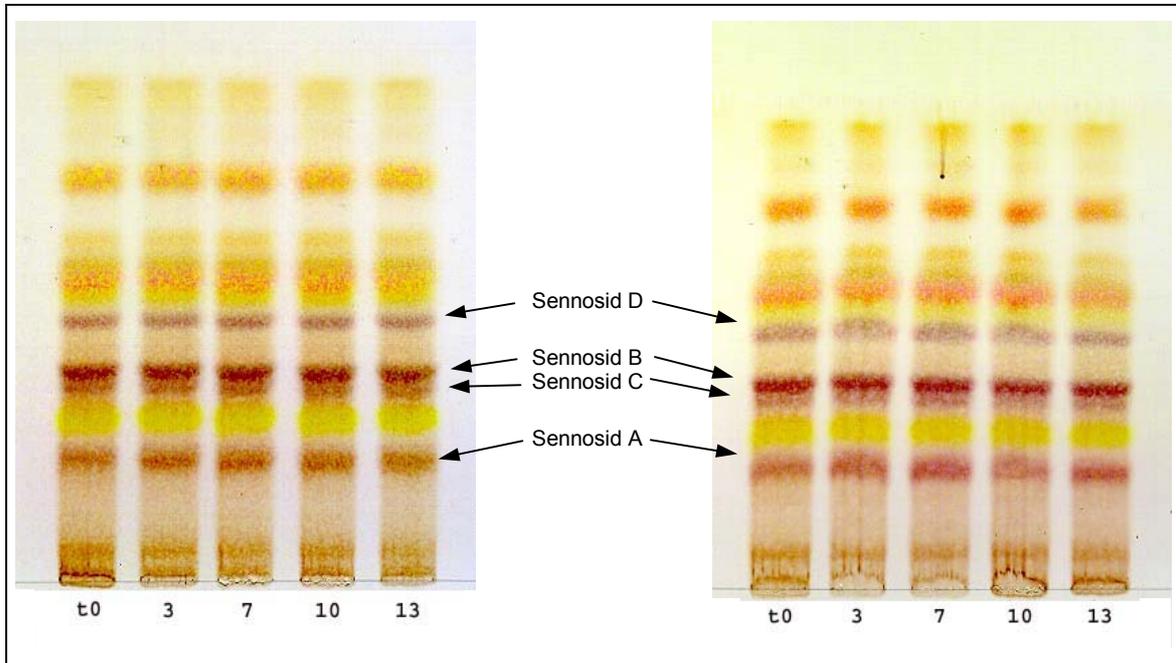
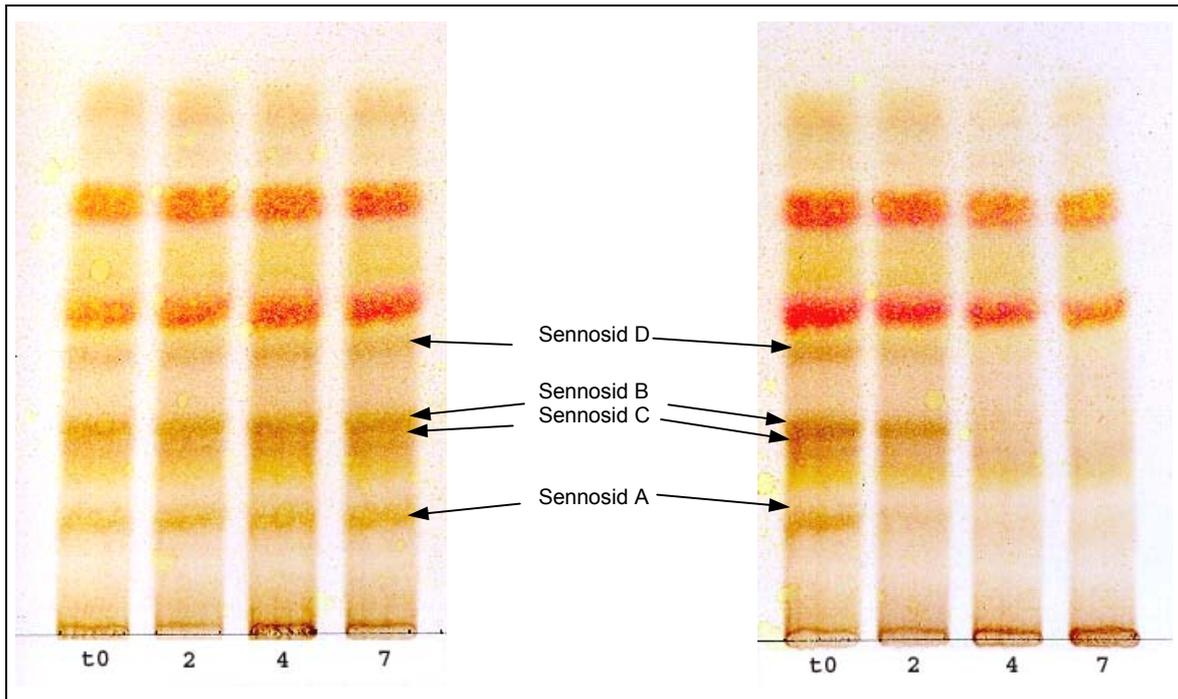


Abb. 92: DC von Sennesblätterextrakt, gelagert in einer PE-Weithalsflasche bei 25°C / 60% rF

Abb. 93: DC von Sennesblätterextrakt, unverpackt gelagert bei 25°C / 60% rF

Im Vergleich dazu wurden die unverpackten Extrakte untersucht. Obwohl die HPLC-Untersuchungen nach einer Lagerzeit von 13 Monaten bei 25°C / 60% rF bereits einen Verlust von 42% des Gehaltes feststellen ließen, kann diese Entwicklung aus dem DC nicht abgelesen werden (Abb. 93).



Die Werte unter Linie bezeichnen die Lagerdauer in Monaten

Abb. 94: DC von Sennesblätterextrakt, gelagert in einer PE-Weithalsflasche bei 40°C / 75% rF

Abb. 95: DC von Sennesblätterextrakt, unverpackt gelagert bei 40°C / 75% rF

Bei Lagerung unter 40°C / 75% rF war nach den HPLC-Untersuchungen nach 6 Monaten weniger als 10% des Ausgangsgehaltes an Sennosiden zu verzeichnen. Im DC ist für diesen Zeitpunkt keines der Sennoside mehr detektierbar (Abb. 95). Die deutliche Abnahme dieser Verbindungen ist bereits nach 2 Monaten im DC sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt wurde durch HPLC bereits ein Rückgang um 75% des Gehaltes nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zur Detektion der mittels HPLC ermittelten Veränderungen der Sennesblätterextrakte die Dünnschichtchromatographie sich als nicht ausreichend sensitiv erwiesen hat.

3.3.6.3. Aussagen zur Stabilität von Sennesblätterextrakten

Anhand der prozentualen Änderung im Gehalt ausgewählter Inhaltsstoffe sollen die Unterschiede im Stabilitätsverhalten zwischen Einsatzdroge und handelsüblichem Extrakt bei gleicher Verpackung dargelegt werden (Abb. 96):

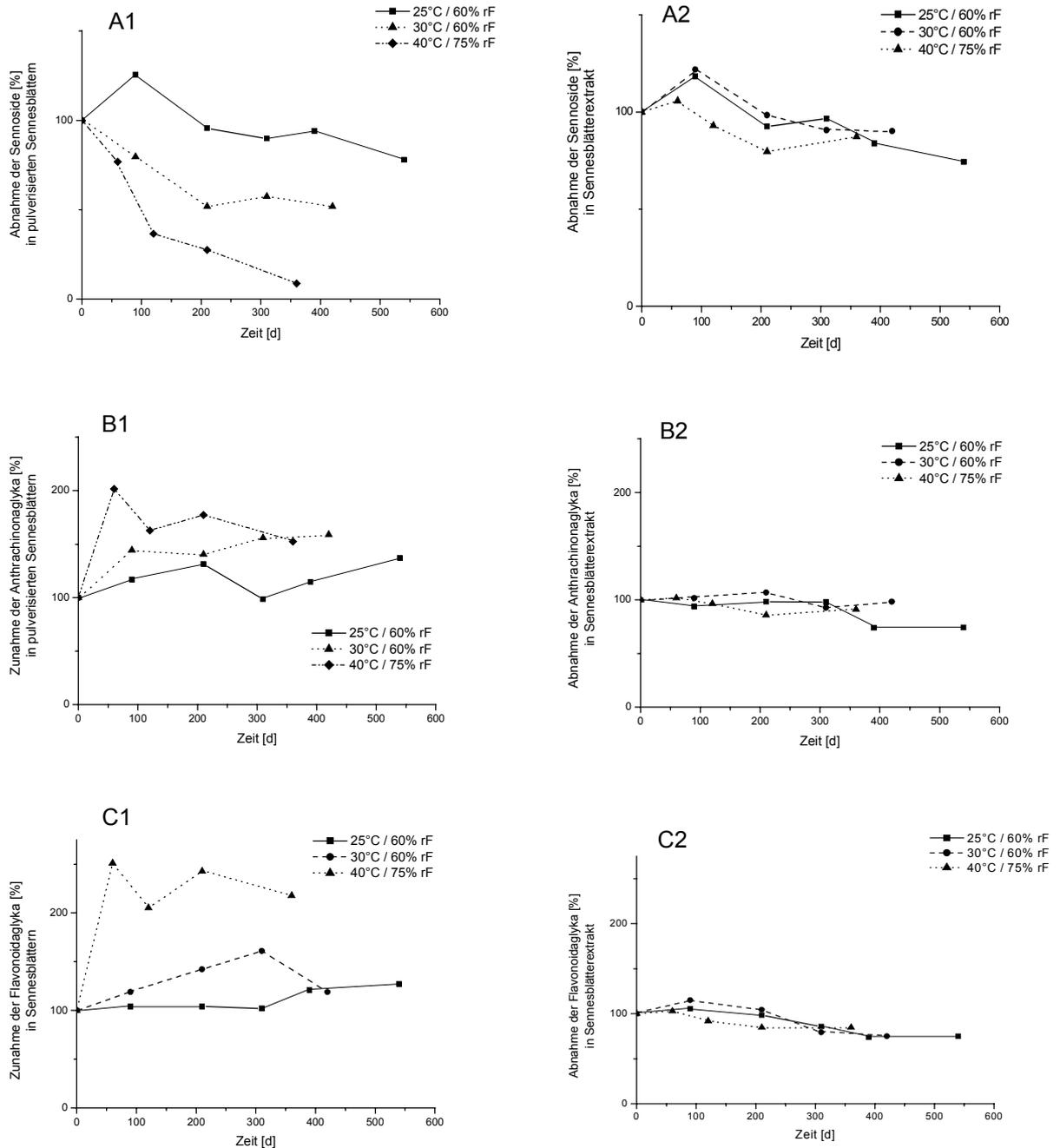


Abb. 96: Vergleich zwischen Sennesblättern (1) und Sennesblätterextrakt (2) hinsichtlich der Veränderungen wichtiger Inhaltsstoffe in Prozent bei gleicher Verpackung (PE-Weithalsflasche)

A: Sennoside B: Anthrachinone C: Flavonoidglyka

Der Vergleich des Verlaufs des Gehaltes an Sennosiden zeigt deutlich die höhere Empfindlichkeit dieser Substanzen in der Einsatzdroge. Während die prozentuale Änderung im Ex-

trakt nahezu unabhängig von der Einlagerung fällt, sinkt der Gehalt mit steigenden klimatischen Belastungen in der Einsatzdroge stärker. Das als mögliches Abbauprodukt des Rhein-8-glykosids gefundene Rhein steigt ebenfalls in Korrelation zur Lagerbedingung unterschiedlich stark an. Der Extrakt zeigt keinerlei Anstieg dieser Substanz. Der Abbau vom Rhein-8-glykosid zum Rhein scheint hier nicht abzulaufen. Ein ähnliches Bild liefert die Beobachtung der Flavonoid-aglyka, die in der Einsatzdroge wieder umso stärker ansteigen je belastender die äußeren Einflüsse sind. Der Extrakt hingegen zeigt lediglich einen geringfügigen Abfall, wobei keine Unterschiede in Abhängigkeit der Lagerung deutlich werden. Daraus kann wiederum geschlossen werden, dass hier nicht die selben Abbauvorgänge ablaufen wie in der Einsatzdroge. Eine plausible Erklärung für diese Unterschiede könnte der enzymatische Abbau der Sennoside und Flavonoid-glykoside darstellen. Auf Grund des Herstellungsprozesses dürften im Extrakt keine funktionsfähigen Enzyme mehr vorhanden sein, da durch die dabei auftretende Einwirkung von Wärme und Alkohol auf die Droge diese Inhaltsstoffe denaturiert sein sollten.

Die lineare Regression der Graphen und die daraus errechneten Haltbarkeitszeiten bis zum Erreichen von 90% des Ausgangswertes sind in Tabelle 7 dargestellt. Sie sollen als Anhaltspunkt für die Stabilität gelten und Aussagen über die Brauchbarkeit des Packmittels erlauben. Es zeigt sich, dass Extrakte, die in PE-Beuteln verpackt sind, eine kaum bessere Haltbarkeit aufweisen, als unverpackte Extrakte. Demgegenüber bleiben Extrakte in alukaschierten Beuteln und PE-Weithalsflaschen im Schnitt 12 Monate über dieser Grenze für 25°C / 60% rF und 30°C / 60% rF. Bei 40°C / 75% rF zeigen auch diese Verpackungen innerhalb eines halben Jahres einen Verlust von über 10% am Gehalt.

Verpackung	Einlagerung		
	25°C / 60% rF	30°C / 60% rF	40°C / 75% rF
	Stabilitätsgrenzwerte [d]		
PE-Weithalsflasche	278	387	172
Alukaschierte Beutel	375	334	126
PE-Beutel	186	44	24
Kontrolle unverpackt	70	47	8

Tabelle 7: Grenzwerte [d] bis zur Unterschreitung von 90% des Ausgangswertes an Sennosiden in Sennesblätterextrakt

Ein Aspekt der in die Auswertung mit einbezogen werden muss, ist die Bestimmung des Rhein-8-glykosids. Bei der Borntraeger-Methode zur quantitativen Bestimmung der Hydroxyanthracenderivate nach PH. EUR. (2002f) wird das Rhein-8-glykosid als wirksamkeitsbe-

stimmender Inhaltsstoff mitbestimmt. Durch die HPLC-Methode kann selektiv der Gehalt an Sennosiden berechnet werden [MEILHAMMER 2003]. Wie bereits gezeigt, nimmt das Rhein-8-glykosid bei Lagerung der Einsatzdroge in gleicher Weise wie die Sennoside ab. Dadurch unterscheidet sich die graphische Auswertung des prozentualen Verlustes der Sennoside allein (Abb. 97) kaum von den relativen Kurvenverläufen, bei denen Rhein-8-glykosid mit hinzu addiert wird (Abb. 98). Beim Extrakt hingegen sind andere Degradationsprozesse vorherrschend. Wie bereits gezeigt, nimmt das Rhein-8-glykosid im Extrakt unter der Lagerung nur geringfügig ab, die Sennoside hingegen teils in vergleichbarer Weise wie in der Einsatzdroge. Daher liefert der Vergleich der prozentualen Abnahme der Sennoside allein (Abb. 99) mit der Abnahme der Summe aus Sennosiden und Rhein-8-glykosid (Abb. 100) für den Extrakt unterschiedliche Ergebnisse.

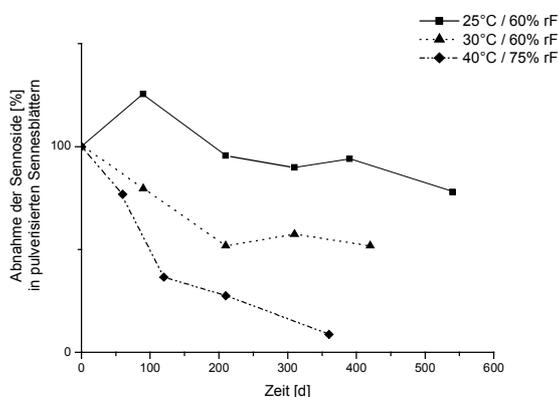


Abb. 97: Einsatzdroge: Prozentuale Abnahme des Gehaltes an Sennosiden

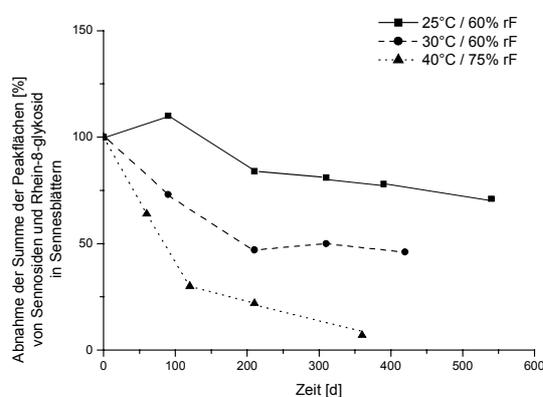


Abb. 98: Einsatzdroge: Prozentuale Abnahme der Peakflächen von Sennosiden und Rhein-8-glykosid

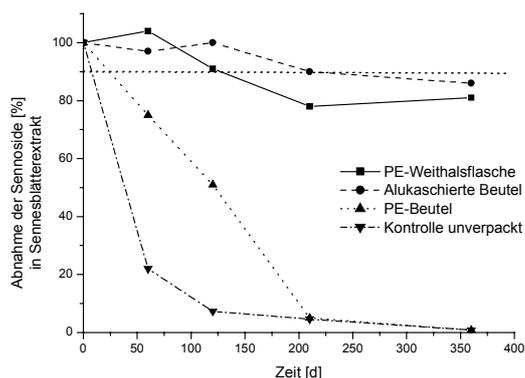


Abb. 99: Extrakt: Prozentuale Abnahme des Gehaltes an Sennosiden bei 40°C / 75% rF

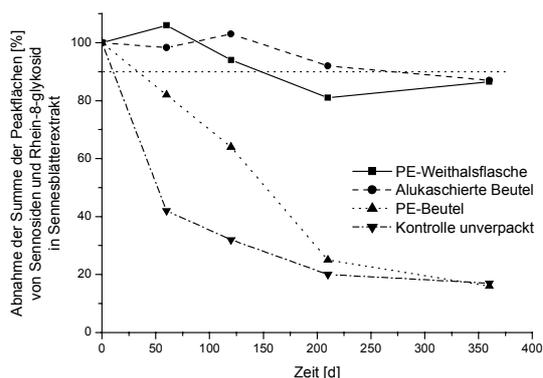


Abb. 100: Extrakt: Prozentuale Abnahme der Peakflächen von Sennosiden und Rhein-8-glykosid

Die Abbildungen zeigen die Verhältnisse des Extraktes in den vier Verpackungen bei 40°C / 75% rF. Für die Extrakte in PE-Weithalsflaschen und in alukaschierten Beuteln ist der Unterschied zu vernachlässigen, da der Kurvenverlauf bei diesen Verpackungen nur geringfügig flacher ist. Deutlich flacher verlaufen allerdings die Kurven des unverpackten und des in PE-Beuteln verpackten Extraktes. Für die maximale Abnahme nach 12-monatiger

in PE-Beuteln verpackten Extraktes. Für die maximale Abnahme nach 12-monatiger Lagerung ist ein Unterschied von ca. 20% zu verbuchen. Wird Rhein-8-glykosid in die Berechnungen mit einbezogen, kann man von günstigeren Werten für die Haltbarkeit ausgehen, als für die alleinige Betrachtung der Sennoside. Dies wird besonders bei Proben deutlich, die eine starke Degradation zeigen. Um beurteilen zu können, ob der Extrakt arzneibuchkonform ist, muss der Gehalt an 1,8-Hydroxyanthracenderivaten bestimmt werden. Dazu wird der Gehalt der Summe von Rhein-8-glykosid und Sennosiden betrachtet. Dabei zeigt sich, dass bei 25°C / 60% rF alle Extrakte über dem geforderten Gehalt von 5,5% liegen. Dies ist trotz der teilweise starken Verluste an Sennosiden auf die hohe Stabilität des Rhein-8-glykosid zurückzuführen. Die in alukaschierten Beuteln und PE-Weithalsflaschen gelagerten Extrakte zeigen auch bei den beiden anderen Bedingungen Gehalte von über 5,5%. Unverpackte und in PE-Beuteln gelagerte Extrakte hingegen fallen bereits bei 30°C/ 60% unter 5% an Gehalt und entsprechen somit nicht mehr den Qualitätsanforderungen der Ph. Eur. .

3.3.7. Zusammenfassung und Diskussion

Abhängig von Lagerbedingung und Verpackungergibt die Lagerung von Sennesblättern und Sennesblätter-Extrakten deutliche Veränderungen in der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe.

Die Sennoside erwiesen sich als die empfindlichsten Komponenten des Inhaltsstoffspektrums. In Abhängigkeit von den Lagerbedingungen verlief ihre Degradation über unterschiedliche Abbauewege. Bei 70°C trockener Hitze überwiegt im Extrakt anscheinend die oxidative Spaltung. Bei Lagerung der Einsatzdroge bei 40°C / 75% rF scheinen enzymatische Prozesse abzulaufen. Die unter ICH-Bedingungen gelagerten Extrakte weisen keine der beiden Varianten auf, sondern zeigen ohne das Auftreten von Abbauprodukten lediglich eine langsame, lineare Degradation aller Inhaltsstoffe. Bei unverpackten Extrakten und in PE-Beuteln laufen diese Prozesse allerdings nach höheren Kinetiken ab. Je nachdem welche Degradationsprozesse ablaufen, können als Abbauprodukte Sennidinmonoglykoside oder die Anthrachinonaglyka detektiert werden. Das Rhein-8-glykosid zeigte keinen so rapiden Abbau, wie für die Einsatzdroge nachgewiesen wurde. Unter Einbezug dieser Verbindung in die Summe der 1,8-Hydroxyanthracenderivate, wie es mit der Borntraeger-Methode der Fall ist, ergeben sich für die Extrakte keine repräsentativen Ergebnisse für die Haltbarkeit. Durch die höhere Stabilität dieser Substanz im Extrakt und deren mengenmäßig hohem Anteil, werden längere Haltbarkeitszeiten errechnet. Die alleinige Bestimmung der Sennoside mittels HPLC-Methode liefert in diesem Fall genauere Aussagen über die Veränderungen im Inhaltsstoffspektrum. Nur die in alukaschierten Beuteln und PE-Weithalsflaschen verpackten

handelsüblichen methanolischen Extrakte können den Qualitätsanforderungen der Ph. Eur. hinsichtlich des vorgeschriebenen Gehaltes an 1,8-Hydroxyanthracenderivaten entsprechen.

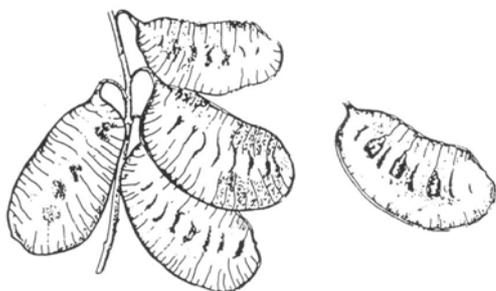
Flavonoide stellen eine weitere Inhaltsstoffgruppe in Sennesblättern dar, die als Leitsubstanzen für die Stabilitätsuntersuchung genutzt werden können. Sie zeigten sich als wesentlich stabiler als die Sennoside. In der Einsatzdroge ließ sich wiederum ein vermutlich enzymatischer Abbau der Glykoside durch Ermittlung des Anstiegs der Aglyka beobachten. Im Extrakt hingegen war keine Zunahme von Flavonoidaglyka zu beobachten, sondern nur geringfügige Abnahmen.

PE-Beutel zeigten sich wie bei den Baldrianextrakten als nicht ausreichende Verpackung. Alukaschierte Beutel und PE-Weithalsflaschen können die Stabilität der Extrakte deutlich verbessern, bieten aber auch bei 40°C / 75% rF keinen ausreichenden Schutz gegen größere Verluste an wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen.

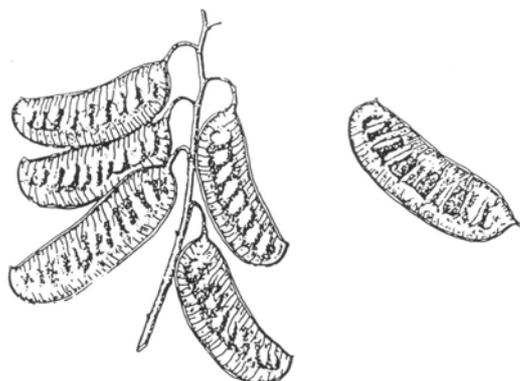
Bei gleicher Verpackung zeigten die nativen Extrakte wesentlich größere Instabilitäten. Die Degradation verlief dabei über die gleichen Wege wie in den untersuchten handelsüblichen Extrakten.

3.4. Stabilität von pulverisierten Sennesfrüchten und Sennesfrüchtetrockenextrakten

3.4.1. Beschreibung der Droge



Cassia Senna L.



Cassia angustifolia Vahl

Für die Gewinnung der Sennesfrüchte stehen mit *Cassia senna* und *Cassia angustifolia* die gleichen Stammpflanzen wie für Sennesblätter zur Verfügung [PH. EUR. (2002h)]. Auch hier ist die Tinnevelly-droge auf Grund des Gewinnungsprozesses als qualitativ hochwertiger anzusehen. Die Früchte sind die für Leguminosen typischen Hülsen. Es kann auch anhand der Früchte zwischen den beiden *Cassia*-Arten unterschieden werden: Die Frucht von *C.angustifolia* ist in etwa 4-7 cm lang, 2 cm breit, dünn und flach und enthält 5-7 dunkelbraune Samen. Bei *C. senna* ist diese wiederum 3,5 bis 6 cm lang, 2,5 cm breit, flach-elliptisch gebaut, leicht gebogen und enthält ebenso viele Samen wie *C.angustifolia* [FRANZ (1993)]. Der höchste Gehalt an Inhaltsstoffen wird erreicht, wenn die Frucht voll ausgebildet ist, die Samen aber noch nicht ausgereift sind [SCHNEIDER et al. (1992c)].

3.4.2. Inhaltsstoffe

Die in den Sennesfrüchten nachgewiesenen Inhaltsstoffe unterscheiden sich qualitativ nicht von den unter 3.3.2 aufgeführten Substanzen aus den Blättern. Allerdings sind große quantitative Unterschiede zu bemerken. Die Fraktion der Dianthronglykoside besteht zu 95% aus den Sennosiden A, A1 und B und nur zu 5% aus C und D. Daneben ist die Verteilung von Dianthronglykosiden zu Anthronglykosiden mit 85 bis 90% zu 10 bis 15% gegeben [SCHNEIDER et al. (2002h)]. Um arzneibuchkonform zu sein, muss die aus Alexandriner-Sennesfrüchten gewonnene Droge 3,4 % und die aus Tinnevelly-Sennesfrüchten gewonnene Droge 2,2% an Hydroxyanthracen-Glykosiden, berechnet als Sennosid B und bezogen auf die getrocknete Droge, enthalten.

Die Anthrachinonglykoside sind in den Früchten in geringerem Anteil und anderer Zusammensetzung enthalten als im Blatt. Dies bestätigen die Untersuchungen von GRIMMINGER

und WITTHOLM (1993), die für Rhein in Tinnevellyfrüchten einen Gehalt von 0,01-0,1%, für dessen Glykosid 0,03-0,4%, für Aloe-Emodin 0,003-0,02% und dessen Glykosid 0,01-0,05% feststellen ließen. Die Gehalte in Alexandriner-Sennesfrüchten sind noch geringer 0,05% Rhein, 0,04% Rhein-8-glykosid, 0,01% Aloe-Emodin und 0,03% von dessen Glykosid.

Von TERREAUX et al. (2002) wurden in den Samen zwei Benzophenonderivate gefunden, die ebenfalls als Glykoside vorliegen (Abb. 101).

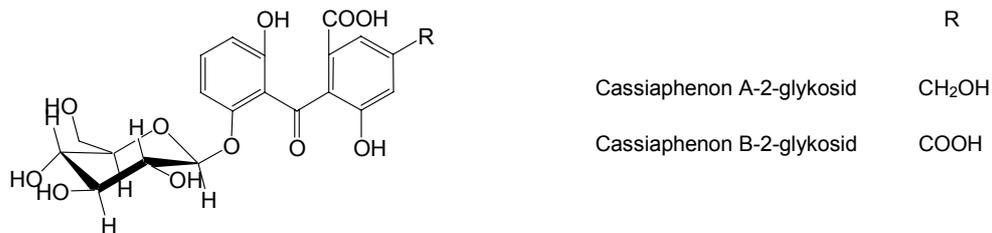


Abb. 101: Benzophenonderivate aus Sennsamensamen nach TERREAUX et al. (2002)

Das Tinnevellinglykosid findet sich in den Früchten von *Cassia angustifolia* mit einem Gehalt von 0,3%. 6-Hydroxymusizin ist mit gleichem Gehalt in Alexandriner-Sennesfrüchten enthalten [SCHNEIDER et al. (1992c)].

Besonders in den Samen finden sich darüber hinaus vermehrt Schleimstoffe [WICHTL (2002)].

3.4.3. Indikationen und Anwendung

Die Indikation und Anwendung entspricht der von Sennesblättern [ESCOP (1997); BANZ (1993)]. Obwohl der Anthraglykosidgehalt höher als in Sennesblättern ist, wirken die Sennesfrüchte etwas milder laxativ. Der Grund dafür soll laut WICHTL (2002) ein geringerer Anteil des stark reizenden Aloeemodins sein.

Der Übergang der Sennoside aus den Sennesfrüchten bei der Teebereitung geschieht wesentlich schneller als aus den Blättern, so dass eine fünfminütige Heißwasserextraktion ausreicht um die nötige, therapeutisch indizierte Konzentration zu erhalten [MIETHING et al. (1987)].

3.4.4. Charakterisierung des Ausgangsmaterials

3.4.4.1. Gehaltsverteilung der Inhaltsstoffe (Droge und Extrakte)

Die chromatographische Trennung erfolgte analog den Sennesblättern nach MEILHAMMER (2003). Abb. 102 zeigt das typische HPLC-Fingerprint-chromatogramm eines Auszugs pulverisierter Sennesfrüchte. Die Identifikation der Peaks wurde analog 3.3.4 durchgeführt. Eine Zuordnung der Peaks gibt Tabelle 8 wieder. Peak 11 wurde nach Isolation und ESI-MS Bestimmung als Tinnevellin-glykosid identifiziert.

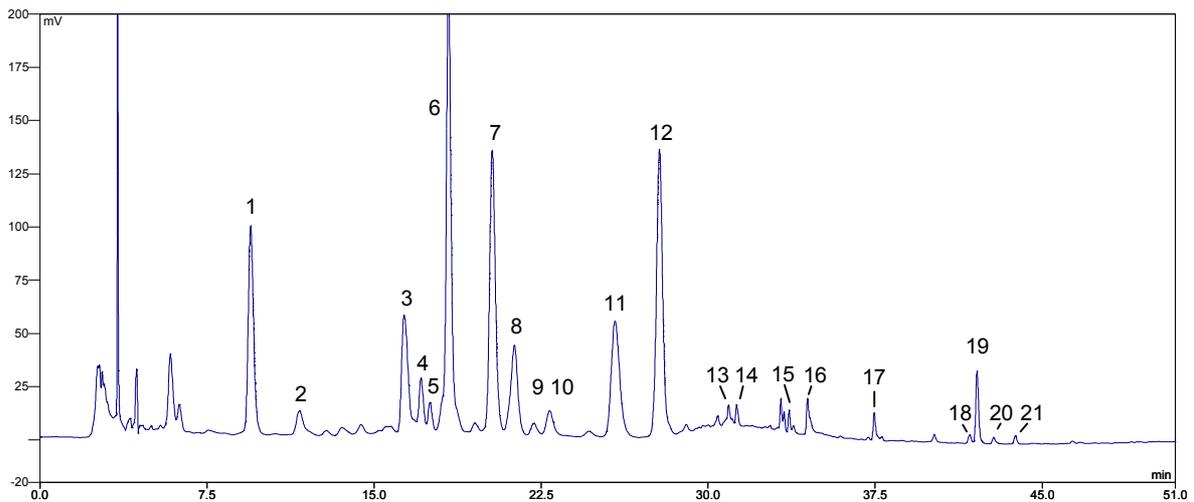


Abb. 102: HPLC-fingerprint eines Extraktes aus Sennesfrüchten (nach MEILHAMMER (2003))

Peak -Nr.	t _R [min]	Identität	UV-Maxima [nm]	MW	ESI neg [M-H ⁺] ⁻	Stoffgruppen- Zuordnung
1	9.13	n.b.	219,274,321			
2	11.12	Quercetin-diglucosid ²⁾	255, 263(S), 293 (S), 354	626,3	625,1	
3	16.10	Kämpferol-diglucosid ²⁾	265, 290(S), 348	610,5	609,1	
4	16.89	Isorhamnetin-diglucosid ²⁾	254,275(S), 297(S), 355	640,6	639,1	
5	17.31	Sennosid D ¹⁾	266,353	847,72		
6	18.14	Sennosid B ¹⁾	267,308,355	862,72		
7	20.09	Rhein-8-glykosid ¹⁾	230,261	446,35		
8	21.10	Sennosid A1 ¹⁾	265,351	862,72		
9	21.96	n.b.				
10	22.67	Sennosid C ¹⁾	268,332	847,72		
11	25.71	Tinnevellinglykosid ²⁾	233,266 (S)	408,4	407,1	
12	27.81	Sennosid A ¹⁾	268,342	862,72		
13	30.97	Sennidin B-monoglykosid ¹⁾				
14	31.32	Sennidin A-monoglykosid ¹⁾				
15	33.64	n.b.				
16	34.64	n.b.				
17	37.47	n.b.				Flavonoid ³⁾
18	41.74	Aloe Emodin ¹⁾	224,256,286	270,23		
19	42.08	Rhein ¹⁾	230,257	284,23		
20	42.82	Sennidin A ¹⁾		538,46		
21	43.8	Sennidin B ¹⁾		538,46		

Tabelle 8: Zuordnung der Peaks im HPLC-fingerprint von Alexandriner-Sennesfrüchten

¹⁾ identifiziert durch Coelution mit Referenzsubstanzen

²⁾ identifiziert nach Isolation durch MS siehe 3.4.8.3

³⁾ Zuordnung zu Inhaltsstoffgruppe anhand des UV-Spektrums
(S= Schulter im UV-Spektrum)

Bei der vorliegenden Einsatzdroge handelt es sich um Alexandriner-Sennesfrüchte. Unter Einberechnung des Gehaltes an Rhein-8-glykosid erreicht man einen Wert von 4,8% an 1,8-Hydroxyanthracenderivaten. Dieser liegt damit deutlich über den vorgeschriebenen 3,5% Mindestgehalt. Mit 21,8% 1,8-Hydroxyanthracenderivaten ist der handelsübliche Extrakt im

geforderten Intervall von 18-22 %. Der native Extrakt liegt mit 6,7% deutlich darunter. Einen Vergleich des Gesamtgehaltes an Sennosiden gibt Abb. 103.

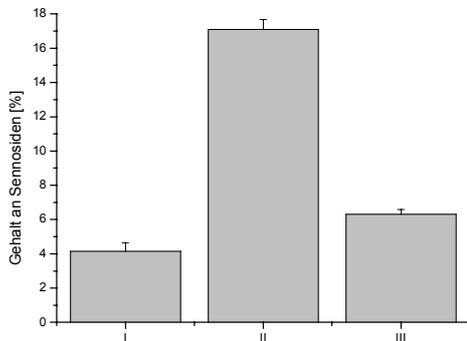


Abb. 103: Gehalt an Gesamtsennosiden der Einsatzdroge und der Extrakte berechnet als Sennosid B

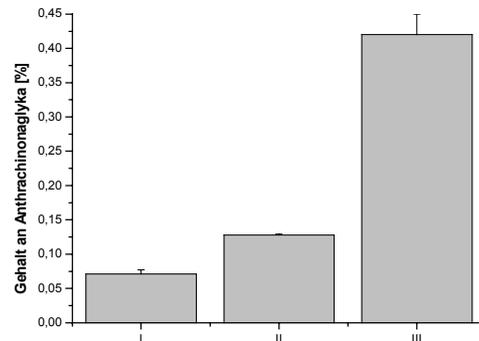


Abb. 104: Gehalt an Anthrachinonaglyka der Einsatzdroge und der Extrakte berechnet als Rhein

I: Alexandriner Sennesfrüchte II: ethanolischer Sennesfrüchteextrakt III: nativer methanolischer Sennesfrüchteextrakt

Der in Abb. 104 abgebildete Gehaltsvergleich an Anthrachinonaglyka zeigt einen in etwa doppelt so hohen Gehalt für den eingesetzten handelsüblichen Extrakt und mit 0,42% einen sechsfach höheren Gehalt als für die Einsatzdroge. Mit 0,07% liegt diese mit ihrem Anthrachinongehalt etwas über dem von GRIMMINGER und WITTHOLM (1993) ermittelten Intervall.

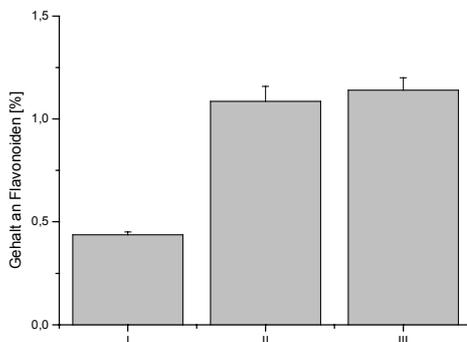


Abb. 105: Gehalt an Flavonoiden der Einsatzdroge und der Extrakte berechnet als Isorhamnetin

I: Alexandriner Sennesfrüchte II: ethanolischer Sennesfrüchteextrakt III: nativer methanolischer Sennesfrüchteextrakt

Wie bereits aus dem HPLC-Fingerprint-Chromatogramm ersichtlich ist, sind die Flavonoide in Sennesfrüchten in deutlich geringerem Ausmaß als in Sennesblättern vorhanden. Besonders die Aglyka sind kaum zu detektieren. Der Gesamtgehalt an Flavonoiden beläuft sich nur auf 0,4% und beträgt damit nur ein Drittel dessen in Sennesblättern. Die eingesetzten

Extrakte liegen mit um die 1,1% Gesamtgehalt auch deutlich unter den für Sennesblätterextrakte erreichten Werten (Abb. 105).

3.4.4.2. **Pulvereigenschaften der pulverisierten Einsatzdroge und des Extraktes**

Mit 8,2% lag der Trocknungsverlust der pulverisierten Sennesfrüchte von den drei unterschiedlichen Einsatzdrogen am niedrigsten. Der Sennesfrüchteextrakt war mit 3,74% ebenfalls arzneibuchkonform. Die Korngrößenverteilung ist ähnlich der pulverisierten Baldrianwurzel. Neben normalverteilten Körnern kleineren Durchmessers überwiegt eine mengenmäßig große Fraktion grobzerkleinerter Fruchtbruchstücke (Abb. 106). Der Extrakt entspricht in seiner Verteilung den anderen Extrakten und ist überwiegend durch zwei Maschenweiten charakterisierbar (Abb. 107).

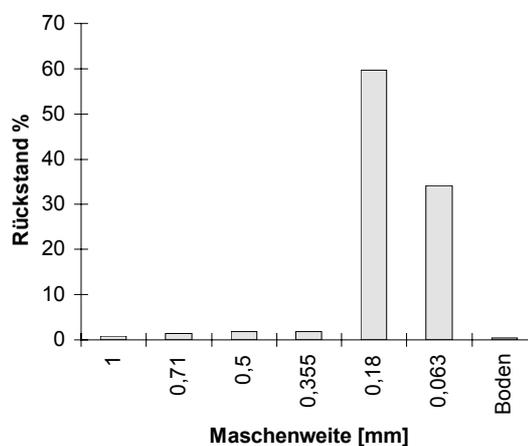
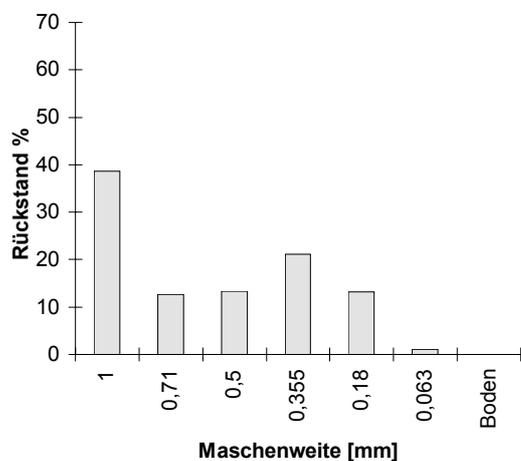


Abb. 106: Korngrößenverteilung der pulverisierten Sennesfrüchte

Abb. 107: Korngrößenverteilung des Sennesfrüchteextraktes

3.4.5. Stabilitätsuntersuchungen zu pulverisierten Sennesfrüchten

3.4.5.1. **HPLC Untersuchungen**

Die für die Sennesblätter ermittelten Stabilitätsdaten gelten im Wesentlichen auch für Sennesfrüchte. Allerdings zeigte sich, dass die Degradationserscheinungen in ihrem Ausmaß nicht so drastisch sind wie bei Sennesblättern. Die graphische Auswertung zeigt zum Teil einen nicht eindeutig interpretierbaren Kurvenverlauf und höhere Variationskoeffizienten. Dieses Problem scheint auf die inhomogenere Zusammensetzung des Pulvermaterials zurückzuführen zu sein. Das Gewicht der Fruchtbruchstücke ist teilweise sehr unterschiedlich, und die einzelnen Teile haben differierende stoffliche Zusammensetzung.

Dennoch lassen sich eindeutige Tendenzen bei der Degradation feststellen. Die Sennoside nahmen über die Zeit deutlich ab, wobei wiederum die Lagerbedingungen die Abbauraten

wesentlich beeinflussen (Abb. 108). Gleichzeitig war ein Anstieg der durch Hydrolyse entstehenden Sennidinmonoglykoside zu verzeichnen (Abb. 109). Während bei der Lagerung der Sennesblätter der Gehalt an Sennosiden auf unter 5% bei 40°C / 75% rF fiel, lag unter diesen Bedingungen der Gehalt an Sennosiden in Sennesfrüchten noch bei 36%. Der Anstieg der Sennidinmonoglykoside zeigte auch nicht den selben Verlauf wie bei Sennesblättern. Bei 25°C / 60% nahm der Gehalt eher ab. Bei 40°C / 75% rF war ein linearer Anstieg auf die dreifache Peakfläche festzustellen. Bei Sennesblättern war zunächst ein fulminanter Anstieg auf die fast zehnfache Peakfläche nachzuweisen, der dann in eine lineare Abnahme übergang. Unter diesen Gesichtspunkten scheint die Degradation der Sennoside zwar dem gleichen Weg zu folgen, ist aber in ihrem quantitativen Ausmaß geringer als bei Sennesblättern.

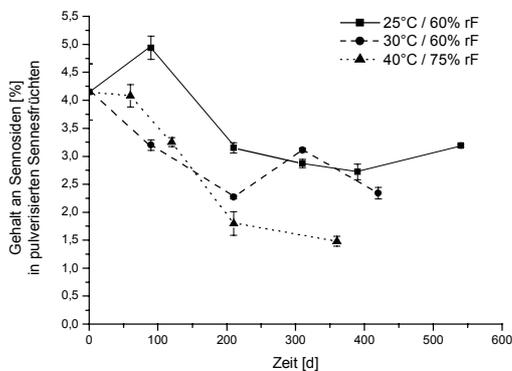


Abb. 108: Abnahme des Gehaltes an Sennosiden in pulverisierten Sennesfrüchten unter verschiedenen Einlagerungsbedingungen

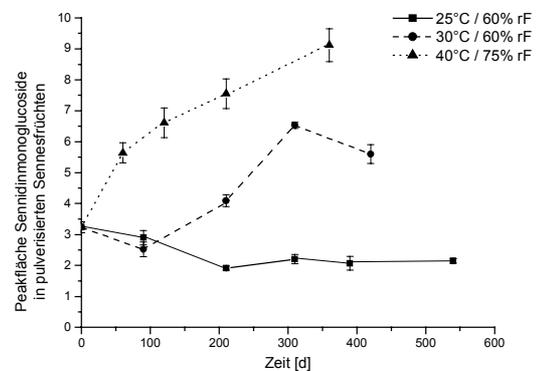


Abb. 109: Verlauf der Peakflächen der Sennidinmonoglykoside in Abhängigkeit von den Einlagerungsbedingungen

Ein ähnliches Bild liefert die Auswertung der Entwicklung des Rhein-8-glykosids (Abb. 110). Mit einer Abnahme des Rhein-8-glykosids geht eine Zunahme des Gehaltes an Aglyka einher (Abb. 111). Wiederum war die maximale Abnahme bei 40°C / 75% rF bei Sennesfrüchten mit 42% wesentlich geringer als bei Sennesblättern. Bei letzteren wurde in der gleichen Zeit nahezu alles Rhein-8-glykosid abgebaut. Die Zunahme der Aglyka verlief wieder linear steigend, während bei Sennesblättern der gleiche starke Anstieg der Aglyka zu Beginn beobachtet werden konnte, wie bereits für die Sennidinmonoglykoside oben beschrieben wurde. Ein derartiger Verlauf konnte hier nicht beobachtet werden.

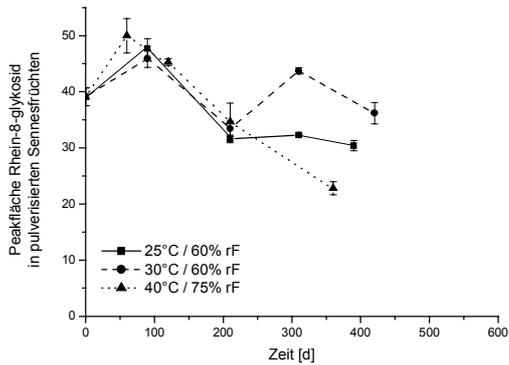


Abb. 110: Verlauf der Peakfläche von Rhein-8-glykosid in Abhängigkeit von den Einlagerungsbedingungen

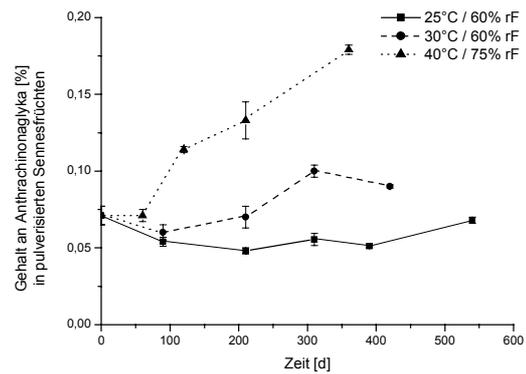


Abb. 111: Zunahme des Gehaltes der Anthrachinonaglyka Rhein und Aloe-Emodin in pulverisierten Sennesfrüchten unter verschiedenen Einlagerungsbedingungen

Die Auswertung der Flavonoide ist auf Grund des geringen Vorkommens in den Früchten noch schwerer zu interpretieren. Zwar zeigen die Glykoside eine Abnahme (Abb. 112), und die Aglyka eine leichte Zunahme (Abb. 113), derart deutliche Unterschiede wie bei Sennesblättern bei verschiedenen Lagerbedingungen wurden nicht beobachtet. Dass die Kurven nicht so stark differieren, ist zum Teil durch die erhöhte Stabilität dieser Verbindungen begründbar.

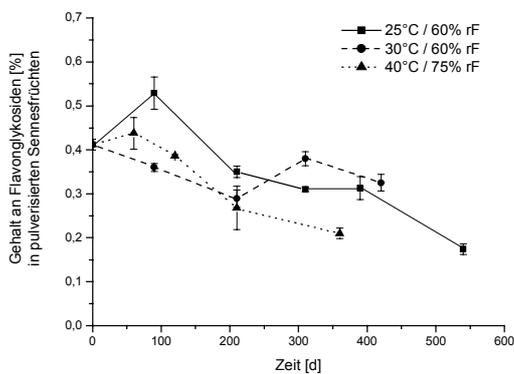


Abb. 112: Abnahme des Flavonglykosid-Gehaltes in pulverisierten Sennesfrüchten in Abhängigkeit von den Einlagerungsbedingungen

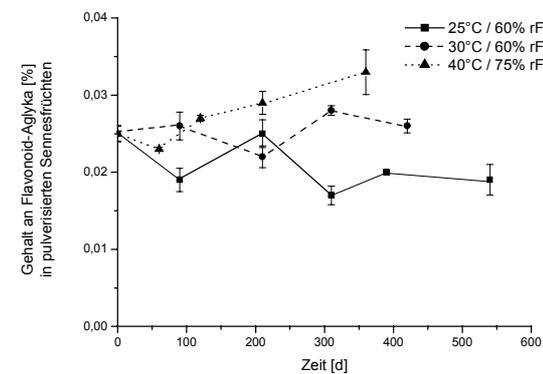


Abb. 113: Zunahme des Gehaltes an Isorhamnetin und Kämpferol als Flavonoidaglyka in pulverisierten Sennesfrüchten

Ein weiteres Glykosid, das sich in Sennesfrüchten nachweisen lässt, ist das Tinnevellin-glykosid. Seine Stabilität ist im Vergleich zu den anderen aufgeführten Verbindungen als eher gering einzustufen. Die Verläufe zeigen für 30°C / 60% rF und 40°C / 75% rF einen Abbau um über 75% (Abb. 114). Auch bei 25°C / 60% rF ist ein Abbau um 56% festzustellen. Der aus der Hydrolyse resultierende Naphtalengrundkörper konnte als Abbauprodukt im HPLC-Fingerprint-chromatogramm nicht identifiziert werden.

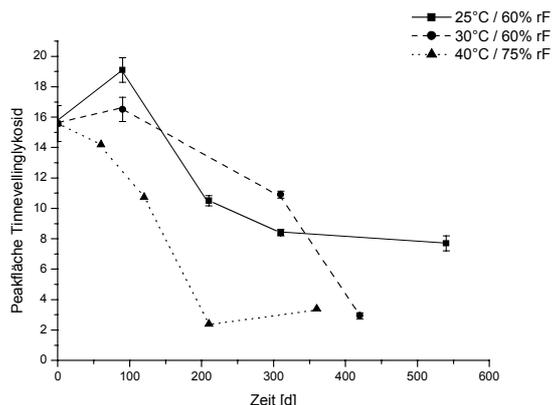


Abb. 114: Änderung der Peakfläche des Tinnevelinglykosids

3.4.5.2. Aussagen zur Stabilität der Einsatzdroge

Die Inhaltsstoffe der Sennesfrüchte erwiesen sich als geringfügig stabiler als die Sennesblätter. Die Auswertung des Gehaltes an 1,8-Hydroxyanthracenderivaten ergibt nur für 40°C / 75% eine Verringerung dieser Inhaltsstoffe mit 2,3% unter die vorgeschriebenen 3,5%. Die vorkommenden Degradationen scheinen aber nach den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie bei Sennesblättern abzulaufen. Ein Grund für die langsameren Hydrolysen könnte auch der geringere Trocknungsverlust, respektive Wassergehalt dieser Droge sein. Dadurch werden enzymatische und hydrolytische Prozesse weniger begünstigt als bei Sennesblättern, die um 2% mehr Wasser enthalten. Allerdings wurde die Interpretation der Daten durch die hohe Schwankung der Werte erschwert, so dass keine eindeutigen Aussagen wie bei Blattdroge und -extrakten gemacht werden konnten.

3.4.6. Stabilitätsuntersuchungen an Sennesfrüchte-Trockenextrakten

3.4.6.1. HPLC Untersuchungen

Die Beobachtung der Sennoside des Sennesfrüchteextraktes liefert in etwa das gleiche Bild wie bei Sennesblätterextrakt (Abb. 115). Die in alukaschierten Beuteln und in PE-Weithalsflaschen verpackten Extrakte verhalten sich unter allen drei Lagerbedingungen etwa gleich und zeigen einen Verlust am Gehalt der Sennoside um 10-15%. Demgegenüber verläuft die Degradation der Sennoside des in PE-Beuteln verpackten Extraktes meist identisch mit der des unverpackten Extraktes. Lediglich bei 40°C / 75% rF verläuft die Abnahme langsamer wie beim unverpackten Extrakt. Nach 12 Monaten finden sich in beiden weniger als 1% des Ausgangsgehaltes an Sennosiden. Ein Anstieg der Sennidinmonoglykoside war

auch beim Sennesfrüchteextrakt nicht zu beobachten, so dass ein anderer Degradationsweg als bei der Einsatzdroge vermutet wird.

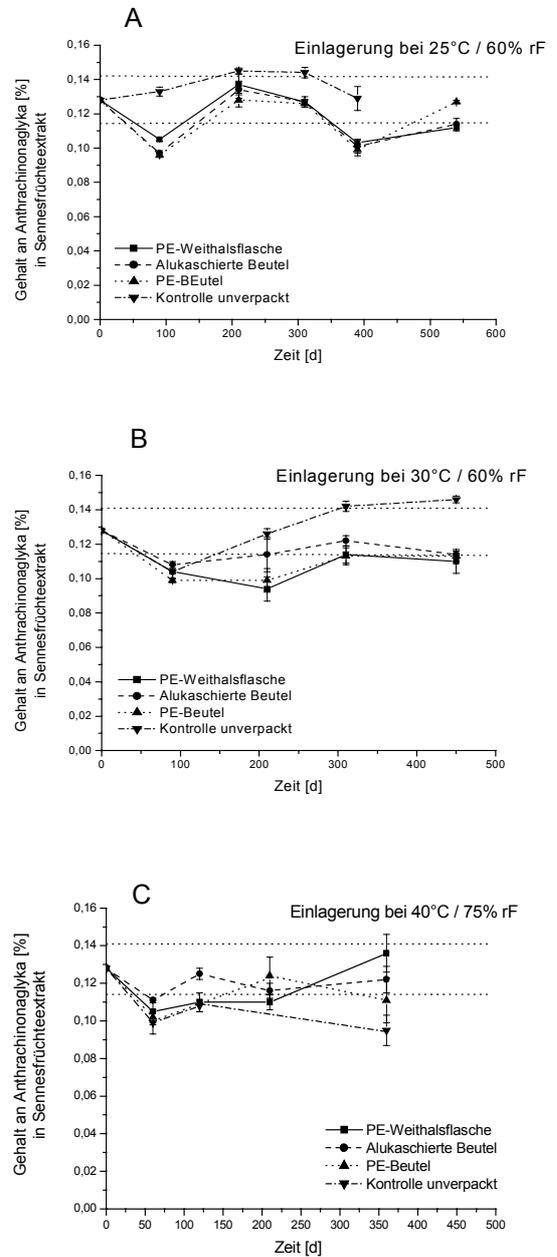
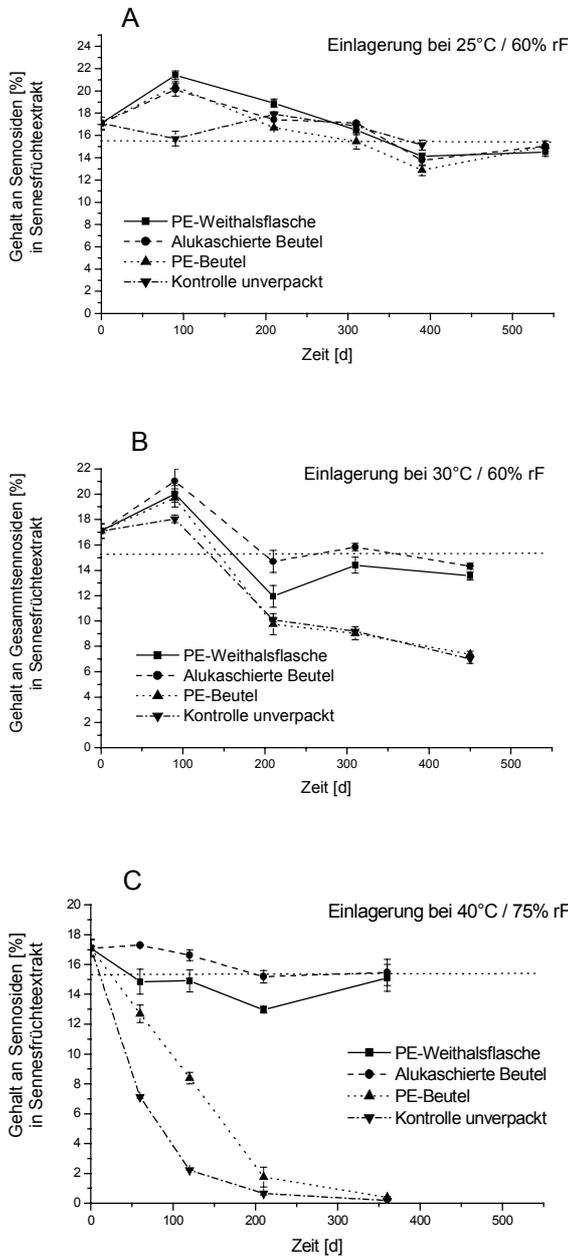


Abb. 115: Gehalt an Sennosiden berechnet als Sennosid B in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung in Sennesfrüchteextrakt

Abb. 116: Gehalt an Anthrachinonaglyka berechnet als Rhein in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung in Sennesfrüchteextrakt

A: 25°C / 60% rF B: 30°C / 60% rF C: 40°C / 75% rF

Die gepunkteten Linien zeigen die Unterschreitung von 90% bzw. die Überschreitung von 110% des Ausgangsgehaltes

Der Verlauf der Anthrachinonaglyka ist nicht eindeutig zu interpretieren (Abb. 116). Wiederum erschwert der wesentlich geringere Gehalt als bei Sennesblätterextrakten eine genauere Erfassung dieser Inhaltsstoffe. Sie zeigen unter allen Einlagerungsbedingungen im Schnitt

eine leichte Abnahme um 10%. Die Zunahme dieser Inhaltsstoffe im unverpackten Extrakt bei 30°C / 60% rF ist nicht erklärbar und widerspricht dem Bild der erhaltenen anderen Untersuchungsergebnisse.

Die Untersuchungen zur Stabilität von Sennesblättern zeigten, dass auf den Verlauf des Rhein-8-glykosids Rücksicht bei der Auswertung genommen werden sollte. In Abb. 117 ist der Verlauf dieser Verbindung bei verschiedener Verpackungen unter 40°C / 75% rF dargestellt. Interessanterweise zeigt sich ein stärkerer Abbau, als dies beim Sennesblätterextrakt beobachtet wurde. Dennoch ist die Degradation des Rhein-8-glykosids nicht so heftig wie die der Sennoside.

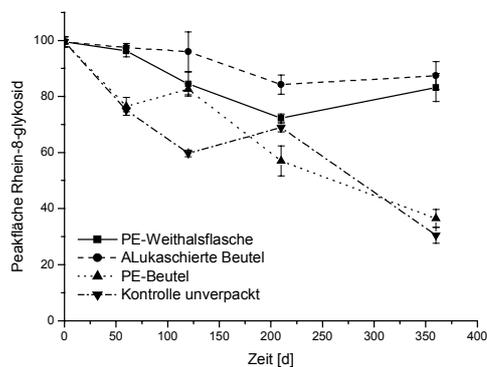


Abb. 117: Verlauf der Peakfläche des Rhein-8-glykosids in Sennesfrüchteextrakt bei 40°C / 75% rF

Der Flavonoidgehalt in diesem Extrakt war sehr gering und die Ergebnisse lieferten keinen Aufschluss über die Stabilität dieses Extraktes.

Wie bereits bei nativem Sennesblätterextrakt beobachtet, zeigte der native Sennesfrüchteextrakt eine wesentlich geringere Stabilität als der handelsübliche Extrakt bei gleicher Verpackung (PE-Weithalsflasche). Bei 25°C / 60% rF belaufen sich die Verluste an Sennosiden im Schnitt um etwa 20% (Abb. 118). Bei 30°C / 60% rF sank der Gehalt über die Lagerzeit auf 12%, und war bei 40°C / 75% rF praktisch nicht mehr nachweisbar. Der handelsübliche Extrakt zeigte unter allen Bedingungen nur Abnahmen von ca. 15%.

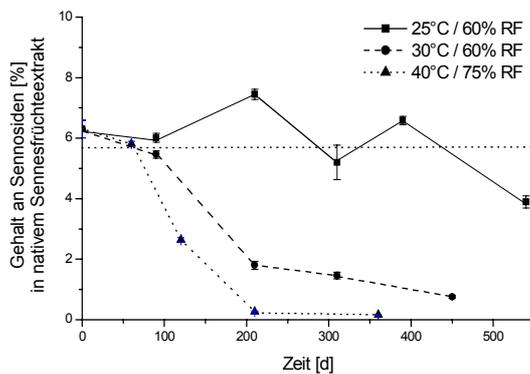


Abb. 118: Nativer Sennesfrüchteextrakt: Gehalt an Sennosiden berechnet als Sennosid B in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung

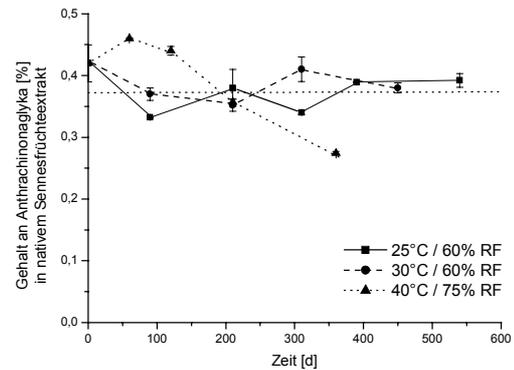


Abb. 119: Nativem Sennesfrüchteextrakt: Gehalt an Anthrachinonaglyka berechnet als Rhein in Abhängigkeit von Lagerung und Verpackung

Die graphische Auswertung der Anthrachinonaglyka zeigt keine deutlichen Tendenzen im Abbauverhalten (Abb. 119). Eine deutliche Zunahme wurde auch hier nicht beobachtet. Daher ist auch für den nativen Sennesfrüchteextrakt zu folgern, dass er den gleichen Degradationswegen wie der handelsübliche Extrakt unterliegt. Die Veränderungen der Flavonoide waren wie beim handelsüblichen Extrakt nicht aussagkräftig für die Stabilitätsuntersuchungen. Das Naphtalenglykosid Tinnevellin-glykosid, erwies sich auch in nativen Sennesfrüchteextrakten als sehr instabil. Im Vergleich zum nativen Sennesblätterextrakt zeigte der native Sennesfrüchteextrakt größere Instabilität.

3.4.6.2. Aussagen zur Stabilität der Sennesfrüchteextrakte

Vergleicht man die prozentualen Veränderungen ausgewählter Inhaltsstoffe beim Sennesfrüchteextrakt und der Einsatzdroge bei gleicher Verpackung (Abb. 120), so zeigen sich in diesem Fall nicht so deutliche Unterschiede, wie bei Baldrianwurzel und Sennesblättern und den entsprechenden Extrakten.

Der Verlauf der Sennoside zeigt bei gleichen Lagerungsbedingungen für Sennesfrüchte eine nur um 30-40% stärkere Abnahme als im Extrakt. Auch ist die Abhängigkeit von den Lagerbedingungen nicht so deutlich zu beobachten wie bei den anderen Einsatzdrogen. Deutliche Unterschiede zeigen sich allerdings bei den Anthrachinonen. Diese steigen bei Sennesfrüchten abhängig von den Einlagerungsbedingungen an, wohingegen sie beim Extrakt unter gleichen Bedingungen sinken. Grund dafür sind unterschiedliche Degradationsprozesse in Einsatzdroge und Extrakt.

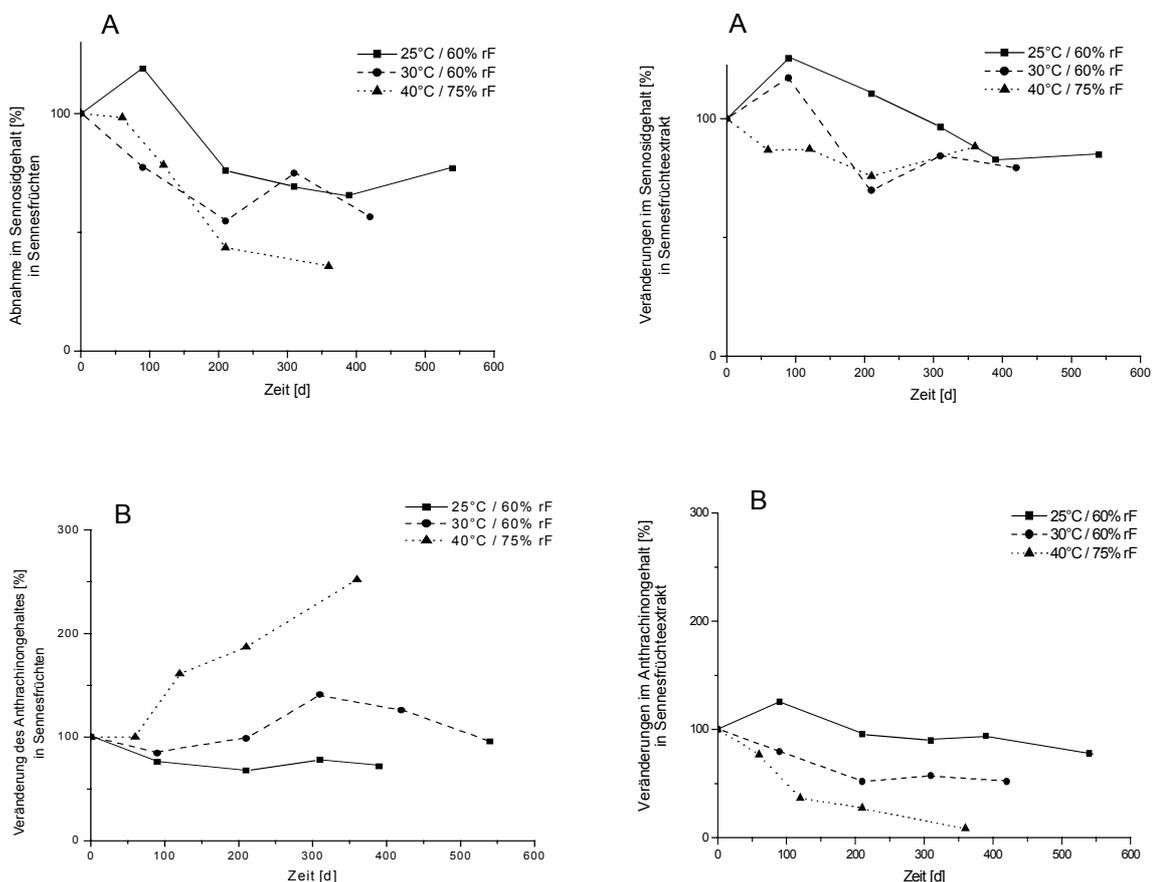


Abb. 120: Vergleich zwischen Sennesfrüchten und Sennesfrüchteextrakt hinsichtlich der Veränderungen wichtiger Inhaltsstoffe in Prozent bei gleicher Verpackung (PE-Weithalsflasche)

A: prozentualer Sennosidgehalt B: prozentualer Anthrachinongehalt

Im Gegensatz zu den anderen beiden Einsatzdrogen verhalten sich Extrakt und Einsatzdroge bei 25°C / 60% rF in etwa gleich stabil.

In Tabelle 9 ist die Zeit zur Unterschreitung von 90% des Ausgangsgehaltes an Sennosiden beim Sennesfrüchteextrakt zusammengefasst. Vergleicht man diese Werte mit denen der Sennesblätterextrakte (Tabelle 7) zeigt sich die deutlich längere Stabilität der Sennesfrüchteextrakte. Besonders die Extrakte in alukaschierten Beuteln zeigen eine erhöhte Stabilität auch bei höherer Feuchtigkeit und Temperatur. Selbst die Extrakte in PE-Beuteln und der unverpackte Extrakt sind bei 25°C / 60% rF fast ein Jahr über 90% des Ausgangsgehaltes. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Sennesfrüchteextrakt von allen in dieser Arbeit untersuchten Extrakten, der am wenigsten durch äußere Einflüsse in seiner chemischen Zusammensetzung beeinflusste Extrakt ist.

Verpackung	Einlagerung		
	25°C / 60% rF	30°C / 60% rF	40°C / 75% rF
	Stabilitätsgrenzwerte [d]		
PE-Weithalsflasche	320	213	163
Alukaschierte Beutel	291	332	312
PE-Beutel	298	108	23
Kontrolle unverpackt	299	92	7

Tabelle 9: Grenzwerte [d] der Sennesfrüchteextrakte bis zur Unterschreitung von 90% des Ausgangsgehaltes an Sennosiden

Im folgenden wurde untersucht, ob die Einbeziehung des Rhein-8-glykosids in die quantitative Auswertung die Aussagen über die Stabilität so wie es beim Sennesblätterextrakt verändert. Der Vergleich der prozentualen Abnahme der Sennoside (Abb. 121) mit der prozentualen Abnahme der Summe aus Sennosiden und Rhein-8-glykosid (Abb. 122) in der Einsatzdroge zeigt im relativen Verlauf keine deutlichen Unterschiede. Dies liegt, wie bei Sennesblättern, an dem ähnlichen Degradationsverhalten der Sennoside und des Rhein-8-glykosids in der Pulverdroge.

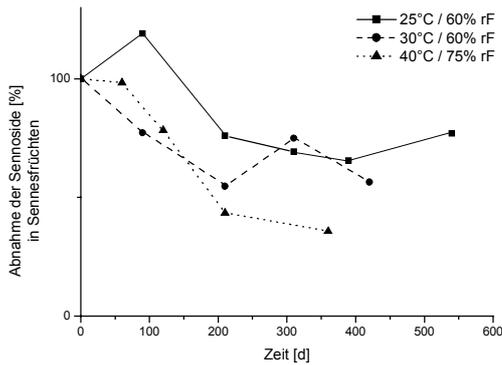


Abb. 121: Einsatzdroge: Prozentuale Abnahme der Sennoside bei der Lagerung

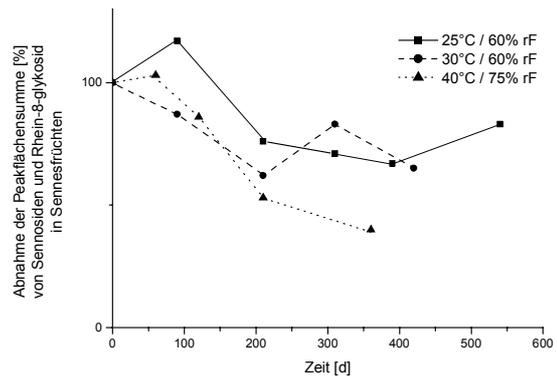


Abb. 122: Einsatzdroge: Prozentuale Abnahme der Summe aus Sennosiden und Rhein-8-glykosid bei der Lagerung

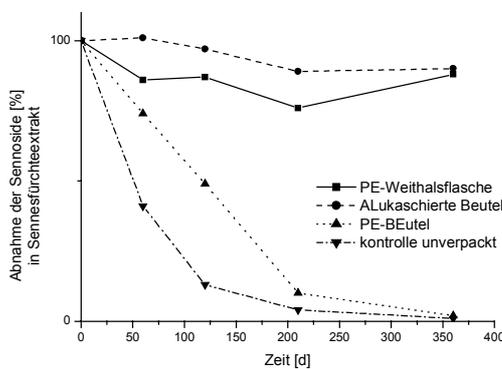


Abb. 123: Sennesfrüchte-extrakt: Prozentuale Abnahme der Sennoside bei der Lagerung

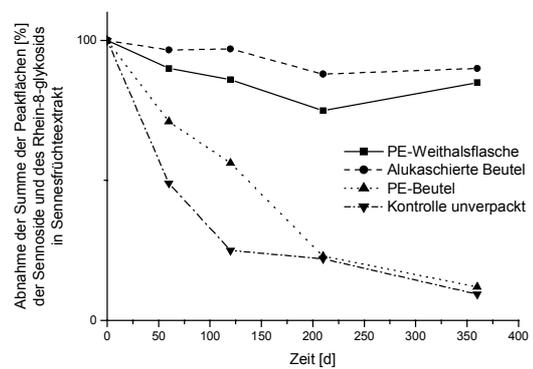


Abb. 124: Sennesfrüchte-extrakt: Prozentuale Abnahme der Summe aus Sennosiden und Rhein-8-glykosid bei der Lagerung

Anders verhält es sich beim Vergleich der prozentualen Abnahme der Sennoside (Abb. 123) mit der prozentualen Abnahme der Summe aus Sennosiden und Rhein-8-glykosid (Abb. 124) im Extrakt. Wie bereits beim Sennesblätterextrakt beobachtet zeigt sich besonders bei stark veränderten Proben eine geringere Abnahme der Werte. Für die Extrakte in PE-Weithalsflaschen und in alukaschierten Beuteln sind diese Unterschiede kaum relevant. Bei unverpackten und in PE-Beuteln verpackten Extrakten hingegen ist eine um 10% geringere Abnahme der Werte zu verzeichnen. Allerdings kommen diese Unterschiede weniger als beim Sennesblätterextrakt zum tragen, da das Rhein-8-glykosid im Sennesfrüchte-extrakt stärker abgebaut wurde. Dennoch verfälscht die Addierung des Rhein-8-glykosids, wie es z.B. bei Gruppenreaktionen wie der Borntreager-Reaktion der Fall ist, die Aussage über das Stabilitätsverhalten geringfügig. Hinsichtlich des geforderten Mindestgehaltes an 1,8-Hydroxyanthracenderivaten von 18% werden, wie beim Sennesblätterextrakt, nur die in alukaschierten Beuteln und PE-Weithalsflaschen verpackten Extrakte den Anforderungen der Ph. Eur. unter allen Lagerbedingungen gerecht.

3.4.7. Zusammenfassung und Diskussion

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Sennesfrüchte und die daraus hergestellten Extrakte nicht so empfindlich wie Sennesblätter und –extrakte auf äußere Einflüsse reagieren. Dies zeigt sich in weniger stark ausgeprägten Unterschieden im Degradationsverhalten unter verschiedenen Lagerbedingungen und der geringeren Steigung der resultierenden Graphen.

Das quantitative Ausmaß des Verlustes an Sennosiden bei Extrakt und Einsatzdroge unterscheidet sich auch geringer als bei den zuvor untersuchten Einsatzdrogen und Extrakten. Allerdings folgen die Inhaltsstoffe auch bei der Einsatzdroge einem anderen Degradationsweg als im Extrakt. Es kann erneut auf einen enzymatischen Abbau in der Einsatzdroge geschlossen werden. Die qualitativen Änderungen entsprechen dabei den bereits bei Sennesblättern beobachteten Transformationen. Bei der Stabilitätsanalytik der Sennesfrüchte haben die Flavonoide auf Grund ihres geringen Gehaltes keinen Stellenwert als Leitsubstanzen. Sie erwiesen sich aber auch hier als stabilere Inhaltsstoffe als z.B. die Sennoside. Diese wiederum stellten die empfindlichsten Inhaltsstoffe dar, und sind damit zur Überwachung der Stabilität der Sennesfrüchte gut geeignet.

Wie schon für den Sennesblätterextrakt gezeigt, führt die Bestimmung des Gehaltes an 1,8-Hydroxyanthracenderivaten unter Einbezug des Rhein-8-glykosids bei der Stabilitätsuntersuchung zu geringfügig anderen Ergebnissen. Die Unterschiede sind allerdings nicht so gravierend, wie bei Sennesblätterextrakt. Als konform mit den Anforderungen der Ph.Eur. sind nur die handelsüblichen ethanolischen Extrakte in alukaschierten Beuteln und PE-Weithalsflaschen anzusehen.

Der native Extrakt wies auch bei Sennesfrüchten keine ausreichende Stabilität auf, was wiederum auf den hohen Wassergehalt zurückzuführen sein könnte. Seine Stabilität gegenüber den äußeren Einflüssen erwies sich als geringer als beim Sennesblätterextrakt.

3.4.8. Identifikation nicht identifizierter Inhaltsstoffe des HPLC-fingerprints

3.4.8.1. Fraktionierung des Sennesblätterextraktes

Ziel der Fraktionierung sollte die Gewinnung der Reinsubstanzen hinter Peak 2, 3 und 4 sein, da diese Substanzen mengenmäßig eine große Rolle spielen und für die Stabilitätsuntersuchung interessante Veränderungen zeigten.

Nach Vorextraktion des Extraktes mit Methanol mittels Soxhlet-extraktion konnte eine Fraktion gewonnen werden, die die polaren Inhaltsstoffe des eingesetzten Extraktes enthielt. Nach Zugabe von Wasser wurden die restlichen unpolaren Anteile mit Ethylacetat ausgeschüttelt und verworfen. Nach weiterer Extraktion mit Ethylacetat durch Flash-Chromatographie an Kieselgel wurde eine Fraktion erhalten, die die Flavonoidglykoside und Sennoside enthielt. Diese wurden säulenchromatographisch an RP 18-Material getrennt. Die erhaltenen 17 Sammelfraktionen wurden über UV-DAD den entsprechenden Inhaltsstoffgruppen zugeordnet. In Abb. 125 sind die Fraktionen der drei isolierten Inhaltsstoffe dargestellt.

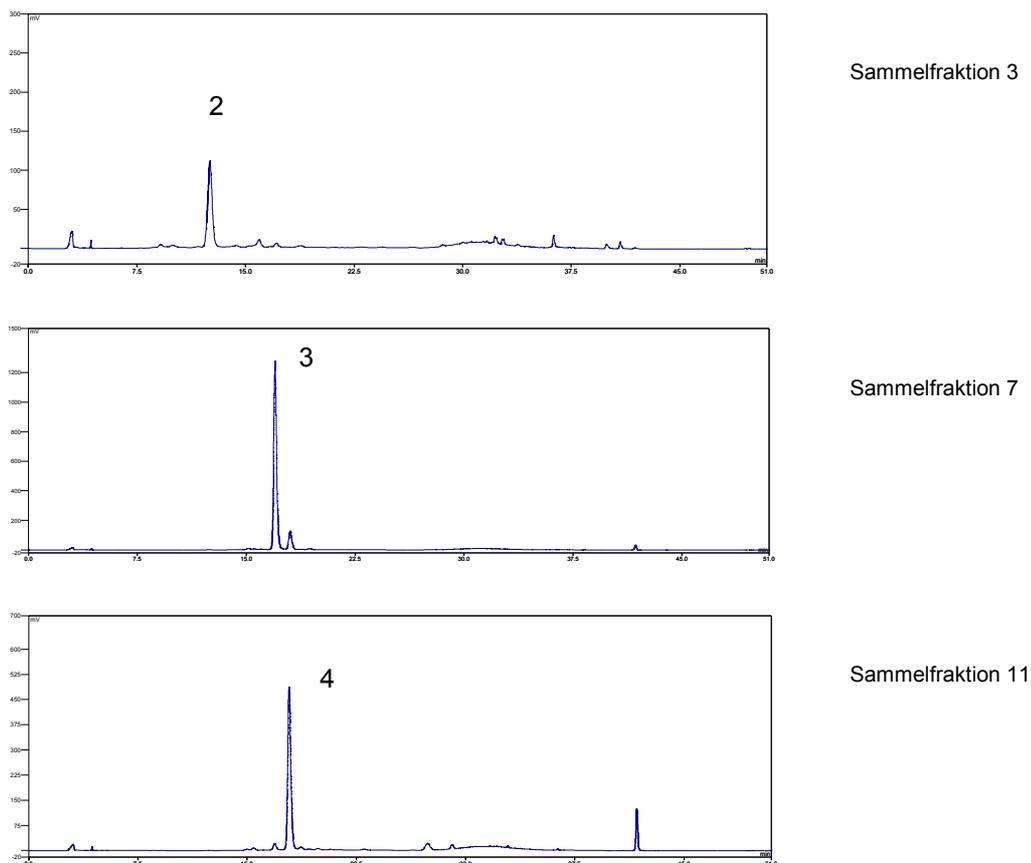


Abb. 125: Isolierte Inhaltsstoffe in Einzelfraktionen der Säulenchromatographie aus Sennesblätterextrakt

Der zweite kleine Peak in Fraktion 11 bei höherer Retentionszeit konnte als Rhein identifiziert werden. Diese Substanz konnte während der Isolation nicht vollständig abgetrennt wer-

den. Da ihre Identität bekannt, und ihr Anteil nur gering war, hatte ihr Vorkommen keinen Einfluss auf das Ergebnis.

3.4.8.2. *Herstellung von Fraktionen aus Sennesfrüchten*

Ein weiterer nicht identifizierter Inhaltsstoff stellte Peak 11 im Fingerprint der Sennesfrüchte-Droge dar. Seinem UV-Spektrum nach musste er zu der Gruppe der Naphtalenderivate gehören.

Die pulverisierte Droge wurde mit Hexan und Ethylacetat per Soxhlet vorextrahiert. Die Ethylacetat-fraktion wurde nach Trocknung wiederum einer Flash-chromatographie unterzogen und die resultierende mittelpolare Fraktion auf einer RP 18 Säule getrennt.

Die resultierende Substanz zeigt Abb. 126. Die Probe war geringfügig mit Rhein verunreinigt. Es zeigte sich, dass diese Substanz ein sehr breites Elutionsfenster abdeckte und in nahezu jeder mittelpolaren Fraktion in geringen Anteilen zu finden war.

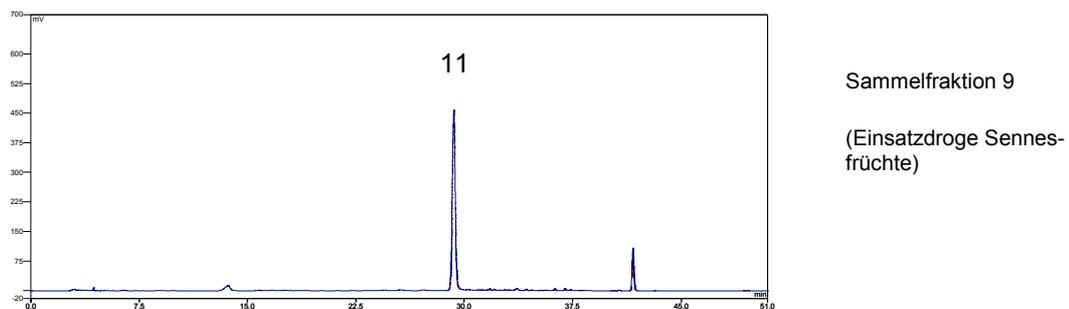


Abb. 126: Isolierter Inhaltsstoff aus Sennesfrüchten nach Säulenchromatographie

3.4.8.3. *Strukturaufklärung der isolierten Inhaltsstoffe*

Die strukturelle Zuordnung der Inhaltsstoffe konnte zunächst anhand der UV-Spektren durchgeführt werden. Die aus dem Sennesblätterextrakt isolierten Verbindungen zeigten das typische Spektrum der Flavonoide (Abb. 127) mit Maxima bei 250-265 nm und 340-360 nm [SCHNEIDER-LEUKEL (1994)]. Nach Ermittlung der Massen der Moleküle per ESI-MS mit 625,1 m/z für Peak 2, 609,1 m/z für Peak 3, und 639,1 m/z für Peak 4 kann von den von KINJO et al. (1994) gefundenen Flavonoid-Diglucosiden ausgegangen werden (Spektren siehe Anhang 6.2). Danach kann Peak 2 dem Quercetin-gentiobiosid, Peak 3 dem Kämpferol-gentiobiosid und Peak 4 dem Isorhamnetin-gentiobiosid zugeordnet werden.

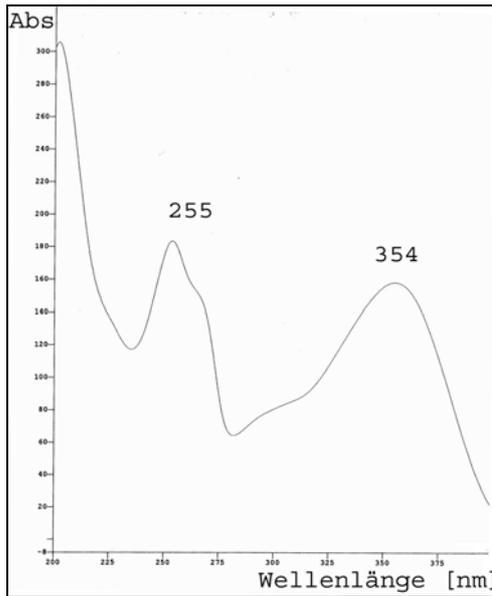


Abb. 127: Typisches UV-Spektrum der Flavonoide

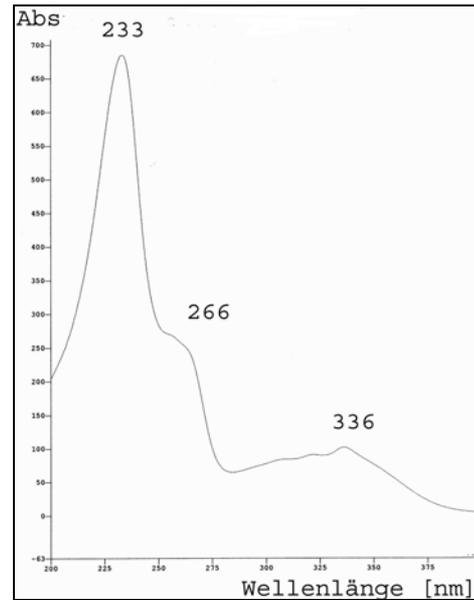


Abb. 128: Typisches UV-Spektrum der Naphtalenderivate

Die aus Sennesfrüchten isolierte Substanz zeigte das typische Spektrum der Naphtalenderivate (Abb. 128) mit einem Maximum bei 233 nm, einer Schulter bei 266 nm und einem kleinen Maximum bei 336 nm. Zur Identifikation wurde die Masse des Moleküliions durch ESI-MS bestimmt. Mit 407,1 m/z ließ sich dieses Naphtalenderivat dem Tinnevelinglykosid zuordnen [LEMLI et al. (1981)] (siehe Anhang 6.2.9).

3.5. Besondere Stabilitätsprobleme bei Trockenextrakten

3.5.1. Problemstellung

Als Hauptursache chemischer Instabilitäten hat sich nach den durchgeführten Untersuchungen die Erhöhung der Luftfeuchtigkeit erwiesen. Diese kann neben einer Veränderung in der chemischen Zusammensetzung auch zu Veränderungen der physikalischen Eigenschaften von galenischen Zubereitungen führen. Ausschlaggebend dafür ist die Sorption von Wasserdampf. Nachdem diese an den Phasengrenzflächen zwischen fester und gasförmiger Phase abläuft, können alle Eigenschaften des Feststoffes, die von der Oberfläche abhängen beeinflusst werden. Hierdurch werden beispielsweise Fließvermögen, Aufsaugvermögen, Freisetzungverhalten und Lösungsgeschwindigkeit von Pulvern beeinflusst [BAUER et al. (1999b)]. Da Extrakte als Pulver in ungeschützter Form vorliegen, muss diesem Gesichtspunkt besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

3.5.2. Sensorische Veränderungen

Die untersuchten Extrakte zeigten zum Teil bereits zum ersten Messzeitpunkt nach drei Monaten deutliche Veränderungen in Aussehen und physikalischer Beschaffenheit. Die größten Veränderungen waren erwartungsgemäß bei den unverpackt aufbewahrten Extrakten aufgetreten. Durch die hohe Adsorption der Luftfeuchte verflüssigten sich die Extrakte und zeigten dunkle Verfärbungen. Ähnlich verhielten sich die Extrakte in PE-Beuteln, die ebenfalls Farbveränderungen zeigten, bei 25°C / 60% rF zäh verklumpten und sich schließlich bei 30° und 40° verflüssigten. Eine Ausnahme bildete der Sennesfrüchteextrakt, der bei 25°C / 60% rF keine Veränderungen zeigte und unter den beiden anderen Bedingungen trocken verklumpte. In Abb. 129 sind die ins Auge fallenden Veränderungen am Beispiel des ethanolischen Baldrianextraktes gezeigt.



t₀ 25°C / 60% rF 30°C / 60% rF 40°C / 75% rF

Abb. 129 : Veränderungen des ethanolischen Baldrianextraktes in PE-Beuteln unter verschiedenen Lagerbedingungen

Wie bereits erwähnt, waren selbst hergestellte Extrakte extrem hygroskopisch und begannen bereits kurz nach der Trocknung Wasser aufzunehmen. Daher war bei diesen Extraktproben auch ein feuchtes Verklumpen bis hin zur Verflüssigung zu bemerken. Die in PE-Weithalsflaschen und alukaschierten Beuteln gelagerten Extrakte zeigten sich zum ersten Messpunkt unverändert. Lediglich der ethanolische Baldrianwurzelextrakt begann an der Oberfläche Klümpchenbildung zu zeigen. Die zur Herstellung der Extrakte verwendeten Einsatzdrogen zeigten als einzige Veränderungen eine beginnende Braunfärbung bei 30°C / 60% rF und 40°C / 75% rF. Es bestand dabei kein Unterschied zwischen einer Lagerung in PE-Weithalsflaschen und PE-Beuteln. In Tabelle 10 sind die beobachteten Veränderungen für den ersten Messzeitpunkt zusammengefasst.

Untersuchte Extrakte	Lagerbedingungen		
	25°C/60% rF	30°C/60% rF	40°C/75% rF
(3 Monate)			
Val.rad.pulv.PE-Weithalsflasche		1	1
Val.rad.pulv.PE-Beutel		1	1
Val.ex.spir.PE-Weithalsflasche			2
Val.Ex.spir. Alukaschierte Beutel			2
Val.Ex.spir. PE-Beutel	2	3	3
Val.Ex.spir. Kontrolle unverpackt	3	3	3
Val.ex.sicc.PE-Weithalsflasche			
Val.Ex.sicc. Alukaschierte Beutel			
Val.Ex.sicc. PE-Beutel	2	3	3
Val.Ex.sicc. Kontrolle unverpackt	3	3	3
Val.ex.nat. 55% EtOH	3	3	3
Val.ex.nat. 85% EtOH	3	3	3
Senn.fol.pulv. PE-Weithalsflasche		1	1
Senn.fol.pulv. PE-Beutel		1	1
Senn.fol.ex.PE-Weithalsflasche			
Senn.fol.Ex.Alukaschierte Beutel			
Senn.fol.Ex.PE-Beutel	3	3	3
Senn.fol.Ex.Kontrolle unverpackt	3	3	3
Senn.fol.Ex.nat.	2	2	2
Senn.fruct.pulv.PE-Weithalsflasche		1	1
Senn.fruct.pulv.PE-Beutel		1	1
Senn.fruct.Ex.PE-Weithalsflasche			
Senn.fruct.Ex. Alukaschierte Beutel			
Senn.fruct.Ex.PE-Beutel		2	2
Senn.fruct.Ex.Kontrolle unverpackt	2	2	2
Senn.fruct.Ex.Nat.	2	3	3

Tabelle 10: Veränderungen in Aussehen oder Geruch der eingesetzten Extrakte und Drogen nach drei Monaten Lagerung
 1: Dunkelfärbung; 2: Verklumpung; 3: Verflüssigung;
 dunkelgrau unterlegt: schwere Veränderungen ; hellgrau unterlegt: leichte Veränderungen

Nach sechs Monaten Lagerung hatten sich einige der Extrakte weiter verändert, wobei die ethanolischen Baldrianextrakte sich als die empfindlichste Zubereitung erwiesen. Sie zeigten sowohl in alukaschierten Beuteln, als auch in PE-Weithalsflaschen bei 30°C / 60% rF bereits starke Verklumpung und Erhärtung. Abb. 130 und Abb. 131 zeigen den ethanolischen Extrakt im Ausgangszustand und aus einem alukaschierten Beutel nach sechsmonatiger Lagerung bei 40°C / 75% rF.



Abb. 130: Ethanolischer Baldrianextrakt in alukaschierten Beuteln vor der Lagerung



Abb. 131: Ethanolischer Baldrianextrakt nach sechsmonatiger Lagerung bei 40°C / 75% rF in alukaschierten Beuteln

Der methanolische Baldrianextrakt zeigte in den PE-Weithalsflaschen eine Aushärtung und nahm in seinem Volumen bei 40°C / 75% rF ab. Unter gleichen Bedingungen waren in alukaschierten Beuteln keine Veränderungen festzustellen. Der methanolische Sennesblätterextrakt zeigte an der Oberfläche in den Weithalsflaschen eine leicht reversible Krustenbildung bei 40°C / 75% rF. In den alukaschierten Beuteln spiegelte sich diese Veränderungen in leichter Verklumpung wieder. Am stabilsten zeigte sich der Sennesfrüchteextrakt, der selbst in PE-Beuteln bei 25°C / 60% rF nur trocken verklumpte aber kein Zerfließen aufwies. In Tabelle 11 sind die auffälligen Extraktveränderungen nach sechsmonatiger Lagerung aufgelistet. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen änderte sich am Zustand der Extrakte und Einsatzdrogen, wie er zu diesem Zeitpunkt war, nichts mehr.

Untersuchte Extrakte	Lagerbedingungen		
	25°C/60% rF	30°C/60% rF	40°C/75% rF
(6 Monate)			
Val.rad.pulv.PE-Weithalsflasche		1	1
Val.rad.pulv.PE-Beutel		1	1
Val.ex.spir.PE-Weithalsflasche		2	2
Val.Ex.spir. Alukaschierte Beutel		2	2
Val.Ex.spir. PE-Beutel	3	3	3
Val.Ex.spir. Kontrolle unverpackt	3	3	3
Val.ex.sicc.PE-Weithalsflasche			2
Val.Ex.sicc. Alukaschierte Beutel			
Val.Ex.sicc. PE-Beutel	3	3	3
Val.Ex.sicc. Kontrolle unverpackt	3	3	3
Val.ex.nat. 55% EtOH	3	3	3
Val.ex.nat. 85% EtOH	3	3	3
Senn.fol.pulv. PE-Weithalsflasche		1	1
Senn.fol.pulv. PE-Beutel		1	1
Senn.fol.ex.PE-Weithalsflasche			2
Senn.fol.Ex.Alukaschierte Beutel			2
Senn.fol.Ex.PE-Beutel	3	3	3
Senn.fol.Ex.Kontrolle unverpackt	3	3	3
Senn.fol.Ex.nat.	2	2	2
Senn.fruct.pulv.PE-Weithalsflasche		1	1
Senn.fruct.pulv.PE-Beutel		1	1
Senn.fruct.Ex.PE-Weithalsflasche			
Senn.fruct.Ex. Alukaschierte Beutel			
Senn.fruct.Ex.PE-Beutel	2	2	2
Senn.fruct.Ex.Kontrolle unverpackt	2	2	2
Senn.fruct.Ex.Nat.	2	3	3

Tabelle 11 : Veränderungen in Aussehen oder Geruch der eingesetzten Extrakte und Drogen nach 6 Monaten Lagerung
 1: Dunkelfärbung; 2: Verklumpung; 3: Verflüssigung;
 dunkelgrau unterlegt: schwere Veränderungen ; hellgrau unterlegt: leichte Veränderungen

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass alukaschierte Beutel die günstigste Verpackung darstellten, und die Extrakte mit Ausnahme von ethanolischem Baldrianextrakt, darin optisch unversehrt erschienen. Die Extrakte in PE-Beuteln waren den unverpackten Extrakten hinsichtlich der sensorischen Veränderungen nur geringfügig überlegen. Weithalsflaschen konnten in den meisten Fällen starke Veränderungen verhindern. Die stark hygroskopischen nativen Extrakte konnten dennoch so viel Wasser aufnehmen, dass Verflüssigung eintrat.

3.5.3. Veränderungen der Pulvereigenschaften

3.5.3.1. Trocknungsverlust

Um einen quantitativen Vergleich über die Menge des adsorbierten Wassers der unterschiedlich verpackten Extrakte zu bekommen, wurde der Trocknungsverlust für Extrakte und Einsatzdrogen ermittelt. In Abb. 132 sind vergleichend die Ausgangswerte des Trocknungsverlustes der eingesetzten Proben dargestellt. Dabei wird ersichtlich, dass von den nativen Extrakten nur der Sennesblätterextrakt unter dem vom Arzneibuch [PH.EUR. (2002c)] geforderten Trocknungsverlust von 5% liegt. Ohne den Zusatz von Hilfsstoffen war keine weitere Trocknung möglich. In die Auswertung des Trocknungsverlustes wurden die nativen Extrakte daher nicht mit einbezogen. Mit einem Maximalwert von 12% lässt das Arzneibuch für die Einsatzdrogen wesentlich höhere Feuchtigkeitsgehalte zu [PH.EUR. (2002c)]. Der Trocknungsverlust, und der damit verbundene Wassergehalt der Einsatzdrogen ist in allen Fällen drei bis viermal höher als in den Extrakten.

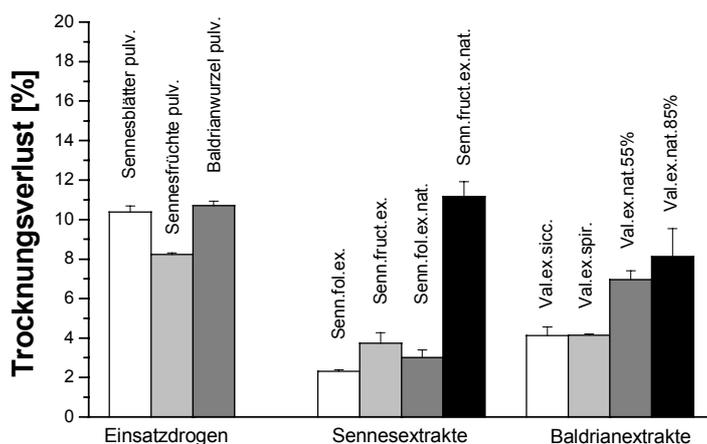


Abb. 132: Ausgangswerte der Trocknungsverluste der eingesetzten Drogen und Extrakte

Im folgenden wurden die Trocknungsverluste der Extrakte und der Einsatzdrogen für die unterschiedlichen klimatischen Bedingungen und Verpackungen ermittelt. Die Werte wurden nach drei Monaten Lagerung ermittelt, wobei dieser Wert auch später nicht weiter zunahm. Die zulässigen Höchstgrenzen sind in der graphischen Auswertung als unterbrochene Linie eingezeichnet.

Wie aus Abb. 133 ersichtlich wird, nimmt der Trocknungsverlust bei der Baldrianeinsatzdroge nicht gravierend zu. Selbst bei 40°C / 75% rF bei einer Verpackung in PE-Beuteln bleibt der Wert unter den erlaubten 12%. Ebenso verhält es sich mit Sennesblättern in PE-Weithalsflaschen und PE-Beuteln (Abb. 134).

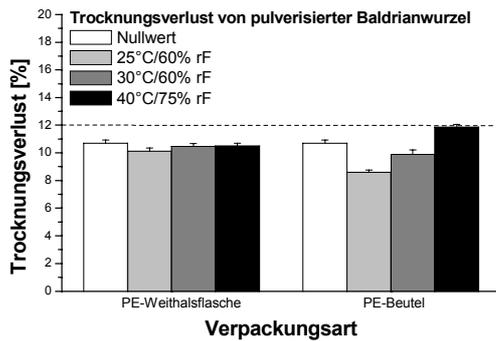


Abb. 133: Veränderung des Trocknungsverlustes der pulverisierten Baldrianwurzel in Abhängigkeit von Lagerbedingungen und Verpackung

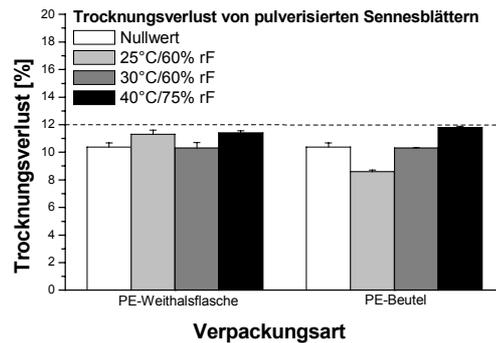


Abb. 134: Veränderung des Trocknungsverlustes der pulverisierten Sennesblätter in Abhängigkeit von Lagerbedingungen und Verpackung

Lediglich die Sennesfrüchte-Einsatzdroge ist feuchtigkeitsempfindlicher. Während die Verpackung in PE-Weithalsflaschen ausreichend ist, um einen Anstieg des Trocknungsverlustes zu vermeiden, nimmt der Trocknungsverlust der Droge in PE-Beuteln lagerungsabhängig zu (Abb. 135). Bei 40°C / 75% rF übersteigt der Wert sogar die zulässigen 12%. Mit ca. 8% hatte diese Einsatzdroge einen zu Anfang erheblich niedrigeren Trocknungsverlust. Die Zunahme der Feuchtigkeit ist möglicherweise auf die größere Oberfläche der Sennesfrüchte, bei geringerer Masse des zerkleinerten Materials zurückzuführen.

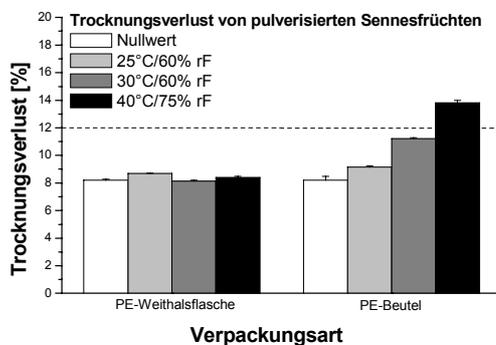


Abb. 135: Veränderung des Trocknungsverlustes der pulverisierten Sennesfrüchte in Abhängigkeit von Lagerbedingungen und Verpackung

Die Extrakte verhalten sich hinsichtlich der Feuchtigkeitzunahme anders als die Drogenmaterialien. Wie aus Abb. 136 für den methanolischen Extrakt ersichtlich, nimmt der Trocknungsverlust bei Lagerung bei 40°C / 75% rF für alle Verpackungen über die für Extrakte erlaubten 5% zu. Der Extrakt in PE-Beuteln überschreitet diesen Wert bereits bei 30°C / 60% rF. Der unverpackte Extrakt liegt bei allen Lagerungsbedingungen weit über der zulässigen Grenze.

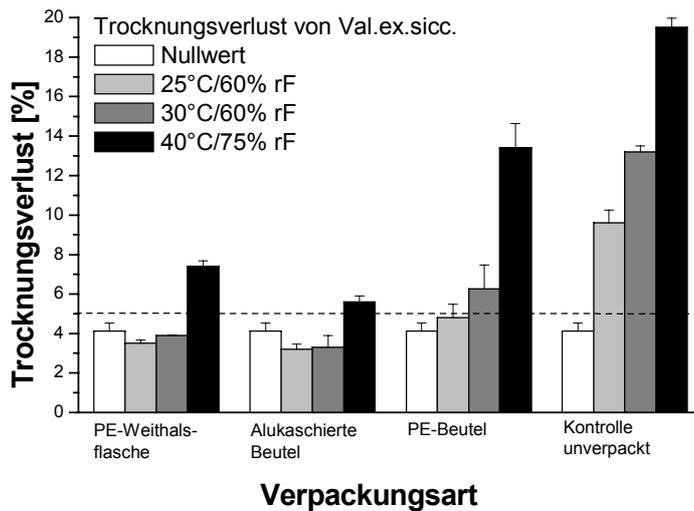


Abb. 136: Veränderung des Trocknungsverlustes des methanolischen Baldrianextraktes in Abhängigkeit von Lagerbedingungen und Verpackung

Ein nahezu identisches Bild bietet der ethanolische Baldrianextrakt (Abb. 137). Dieses Ergebnis ist besonders unter der Berücksichtigung der unter 3.5.2 erlangten Erkenntnisse zu diskutieren. Dort zeigten sich für den ethanolischen Extrakt bei Verpackung in PE-Weithalsflaschen und alukaschierten Beuteln größere sensorische Veränderungen, als für den methanolischen Extrakt. Die beobachtete Verklumpung geht scheinbar nicht in jedem Fall mit einer deutlichen Zunahme des Wassergehaltes einher. Umgekehrt führt die Zunahme des Trocknungsverlustes nicht zwangsläufig zu sensorischen Veränderungen im Extrakt.

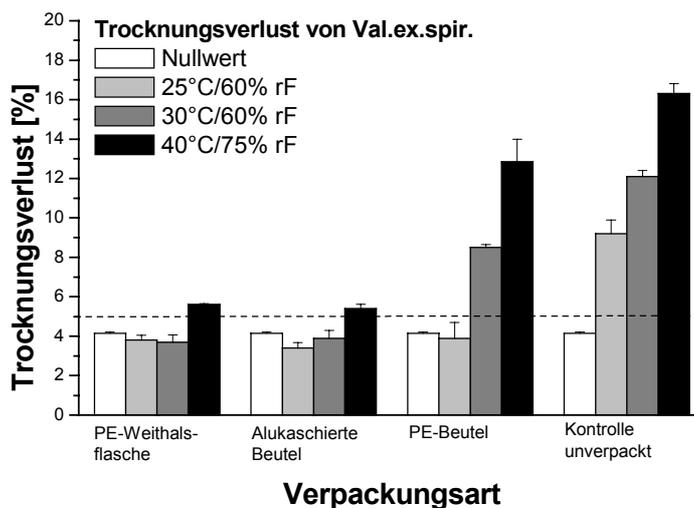


Abb. 137: Veränderung des Trocknungsverlustes des ethanolischen Baldrianextraktes in Abhängigkeit von Lagerbedingungen und Verpackung

Der in Abb. 138 ausgewertete Sennesblätterextrakt entspricht eher dem Bild, das man aus den sensorischen Beobachtungen gewinnen könnte. Sowohl der unverpackte, als auch der in PE-Beuteln verpackte Extrakt liegt unter allen klimatischen Bedingungen über der Zulässigkeitsgrenze. Demgegenüber bleiben die Extrakte in PE-Weithalsflaschen und alukaschierten Beuteln bei allen Lagerbedingungen innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen.

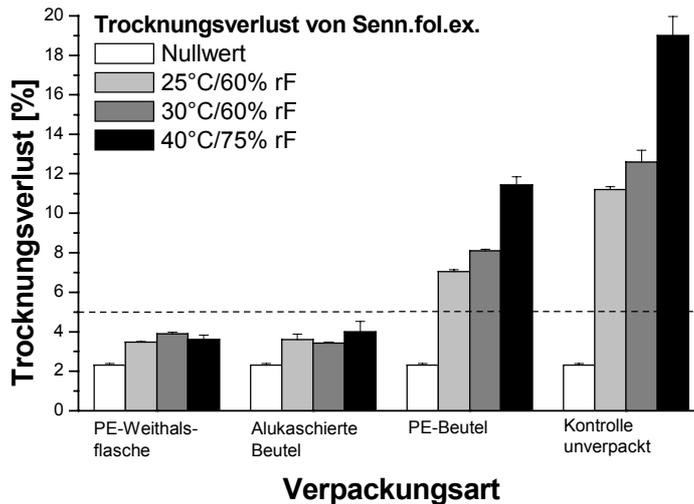


Abb. 138: Veränderung des Trocknungsverlustes des methanolischen Sennesblätterextraktes in Abhängigkeit von Lagerbedingungen und Verpackung

Ein nahezu identisches Bild zum Sennesblätterextrakt liefert die Ermittlung der Trocknungsverluste des Sennesfrüchteextraktes (Abb. 139). Dieser Extrakt erwies sich nach dem optischen Befund als der am wenigsten empfindlichste Extrakt. Besonderes Augenmerk verdient dabei die Tatsache, dass bei 25°C / 60% rF keine Verflüssigung im PE-Beutel eintrat. Dennoch ist der entsprechende Trocknungsverlust mit dem des Sennesblätterextraktes im PE-Beutel nahezu identisch. Damit bestätigt sich die oben aufgestellte These, dass aus einer Erhöhung des Trocknungsverlustes nicht zwangsläufig eine optisch auffallende sensorische Änderung resultiert. Scheinbar weisen die Extrakte je nach Zusammensetzung unterschiedliche Wasseradsorptions-grenzwerte auf, bevor sich der Wassergehalt als sensorisch wahrnehmbare Veränderung bemerkbar macht.

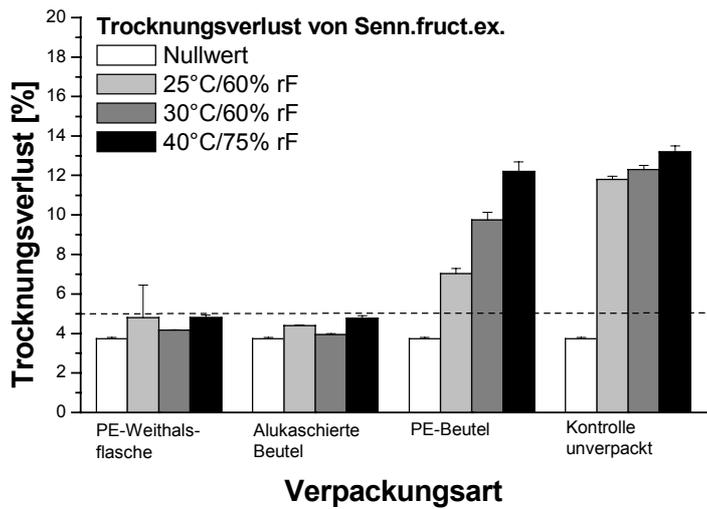


Abb. 139: Veränderung des Trocknungsverlustes des ethanolschen Sennesfrüchteextraktes in Abhängigkeit von Lagerbedingungen und Verpackung

Um einen möglichen Einfluss von Hilfsstoffen auf die Wasseraufnahme zu untersuchen, wurden Hilfsstoffe wie Lactose, Glucose und Aerosil unter den gleichen Bedingungen unverpackt eingelagert. Wie aus Abb. 140 ersichtlich ist, haben Lactose und Aerosil von vornherein nur einen geringen Wassergehalt. Der Trocknungsverlust steigt bei der Lagerung nur geringfügig an. Glucose weist einen höheren Wassergehalt auf, nimmt aber dafür keine zusätzliche Feuchtigkeit auf. Da der maximale Gehalt der Hilfsstoffe in den untersuchten Extrakten nur bei 20% liegt (siehe 5.1), dürfte die Ursache für die deutlichen Feuchtigkeitszunahmen bei den Extrakten nicht in den Hilfsstoffen zu finden sein. Ohne den Zusatz der Hilfsstoffe ist es in der Regel nicht möglich, Trockenextrakte herzustellen, die einen Trocknungsverlust unter 5% aufweisen.

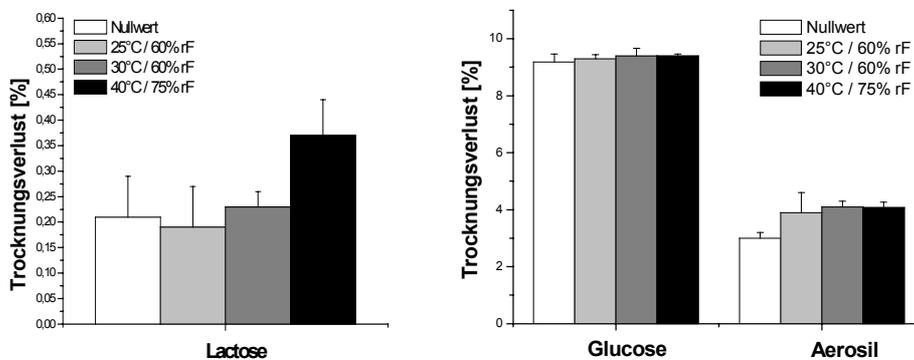


Abb. 140: Vergleich der Trocknungsverluste der eingesetzten Hilfsstoffe unter definierten Lagerbedingungen

3.5.3.2. Korngrößenverteilung

Die Veränderungen in den PE-Beuteln sind deutlich sichtbar, und korrelieren mit einer Zunahme des Trocknungsverlustes. Weniger gut beschreibbar sind schwache Veränderungen durch die Bildung von Klümpchen z.B. in alukaschierten Beuteln. Daher sollten durch Aufstellung der Korngrößenverteilung in Abhängigkeit von den Lagerbedingungen diese relativ geringen Veränderungen bestimmt werden. Wie bereits aus den vorherigen Betrachtungen klar wurde, stellt der Sennesfrüchteextrakt die am wenigsten empfindliche Zubereitung dar. Diese Tatsache spiegelt sich auch in der Korngrößenverteilung wieder. Sowohl die Extrakte in PE-Weithalsflaschen (Abb. 141) als auch die Extrakte in alukaschierten Beuteln (Abb. 142) wiesen keine ersichtlichen Hinweise auf Verklumpung auf. Die Verteilung der Korngrößen entsprach unter allen Lagerbedingungen in etwa der Verteilung des Ausgangsextraktes.

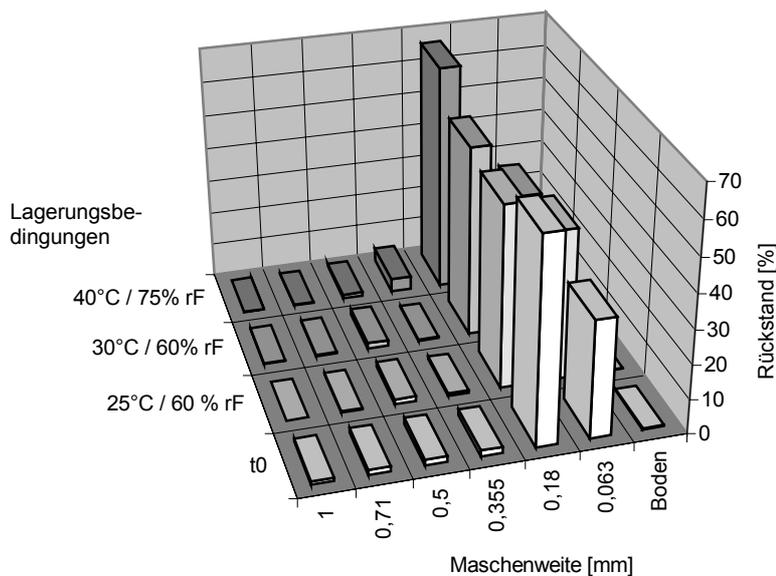


Abb. 141: Korngrößenverteilung bei in PE-Weithalsflaschen gelagertem ethanolischem Sennesfrüchteextrakt

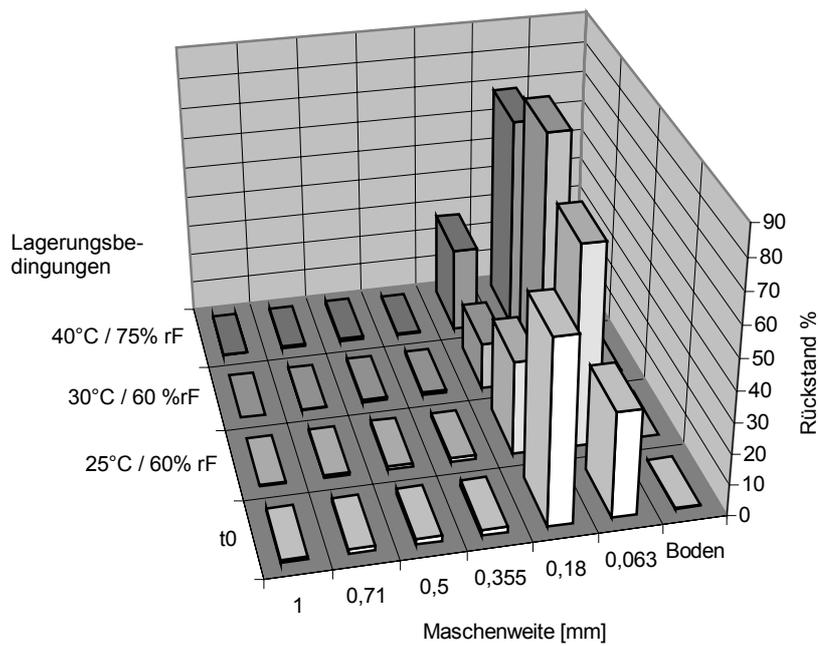


Abb. 142: Korngrößenverteilung bei in alukaschierten Beuteln gelagertem ethanolischem Sennesfrüchteextrakt

Geringfügige Unterschiede konnten allerdings für den Sennesblätterextrakt dokumentiert werden. In PE-Weithalsflaschen waren nach der Siebanalyse keine gravierenden Unterschiede in den vorherrschenden Korngrößen zu bemerken (Abb. 143). In alukaschierten Beuteln hingegen zeigte sich bei 40°C / 75% rF eine geringfügige Verklumpung. Dies spiegelt sich in einer Zunahme von Fraktionen größerer Korngrößen unter diesen Bedingungen wieder (Abb. 144). Bevorzugt trat diese Verklumpung entlang des eingeschweißten Druckleistenverschlusses des Beutels in Erscheinung.

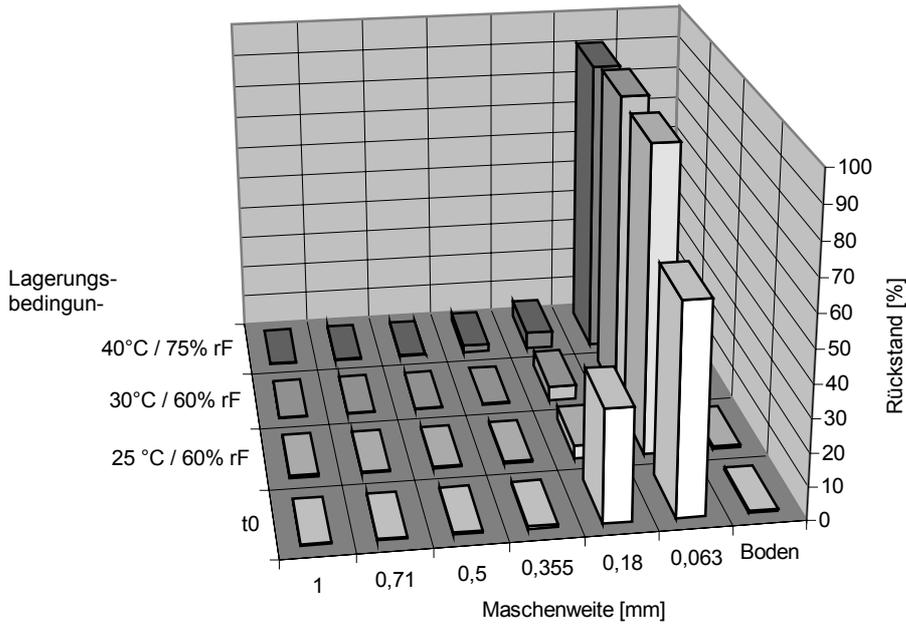


Abb. 143: Korngrößenverteilung bei in PE-Weithalsflaschen gelagertem methanolischem Sennesblättere-
xtrakt

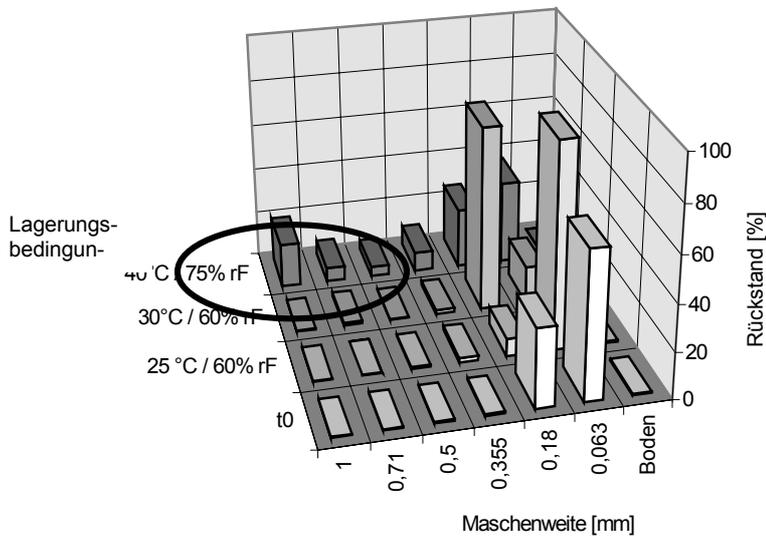


Abb. 144: Korngrößenverteilung bei in alukaschierten Beuteln gelagertem methanolischem Sennesblättere-
xtrakt (der umrandete Bereich zeigt die Verklumpung bei 40°C / 75% rF an)

Ein umgekehrtes Bild zeigt der methanolische Baldrianextrakt. Bei 40°C / 75% rF ist keine pulverförmige Beschaffenheit mehr gegeben (Abb. 145). Alle großen Klumpen verbleiben auf dem Sieb der größten Maschenweite ohne zu zerfallen. Dagegen bleiben die Pulvereigenschaften im alukaschierten Beutel unverändert erhalten (Abb. 146).

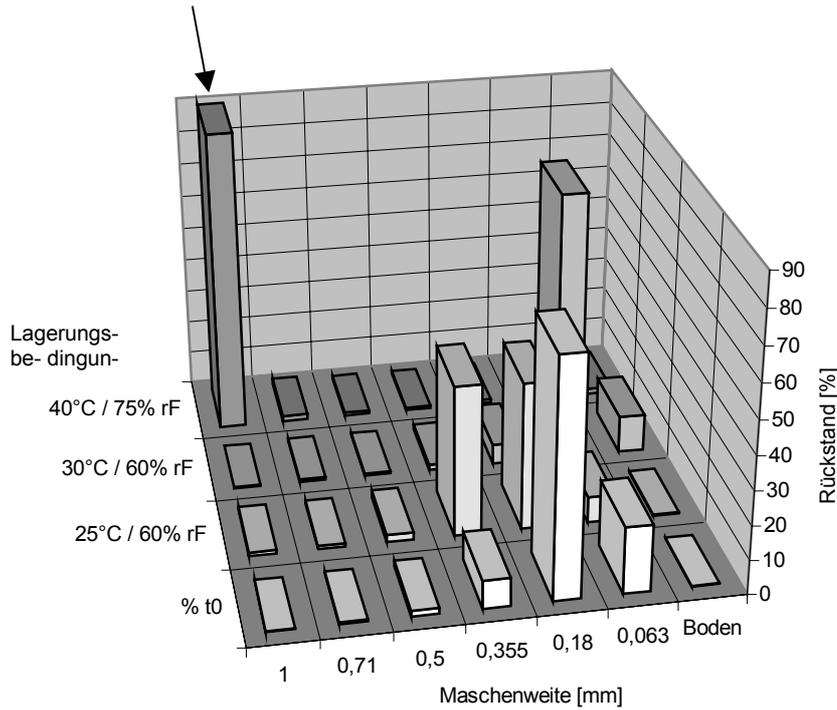


Abb. 145: Korngrößenverteilung bei in PE-Weithalsflaschen gelagertem methanolischem Baldrianextrakt (Pfeil: vollkommene Verklumpung bei 40°C / 75% rF)

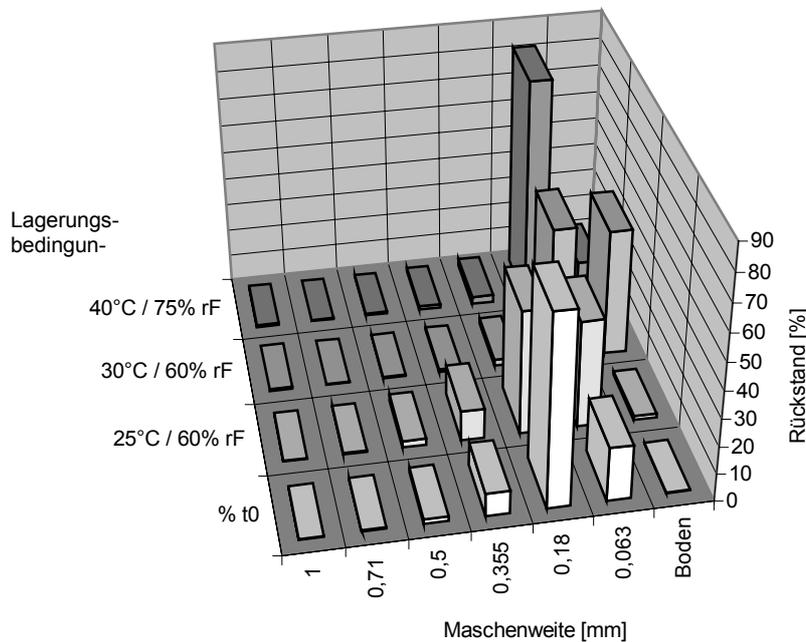


Abb. 146: Korngrößenverteilung bei in alukaschierten Beuteln gelagertem methanolischem Baldrianextrakt

Auch in den Siebanalysen bestätigte sich, dass der ethanolische Baldrianextrakt gegenüber den Lagerbedingungen am empfindlichsten reagierte. Er ist der einzige Extrakt, der bereits bei 30°C / 60% rF in PE-Weithalsflaschen starke Klumpenbildung zeigt, woraus bei

40°C / 75% rF eine völlige Erhärtung resultiert (Abb. 147). Auch in alukaschierten Beuteln zeigt sich bereits bei 30°C / 60% rF ein deutliches Verklumpen, das sich bei 40°C / 75% fast auf den gesamten Inhalt des Beutels ausdehnt (Abb. 148).

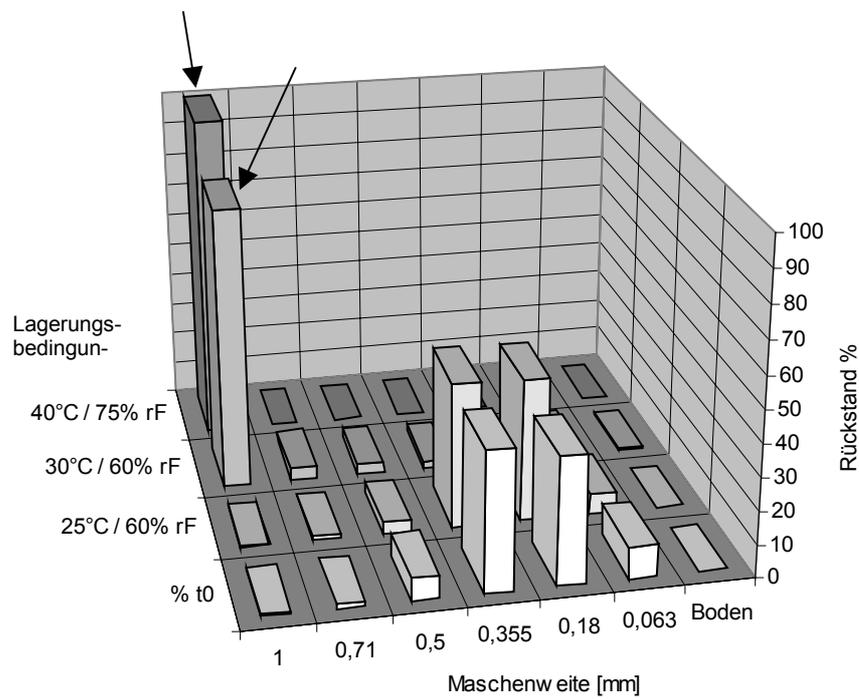


Abb. 147: Korngrößenverteilung bei in PE-Weithalsflaschen gelagertem ethanolischem Baldrianextrakt (Pfeile: vollkommene Verklumpung bei 30°C / 60% rF und 40°C / 75% rF)

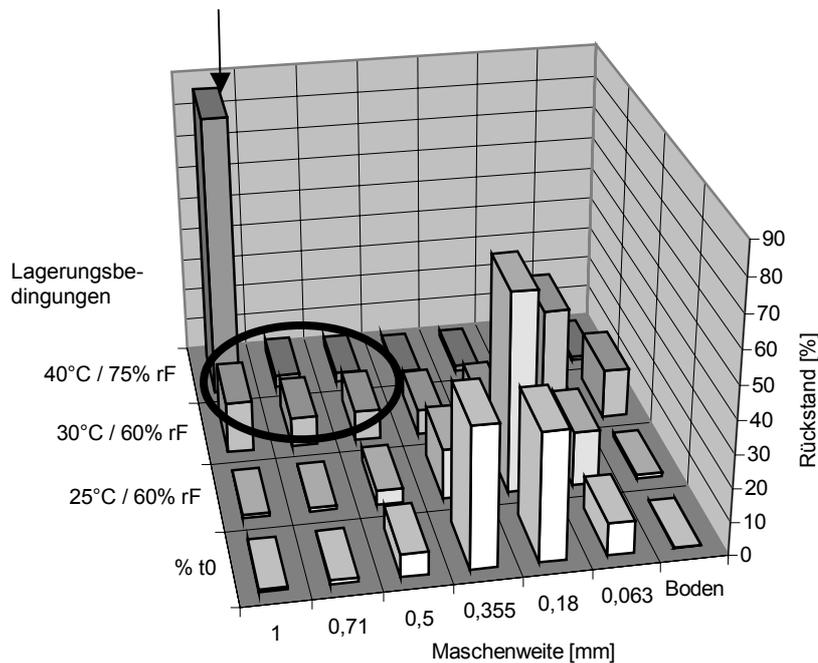


Abb. 148: Korngrößenverteilung bei in alukaschierten Beuteln gelagertem ethanolischem Baldrianextrakt (Pfeil/ Umrandung: Verklumpung bei 30°C / 60% rF und 40°C / 75% rF)

3.5.4. Veränderungen im Freisetzungverhalten

Bei der Probenaufbereitung für die chromatographische Analytik der einzelnen Proben konnten durch die Verflüssigung oder Erhärtung mancher Extrakte große Unterschiede hinsichtlich der Auflöse- und Suspensionsvorgänge beobachtet werden. Im Folgenden wurde geprüft, ob Veränderungen der Pulvereigenschaften zu Störungen der analytischen Untersuchungen, auf Grund von Unterschieden bei der Probenaufbereitung führen können. Als Messkriterium diente die Freisetzung charakteristischer Inhaltsstoffe. Dabei sollten Substanzen gewählt werden, die sich während der Stabilitätsuntersuchungen als relativ stabil erwiesen hatten, und somit die Gehaltsunterschiede in den unterschiedlich gelagerten Extrakten relativ gering waren. Als Beispiele wurden mit Sennesfrüchteextrakt der am wenigsten empfindliche, und mit ethanolischem Baldrianextrakt der empfindlichste Extrakt ausgewählt.

Zur Untersuchung der Sennesfrüchteextrakte wurde als Markersubstanz Rhein ausgewählt. Diese Substanz zeigte für alle Klimabedingungen und Verpackungen ähnliche Verläufe (siehe Abb. 116). Die Freisetzung wurde mittels Ultraschallextraktion durchgeführt und die prozentuale Entwicklung über die Zeit verglichen. Es wurden die ein Jahr bei 40°C / 75% rF gelagerten Proben untersucht, da diese die größten physikalischen Veränderungen gezeigt hatten. In Abb. 149 ist der Vergleich der einzelnen Verpackungen unter diesen Lagerbedingungen dargestellt. Es zeigte sich, dass alle Extrakte eine geringfügig langsamere Freisetzung

zung aufwiesen, die aber nach fünfminütiger Ultraschallbehandlung weitgehend abgeschlossen war. Eine Beeinträchtigung der Analytik durch ungenügende Extraktion ist für diese Proben nicht zu erwarten.

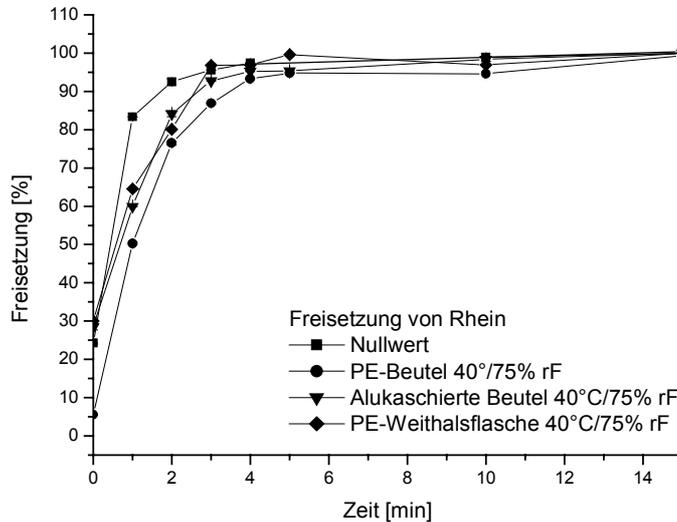


Abb. 149: Unterschiede im Freisetzungsverhalten von Rhein aus Sennesfrüchte-Trockenextrakt bei gleichen Einlagebedingungen in Abhängigkeit von der Verpackung

Da die Extrakte in PE-Beuteln die schlechteste Freisetzung zeigten, wurden auch die unter milderen Bedingungen gelagerten Extrakte in den PE-Beuteln untersucht (Abb. 150). Alle Extrakte in PE-Beuteln zeigten Aushärtungserscheinungen, konnten aber für die Untersuchungen in der Reibschale wieder pulverisiert werden. Dabei zeigte sich, dass der Extrakt, der unter 25°C / 60% rF gelagert wurde, die schlechteste Freisetzung zeigte. Nach 5 min Extraktionsdauer waren erst in etwa 90% der Inhaltsstoffe in das Medium freigesetzt worden. Um vollständige Extraktion zu bewirken, musste hier 10 min extrahiert werden. Dennoch ist im Rahmen der bei der Probenvorbereitung durchgeführten Methode nicht von Messwert-Schwankungen auf Grund der physikalischen Veränderung auszugehen.

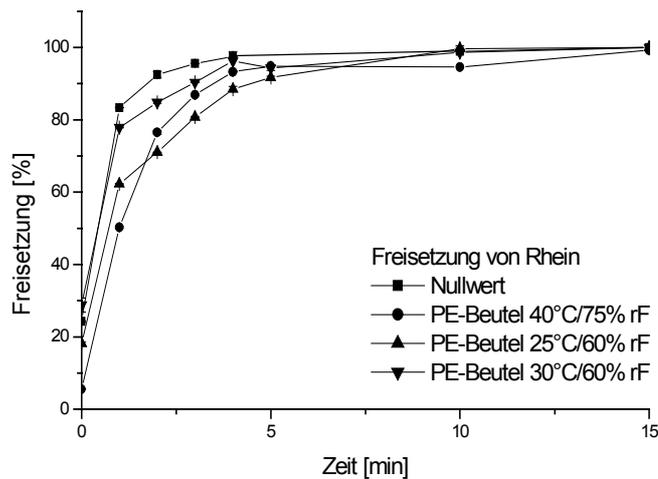


Abb. 150: Unterschiede im Freisetzungsverhalten von Rhein aus Sennesfrüchte-Trockenextrakt bei gleicher Verpackung in Abhängigkeit von den Einlagerungsbedingungen

Als Leitsubstanz für die Freisetzung der Baldrianextrakte wurde die Valerensäure herangezogen. Auch für diese Substanz waren während der Stabilitätsuntersuchung nur geringe Gehaltsunterschiede in Abhängigkeit von Verpackung und Lagerbedingungen festgestellt worden (siehe Abb. 42). Den Vergleich der Freisetzung aus Extrakten in den verschiedenen Verpackungen nach einer Lagerung bei 40°C / 75% rF zeigt Abb. 151. Obwohl die ethanolischen Baldrianextrakte sich in ihren physikalischen Eigenschaften stark verändert hatten (siehe 3.5.2) waren damit keine Probleme hinsichtlich ungenügender Extraktion in Verbindung zu bringen. Nach 5 Minuten war für alle Extrakten die Freisetzung abgeschlossen, so dass auch hier kein negativer Einfluss auf die Analysenwerte gefolgert werden kann. Die Extrakten in alukaschierten Beuteln und PE-Weithalsflaschen mussten beide auf Grund der Aushärtungs- und Verklumpungserscheinungen vor der Untersuchung in der Reibschale pulverisiert werden. Die schlechteste Freisetzung zeigte der ausgehärtete Extrakt in PE-Weithalsflaschen, der sich auch am schlechtesten zerkleinern ließ, und damit möglicherweise größere Partikel aufwies als der Extrakt in alukaschierten Beuteln. Dies könnte möglicherweise die langsamere Freisetzung erklären.

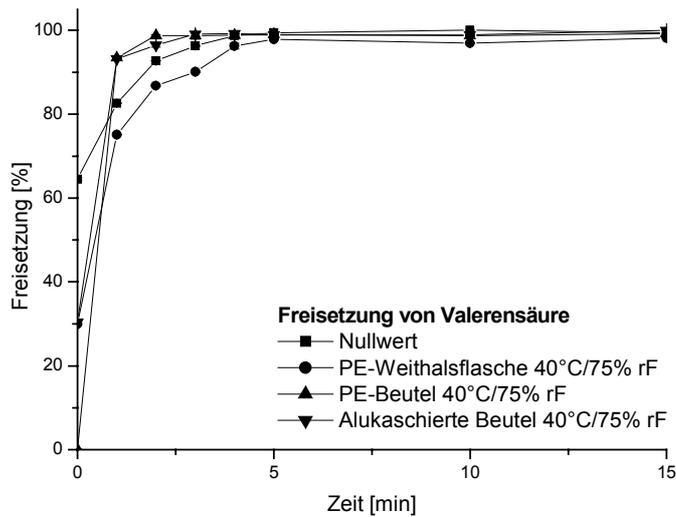


Abb. 151: Unterschiede im Freisetzungsverhalten von Valerensäure aus ethanolischem Baldrianextrakt bei gleichen Einlagerungsbedingungen in Abhängigkeit von der Verpackung

Interessant ist die Tatsache, dass der verflüssigte Extrakt in PE-Beuteln die beste Freisetzung zeigte. Daher wurden auch beim ethanolischen Baldrianextrakt die auf gleiche Weise verpackten Proben, die unter anderen Lagerbedingungen aufbewahrt wurden untersucht (Abb. 152). Dabei zeigte sich, dass sich eine Lagerung der Extrakte bei 30°C / 60% rF und 40°C / 75% rF, günstig auf die Freisetzung auswirkte. Diese Extrakte hatten sich vollkommen verflüssigt und gingen bei der Ultraschallbehandlung sofort in Lösung. Anders verhält sich der bei 25°C / 60% rF gelagerte Extrakt, bei dem die Änderungen der physikalischen Beschaffenheit weniger gravierend waren. Statt vollkommener Verflüssigung lag dieser Extrakt in einer zähflüssigen Konsistenz vor. Die Freisetzung wurde durch Suspensionsbildung erheblich langsamer. Dennoch kann die Freisetzung unter den Bedingungen der Probenaufbereitung nach 15 min als abgeschlossen betrachtet werden, so dass auch hier keine Schwankung der Messwerte zu erwarten war.

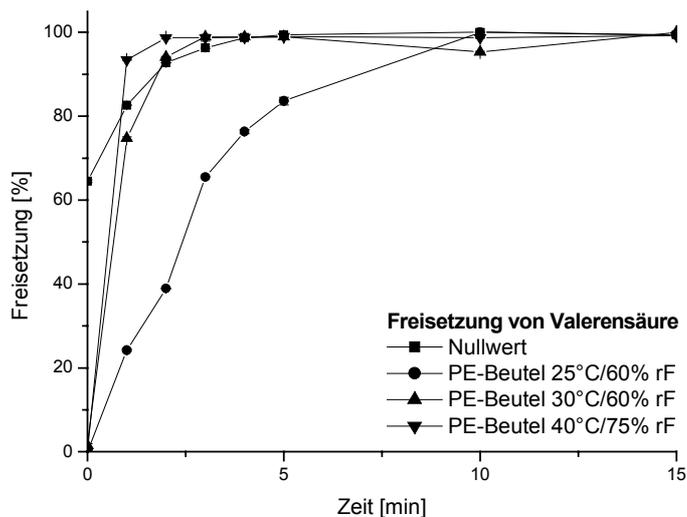


Abb. 152: Unterschiede im Freisetzungverhalten von Valerensäure aus ethanolischem Baldrianextrakt bei gleicher Verpackung in Abhängigkeit von den Einlagerungsbedingungen

Abschließend lässt sich feststellen, dass eine Verschlechterung im Freisetzungverhalten auf Grund dieser Untersuchungen nicht vom Ausmaß der physikalischen Extrakt-Veränderungen abhängt. Starke physikalische Veränderungen, wie z.B. Verflüssigung wirken sich sogar positiv auf das Freisetzungverhalten aus. Bei Extrakten, die Aushärtungserscheinungen zeigen, ist die Freisetzung abhängig von der Repulverisierung. Am ungünstigsten wirkten sich Veränderungen aus die zu einer zähen Konsistenz der Extrakte führen.

3.5.5. Zusammenfassung und Diskussion

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Extrakte auf Grund ihrer Hygroskopizität sehr empfindliche pflanzliche Produkte darstellen. Bei ungeeigneter Verpackung sind bereits nach kurzer Zeit maßgebliche Veränderungen in Erscheinungsbild und physikalischen Parametern die Folge. Aber auch durch die Verpackung in alukaschierten Beuteln oder PE-Weithalsflaschen können derartige Veränderungen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dort können derartige Veränderungen lediglich an der Oberfläche oder an gefährdeten Stellen (beispielsweise an der Verschlussnaht) auftreten. Solch geringfügige Veränderungen konnten durch die Korngrößenverteilung dokumentiert werden. Meist geht die Verflüssigung oder Erhärtung mit einer Erhöhung des Trocknungsverlustes einher. Daneben kann unter Umständen für unversehrt erscheinende Extrakte eine Erhöhung des Trocknungsverlustes beobachtet werden, die sich nicht in physikalischen Veränderungen bemerkbar macht. Das Auftreten von physikalischen Veränderungen geht ebenfalls mit Änderungen im Freisetzungverhalten einher. Es ist aber davon auszugehen, dass die Probenaufbereitung und die

Analysenergebnisse der Untersuchung chemischer Inhaltsstoffe dadurch nicht beeinflusst werden.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die Sicherung der Qualität von Arzneimitteln spielt die Gewährleistung der Stabilität der Inhaltsstoffe eine große Rolle. Dabei werden an pflanzliche Arzneimittel annähernd die gleichen Anforderungen gestellt wie an chemisch definierte Arzneistoffe. Auf Grund der komplexen Zusammensetzung eines Pflanzenextraktes treten bei der Stabilitätsanalytik derartiger Zubereitungen eine Reihe von Problemen auf, die die Einhaltung der vorgegebenen Kriterien erschweren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten am Beispiel ausgewählter Extrakte modellhaft Stabilitätsdaten ermittelt werden, um für die pharmazeutische Praxis relevante Hinweise über die Stabilität von Extrakten zu liefern.

Die ermittelten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- Die Ausgangsdrogen erwiesen sich bei gleichen Lagerbedingungen als wesentlich empfindlicher als die entsprechenden Extrakte. Die für die Droge gefundenen Abbaureaktionen spezifischer Inhaltsstoffe unterschieden sich zum Teil deutlich von den entsprechenden Vorgängen im Extrakt. Mögliche Ursachen dafür könnten der höhere Wassergehalt und die Aktivität von Enzymen in den Drogen sein.
- Für die Stabilitäts-Analytik von Baldriandroge und den daraus hergestellten Extrakten wurde eine HPLC Methode entwickelt, die mittelpolare und unpolare Inhaltsstoffe abdeckt. Die Trennung auf RP-18 Material erlaubt die Unterscheidung der Gruppe der Valerensäuren, der Valepotriate und der Lignane.
- Innerhalb der genannten Stoffgruppen wurden für die Baldrian-Einsatzdroge während der Lagerung drastische Abbauvorgänge beobachtet. Dabei konnte im HPLC-Fingerprint zum einen die Zunahme der Hydroxyvalerensäure aus dem Abbau der Acetoxyvalerensäure verfolgt werden. Daneben trat eine Zunahme zweier weiterer Abbauprodukte aus der Gruppe der Lignane in Erscheinung, die dem Pinoresinol und Hydroxypinoresinol zugeordnet werden konnten. Diese qualitativen Veränderungen waren auch mit dünnschichtchromatographischen Methoden nachzuweisen.
- Für die Berechnung von Haltbarkeitswerten sollte bei Baldrian nicht die Menge der Gesamtvalerensäuren betrachtet werden, da sich Edukt (Acetoxyvalerensäure) und Produkt (Hydroxyvalerensäure) quantitativ ausgleichen, und dadurch eine fälschlicherweise höhere Stabilität angenommen wird. Um genaue Aussagen zur Stabilität liefern zu können, empfiehlt sich daher am besten die Beobachtung der Hydroxyvalerensäure, da diese die empfindlichste Substanz darstellt.
- Im Vergleich zu der Ausgangsdroge zeigen die Baldrianextrakte keine Zunahme der Abbauprodukte aus dem Bereich der Lignane. Der Abbau der Acetoxyvalerensäure

kann aber auch für die Extrakte als Stabilitätskriterium genutzt werden. Die damit einhergehende Zunahme der Hydroxyvalerensäure ist umso stärker, je belastender die klimatischen Bedingungen und je schlechter die Verpackung ist.

- Ethanolische Baldrian-Extrakte erwiesen sich hinsichtlich erfassbarer chemischer Veränderungen stabiler als die methanolischen Baldrianextrakte. Betrachtet man allerdings nur die Veränderung der physikalischen Eigenschaften, so ist dieser Extrakt am empfindlichsten. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Extrakte erwiesen sich als nicht ausreichend sensitiv um die geringfügigen Veränderungen adäquat nachweisen zu können. Auch für die Extrakte führt die Betrachtung des Gehaltes an Gesamtvalerensäuren nicht zur korrekten Wiedergabe der Stabilität. Auch hier liefert die Beobachtung der Hydroxyvalerensäure genauere Aussagen.
- Für die Analytik der Sennesdrogen und Extrakte wurde eine bereits bestehende Methode genutzt. Bisher nicht zugeordnete Peaks, entsprechend den für die Stabilitätsanalytik interessanten Flavonoiden wurden als Isorhamnetin, Kämpferol und Quercetin und deren Glykoside identifiziert.
- Die Sennes-Einsatzdrogen zeigten wiederum Umwandlungen, die definierten Abbauwegen folgten. Sennoside, die sich als sehr empfindlich gegenüber Feuchte und Temperatur herausstellten, wurden zu Sennidinmonoglykosiden hydrolysiert. Daneben zeigte sich ein vermutlich enzymatischer Abbau des Rhein-8-glykosids zu Rhein. Die enthaltenen Flavonoidglykoside wurden ebenfalls zu den Aglyka hydrolysiert, können aber auf Grund der langsameren Degradation als etwas stabiler gegenüber äußeren Einflüsse betrachtet werden. Die Inhaltsstoffe in Sennesfrüchten wiesen die gleichen Veränderungen wie Sennesblätter auf, zeigten aber im Ausmaß der Degradation geringere Abbauraten als die entsprechenden Substanzen in Sennesblättern. Der vorgeschriebene Mindestgehalt an 1,8-Hydroxyanthracenderivaten konnte für Sennesblätter nur bei 25°C / 60% rF, für Sennesfrüchte bei 25°C und 30°C / 60% rF eingehalten werden.
- Bei entsprechend guter Verpackung (PE-Weithalsflaschen und alukaschierte Beutel) waren die Sennoside in den Sennesextrakten wesentlich stabiler. Die Abbaureaktionen, die bei unverpackten und schlecht geschützten Extrakten auftraten, folgten wiederum nicht denselben Degradationswegen wie in der Einsatzdroge. Es konnte kein Anstieg von Antrachinonaglyka, Sennidinmonoglykosiden oder Flavonaglyka beobachtet werden. Auch Rhein-8-glykosid verhielt sich bei dieser Verpackung wesentlich stabiler. Lediglich die Sennoside und Flavonglykoside zeigten Gehaltsverluste.
- Bei der Arzneibuch-Bestimmung des Gehaltes an 1,8-Hydroxyanthracenderivaten wird bei der Borntraeger-Reaktion das Rhein-8-glykosid mit einbezogen. Da sich für

Droge und Extrakte unterschiedliche Stabilitäten dieser Verbindung zeigten, muss davon ausgegangen werden, dass bei dieser Gruppenreaktion die Beurteilung der Stabilität nicht wahrheitsgemäß interpretiert wird. Genauere Aussagen liefert unter alleiniger Betrachtung der Sennoside die Untersuchung mittels HPLC.

- Die selbst hergestellten nativen Extrakte wiesen auf Grund ihres hohen Restwassergehaltes eine verminderte chemische und physikalische Stabilität im Vergleich zu den handelsüblichen Extrakten auf. Das Ausmaß der Degradationsprozesse lag zwischen dem der Einsatzdroge und des handelsüblichen Extrakt. Die Degradation entsprach den bereits für die handelsüblichen Extrakte gefundenen Abbauprozessen.
- Hinsichtlich der Qualitätsanforderungen an Senneszubereitungen konnten unter den eingesetzten Lagerbedingungen nur die in alukaschierten Beuteln und PE-Weithalsflaschen gelagerten handelsüblichen Extrakte über den gesamten Einlagerungszeitraum den Vorgaben der Ph. Eur. gerecht werden.
- Unverpackte und nicht sachgerecht verpackte Extrakte zeigten unter allen Lagerbedingungen eine rasch eintretende Verflüssigung oder Erhärtung. Auch bei besserer Verpackung war bei empfindlichen Extrakten nach sechsmonatiger Lagerung ein Verklumpen zu erkennen. Am wenigsten empfindlich zeigte sich der Sennesfrüchteextrakt des Handels, am empfindlichsten der ethanolische Baldrianextrakt.
- Die Einsatzdrogen zeigten unter allen Lagerbedingungen einen arzneibuchkonformen Trocknungsverlust, der nur geringfügig zunahm. Bei den Extrakten hingegen waren zum Teil deutliche Zunahmen über die zugelassenen Werte beobachtet worden. Bei den empfindlichen Extrakten war dies auch bei guter Verpackung zu beobachten. Eine Zunahme des Trocknungsverlustes korrelierte aber nicht zwangsläufig mit einer Änderung der physikalischen Eigenschaften oder der chemischen Zusammensetzung.
- Zur Verdeutlichung von Verklumpungs- und Aushärtungserscheinungen konnte die Ermittlung der Korngrößenverteilung herangezogen werden. Auch das Auftreten geringfügiger Veränderungen konnte damit erfasst werden.
- Die Zunahme der Feuchtigkeit der Extrakte hatte Einfluss auf die Freisetzungsrates der Inhaltsstoffe. Bei Verflüssigung der Extrakte konnte ein verbessertes Freisetzungsverhalten beobachtet werden, bei Erhärtung ist die Freisetzung von der Repulverisierung abhängig. Die Veränderungen haben aber keinen Einfluss auf die Probenvorbereitung der Analytik.

Zusammenfassend ist zu festzustellen, dass für die Stabilitätsanalytik von pflanzlichen Extrakten viele Parameter eine Rolle spielen. Um das Verhalten der Extrakte unter den Ein-

flüssen der Umwelt beurteilen und steuern zu können, ist die Kenntnis dieser Einflussfaktoren von vorrangigem Interesse. Das abgebildete Fließschema soll einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Einflussfaktoren auf die Extrakt-Stabilität geben (Abb. 153). Daneben sind die für die Stabilitäts-Analytik der Inhaltsstoffe wichtigsten Parameter aufgeführt.

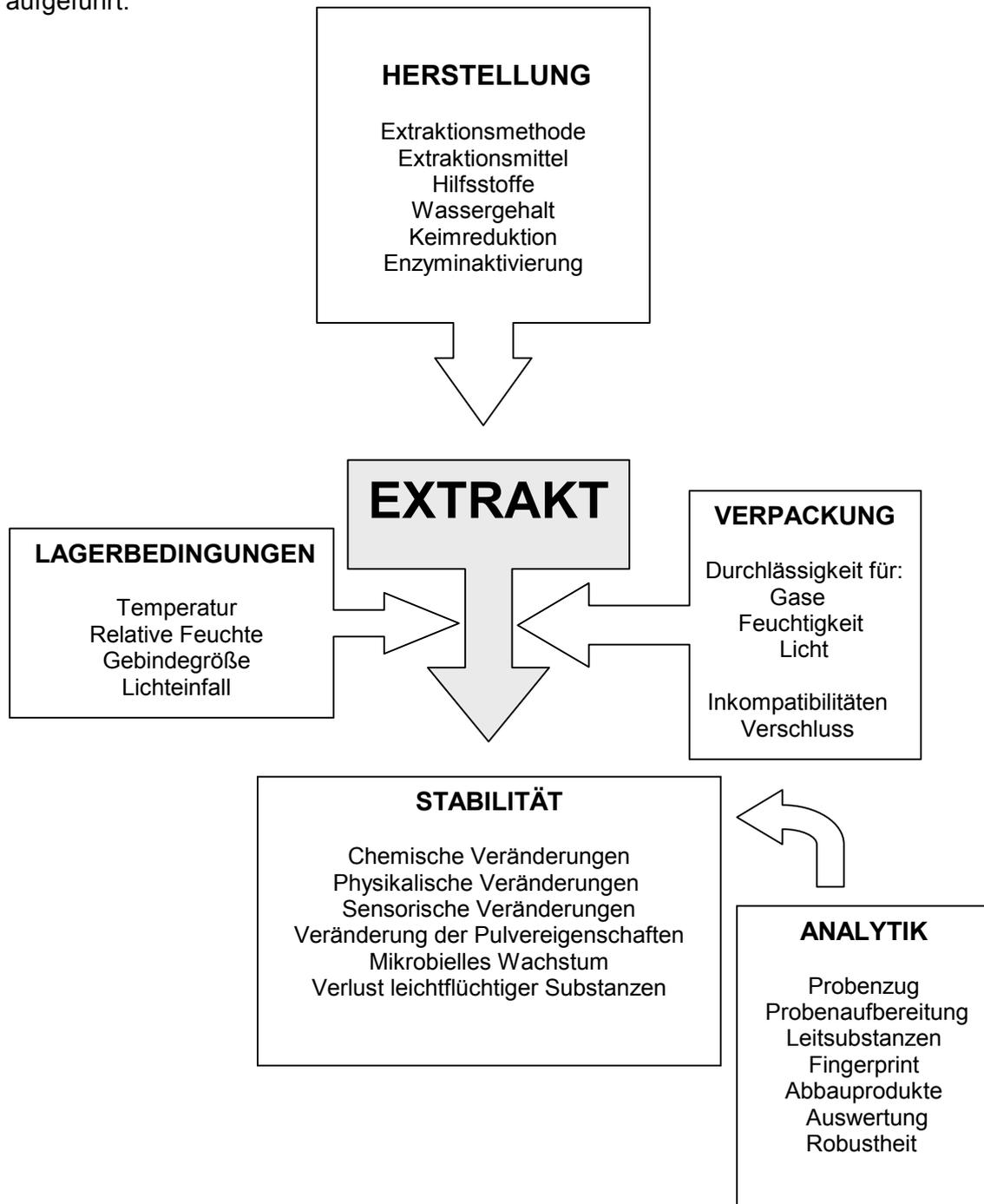


Abb. 153: Stabilität pflanzlicher Extrakte: mögliche Einflussparameter

5. Materialien und Methoden

5.1. Untersuchungsmaterial

5.1.1. Sennesdrogen und – extrakte

Die industriell hergestellten Extrakte und das dazu gehörende Drogenerzeugnis- material wurden von der *Fa. Finzelberg*, Andernach zur Verfügung gestellt:

Trockenextrakt aus Sennesblättern (Extr.Sennae e fol.sicc.) Aus- Ch.-B.: 01121159
zugsmittel: primär Methanol 100%, sekundär Methanol 60 % (V/V)

Beigemengter Hilfsstoff: Glucosesirup

Trockenextrakt aus Sennesfrüchten (Extr.Sennae e fruct.spir.sicc.) Ch.-B.:01220113
Auszugsmittel: Ethanol 60 %; Keine Hilfsstoffe

Folia Sennae pulv. Ch.-B.: 01110056

Fructus Sennae acutifoliae conc. Ch.-B.: 01110328

Das Drogenmaterial zur Isolierung der Abbauprodukte sowie zur Erstellung der nativen e- thanolischen Extrakte wurde von der *Fa. Caesar & Lorenz GmbH*, Hilden bezogen:

Folia Sennae Tinnevelly tot. Ch.-B.: 10140251

Sennae fructus pulv. Ch.-B.: 24768512

5.1.2. Baldriandroge und – extrakte

Die industriell hergestellten Extrakte und die entsprechenden Einsatzdrogen wurden von der *Fa. Finzelberg*, Andernach zur Verfügung gestellt:

Trockenextrakt aus Baldrianwurzeln (Extr. Valerianae e rad. sicc.) Ch.-B.:01120382

Auszugsmittel: Methanol 45% (V/V). 80% Nativer Extrakt.

Beigemengte Hilfsstoffe: hochdisperses Siliziumdioxid, Lactose-
Monohydrat

Trockenextrakt aus Baldrianwurzeln DAB 1999

(Extr. Valerianae e rad. spir. sicc.) Ch.-B.:01120804

Auszugsmittel: Ethanol 70% (V/V). 80% Nativer Extrakt

Beigemengte Hilfsstoffe: hochdisperses Siliziumdioxid, Glucosesirup

Radix Valerianae	Ch.-B.:01110077
	Ch.-B.:011220565

Das Drogenmaterial zur Isolierung der Abbauprodukte und Lignane, sowie zur Erstellung der nativen ethanolischen Extrakte wurde von der *Fa. Caesar & Lorenz GmbH*, Hilden bezogen.

Radix Valerianae concisus	Ch.-B.:03970291
Radix Valerianae pulv. gross.	Ch.-B.:22644282

5.1.3. Verpackungsmaterial

Die von der *Fa. Finzelberg*, Andernach zur Verfügung gestellten Extrakte, wurden dort bereits portioniert und in zwei verschiedenen Verpackungen zur Verfügung gestellt:

alukaschierte PE Beutel 11 x 13 cm, verschweißt, Inhalt ca. 40 g Extrakt

glasklare PE-Beutel mit Druckleistenverschluss 6 x 9,5 cm, Inhalt ca. 20 g Extrakt

Ebenfalls zur Verfügung stehender unportionierter Extrakt wurde in 100 g Portionen pro Klimazone in PE-Weithalsflaschen (Rotilabo Weithals-Vierkantflaschen 100 ml HDPE, *Fa. Roth*, Karlsruhe) abgefüllt. Daneben wurden die Extrakte lose zu 50 g Portionen pro Klimazone unverpackt in 50 ml Bechergläser gefüllt (=Kontrolle unverpackt). Die selbst hergestellten nativen Extrakte wurden in vier Portionen auf 50 g PE-Weithalsflaschen, *Fa. Roth*, Karlsruhe aufgeteilt. Die Einsatzdrogen wurden zu je 100 g pro Klimazone in PE-Weithalsflaschen, *Fa. Roth*, Karlsruhe abgefüllt. Für die Beobachtung des Trocknungsverlustes wurden daneben noch je 30g Einsatzdroge in PE-Beutel abgefüllt (Rotilabo-Probenbeutel, 5 x 8 cm, glasklar, mit Druckleistenverschluss, *Fa. Roth*).

5.2. Geräte

HPLC-Anlage 1:	Pumpen Waters 515, <i>Fa. Waters</i> , Eschborn
	Autosampler Waters 717 plus, <i>Fa. Waters</i> , Eschborn
	Diodenarraydetektor 545 V, <i>Fa. Biotek</i> , Neufahrn
	Säulenofen STH 585, <i>Fa. Gynothek</i> , Germering

HPLC-Anlage 2:	Pumpen Kontron 522, <i>Fa. Biotek</i> , Neufahrn Autosampler Kontron 565, <i>Fa. Biotek</i> , Neufahrn UV-Detektor Waters 486, <i>Fa. Waters</i> , Eschborn Säulenofen Jetstream 2plus Steuer- und Auswertungssoftware für beide Anlagen über KROMA System 2000
Zerkleinerung:	Retsch Mühle, <i>Fa. Retsch</i> , Haan Ultra Turrax T 50, <i>Fa. Janke & Kunzel</i> , Staufen
LC-Anlagen:	Pumpen, Peristaltic Pump P-1, <i>Fa. Pharmacia</i> , Schweden Fraktionskollektor Frac-300, <i>Fa. Pharmacia</i> , Schweden UV-Detektor, 2138 Uvicord S, <i>Fa. LKD</i> Schreiber, Servogor 102, <i>Fa. Kipp & Zonen</i> , Delft
Zentrifuge:	Hermle Z364, <i>Fa. Kontron (Biotek)</i> , Neufahrn
Extrakterstellung:	Ultraschallbad, Sonorex super RK225 K, <i>Fa. Bandelin electronics</i> , Berlin Schüttler, KS, <i>Fa. Edmund Bühler</i> , Tübingen
Gefriertrocknung:	P 10, <i>Fa. Dieter Piatkowski Forschungsgeräte</i> , München
Wasseraufbereitung:	Milli Q UF plus, <i>Fa. Millipore</i> , Eschborn
Trockenschränke:	BT 5042, <i>Fa. Heraeus electronics</i> (100° Bedingungen) U 40, <i>Fa. Memmet</i> , Schwabach (70°C, 30°C und 40 °C Bedingungen)
Hygrometer:	Digital Thermo-Hygro, <i>Fa. Oregon scientific</i>
Luftbefeuchter:	Ultraschallbefeuchter Aquastar NT, <i>Fa. Burg/ Honeywell inc.</i> Verdunstungsbefeuchter LW 44, <i>Fa. Venta</i> , Hünenberg (CH)

5.3. Lösungsmittel und Reagenzien

Fließmittel:	Acetonitril HPLC-Qualität , <i>Fa. Baker</i> ionisiertes Wasser aus Millipore Reinstwasseranlage Phosphorsäure 85% p.a. , <i>Fa. Merck</i>
Extraktionsmittel:	Methanol p.a., <i>Fa. Baker</i> Ethanol p.a., <i>Fa. Baker</i> Hexan reinst, <i>Fa. Merck</i> Ethylacetat p.a., <i>Fa. Merck</i>
NMR-Lösungsmittel :	Methanol-d4 99,9%, <i>Fa. Deutero</i> , Kastellaun Aceton-d6 99,8%, <i>Fa. Deutero</i> , Kastellaun
Referenzsubstanzen:	Sennosid B, Sennosid A, Rhein ,Aloe-Emodin, IsorhamnetinSennidine A+B, <i>Fa. Roth</i> , Karlsruhe Rhein-8-Glykosid, die Sennidinglykoside A+B, Sennosid A1, Sennosid C, Sennosid D und Sennosid D1 wurden von der <i>Fa. Madaus</i> zur Verfügung gestellt Die Valerensäure und ein valepotriatreicher Standardextrakt wurden von der <i>Fa. Finzelberg</i> , Andernach zur Verfügung gestellt

5.4. Allgemeine Arbeitsmethoden

5.4.1. Lagerbedingungen

5.4.1.1. 25°C/60% rF

Für die Lagerung bei $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ stand ein klimatisierter Raum zur Verfügung, der durch Anschluß an das zentrale Heiz-Lüftungsnetz der Universität Regensburg bei konstanter Temperatur gehalten wurde. Zur Erzeugung der benötigten Luftfeuchte von $60\% \text{ rF} \pm 5\%$ wurde ein dauerhaft betriebener Ultraschallbefeuchter und zusätzlich zwei nach Bedarf eingesetzte Verdunstungsbefeuchter eingesetzt. Die Einhaltung konstanter Bedingungen wurde über ein Thermohygrometer bestimmt (siehe Anhang 6.3).

5.4.1.2. 30°C/60% rF bzw. 40°C/75% rF

Für die Klimazonen bei 30°C und 40°C wurden die Proben in einem Exsiccator (Duran® Glasexsiccator, 30 cm Durchmesser, *Fa. Roth*, Karlsruhe mit perforiertem Metalleinsatz, *Fa. Roth*, Karlsruhe) eingelagert, der sich in einem Trockenschrank der geforderten Temperatur befand. Zur Einstellung der entsprechenden relativen Feuchte wurden 150ml Hygrostatlösungen aus gesättigten Salzlösungen in einer Kristallisierschale (Durchmesser 14cm) am Boden des Exsiccators aufgestellt. Die Auswahl der Salzlösungen erfolgte nach Testversuchen einiger in der Literatur beschriebener Salze [MAHAINI (1986), RABACH (1980)]. Für die Erzeugung von $60 \pm 5\%$ rF erwies sich gesättigte $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (1000g in 500ml heiß gelöst), für $75 \pm 5\%$ rF gesättigte NaNO_3 -Lösung (1000g in 1000ml heiß gelöst) als geeignet. Es war darauf zu achten, dass die Lösungen an einigen Stellen Salzkristalle zeigten. Die Einstellung konstanter Bedingungen eines frisch beschickten Exsiccators wurde nach 4 Tagen erlangt (Abb. 154). Da der Probenzug ein Öffnen des Exsiccators erfordert und damit die konstanten Bedingungen beeinflusst werden, wurde der Einfluss des Öffnens auf die relative Feuchte ermittelt. Die Messungen ergaben, dass bereits nach wenigen Stunden wieder die geforderten Bedingungen vorherrschten, und dieser Effekt bei den weit auseinanderliegenden Probennahmezeitpunkten zu vernachlässigen war (Abb. 155). Die Einhaltung konstanter Bedingungen über die Lagerzeit wurde über ein im Exsiccator befindliches Thermohygrometer bestimmt (siehe Anhang 6.3).

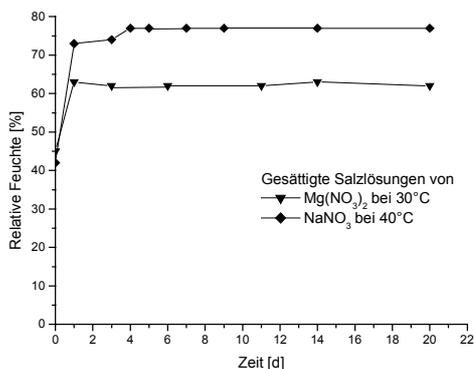


Abb. 154: Dauer bis zur Einstellung konstanter Luftfeuchte im Exsiccator

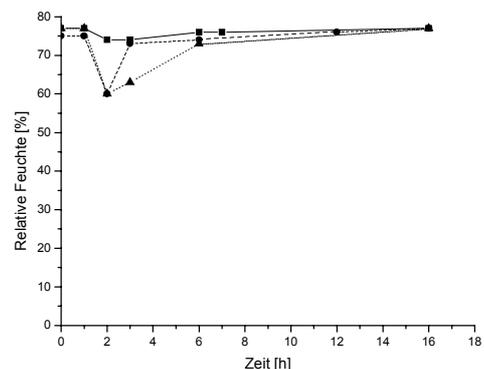


Abb. 155: Beeinflussung der Luftfeuchte nach dem Öffnen des Exsiccators mit 75% rF

5.4.2. Zerkleinerung des Drogenmaterials

Die Einsatzdrogen wurden vor der Einlagerung mittels Schneidemühle pulverisiert. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Mühle beim Schneidevorgang nicht zu stark erhitzte um vorzeitige Abbaureaktionen oder ein Verklumpen zu verhindern. Durch den Mahleinsatz definierter Maschenweite der Mühle konnten größere Bruchstücke wie z.B. Stängelreste oder Steine zurückgehalten werden.

5.4.3. Extraktherstellung

5.4.3.1. *Nativer ethanolischer Sennesblätterextrakt*

Der native ethanolische Sennesblätterextrakt (Senn.fol.ex.nat.) wurde durch Wirbelextraktion mit dem Ultra-Turrax gewonnen. Dazu wurden 1 kg Sennesblätter pulverisiert und mit 3 l Ethanol 80% p.a. versetzt, und die Mischung unter Kühlung für 1 h bei 6000 U/min gerührt. Der Extrakt wurde über eine Glasfaserfritte filtriert. Anschließend wurde der Drogenrückstand ein zweites Mal in gleicher Weise wie oben dargestellt extrahiert. Das Extraktionsmittel der vereinigten Filtrate wurde anschließend am Rotationsverdampfer bei 40°C und 130 mbar Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 112 g eines dunkelbraunen Trockenextraktes. DEV= 9:1 (11,2%).

5.4.3.2. *Nativer Sennesfrüchteextrakt*

Die Extraktion der Sennesfrüchte erfolgte durch Perkolation mit Methanol 100% (Senn.fol.ex.nat.). Dazu wurden 500 g pulverisierter Sennesfrüchte mit dem Extraktionsmittel durchfeuchtet und in ein Perkulationsrohr mit Filterwatte gefüllt. Anschließend wurde mit 3 l Extraktionsmittel mit einer Geschwindigkeit von ca 3,5 ml/min perkoliert. Das Perkolat wurde bei 40°C und 200mbar Druck zur öligen Konsistenz einrotiert und anschließend in Wasser suspendiert. Die endgültige Trocknung erfolgte über Gefriertrocknung. Als Ausbeute wurden 72 g eines schwarzbraunen Trockenextraktes erhalten. DEV = 7:1 (14,4%)

5.4.3.3. *Native Baldrianextrakte*

Die nativen Baldrianextrakte wurden mittels Perkolation mit 55% (Val.ex.nat 55%) bzw. 85% (Val.ex.nat. 85%) Ethanol hergestellt. Dazu wurden jeweils 500g pulverisierte Droge mit dem Extraktionsmittel durchfeuchtet und in ein Perkulationsrohr gefüllt. Während 5 Tagen wurde mit jeweils 2 l Extraktionsmittel eluiert. Den Extrakten wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C das Extraktionsmittel bis zur öligen Konsistenz entzogen. Nach Suspendierung in Wasser wurden die Extrakte gefriergetrocknet. Für die Perkolation mit 85% Ethanol ergab sich eine Ausbeute von 95 g braunem Trockenextrakt (DEV = 5,1:1 (18,7%)). Die Extraktion mit 45%

Ethanol ergab einen Dickextrakt der Masse 100 g (DEV = 5:1 (20%)). Eine vollständige Trocknung war bei diesem Extrakt nicht möglich.

5.4.4. Probenvorbereitung

5.4.4.1. Sennesblätter, -früchte und -extrakte

Für die Herstellung der Proben der Einsatzdrogen wurden 2,00 g pulverisierter Droge in einem verschließbaren 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20,0 ml Methanol 60% (Sennesblätter) bzw. Ethanol 60% (Sennesfrüchte) versetzt, und für 5 min im Ultraschallbad suspendiert. Nach Zugabe von weiteren 20,0 ml Extraktionsmittel wurden die Proben für 1 h unter ständigem Schütteln extrahiert. Diese Lösung wurde über einen Papierfilter (S&S Faltenfilter 125 mm, *Fa. Schleicher & Schüll*, Dassel) in einen 100,0 ml Meßkolben filtriert. Nach zweimaligem Nachspülen mit je 5,0 ml des Extraktionsmittels wurde die Lösung mit dem Extraktionsmittel zu 100,0 ml aufgefüllt.

Zur Erstellung der Proben für die handelsüblichen und nativen Extrakte musste darauf geachtet werden, dass die degradierten Extrakte vor der Einwaage wenn nötig fein vermahlen oder wenn nicht möglich zumindest grob zerkleinert wurden. 1,00 g pulverisierter Extrakt wurde in einem verschließbaren Erlenmeyerkolben mit 16,0 ml Wasser versetzt, und für 5 min unter Ultraschall suspendiert. Die Suspension wurde mit 24,0 ml Methanol (Sennesblättereextrakte) bzw. 24,0 ml Ethanol (Sennesfrüchteextrakte) versetzt und für 1 h unter ständigem Schütteln extrahiert. Diese Lösung wurde über einen Papierfilter (S&S Faltenfilter 125 mm, *Fa. Schleicher & Schüll*, Dassel) in einen 100,0 ml Messkolben filtriert. Nach zweimaligem Nachspülen mit je 5,0 ml des Extraktionsmittels wurde die Lösung mit dem Extraktionsmittel zu 100,0 ml aufgefüllt. Zur Abtrennung feinsten Partikel wurden 1,0 ml Lösung über einen 0,2 µm Nylonfilter (Rotilabo-Spritzenfilter, *Fa. Roth*, Karlsruhe) in die Probengefäße filtriert, wobei die ersten 0,5 ml verworfen wurden.

5.4.4.2. Baldrianwurzel und -extrakte

2,00 g pulverisierter Baldrianwurzel bzw. 1,00 g pulverisierter oder ,wenn nicht anders möglich grob zerkleinerter, Extrakt wurden in einem verschließbaren Erlenmeyerkolben mit 40,0 ml Methanol 70% versetzt und für 15 min bei 30°C unter Ultraschallbehandlung extrahiert. Die erhaltene Suspension wurde in einen 100,0 ml Messkolben überführt und zu 100,0 ml mit Extraktionsmittel aufgefüllt. Diese Lösung wurde die 4000 U/min für 10 min zentrifugiert und anschließend abdekantiert.

Zur Abtrennung feinsten Partikel wurden 1,0 ml Lösung der Extrakte über einen 0,2 µm Nylonfilter (Rotilabo-Spritzenfilter, *Fa. Roth*, Karlsruhe) in die Probengefäße filtriert, wobei die

ersten 0,5 ml verworfen wurden. Die Extrakte aus den Einsatzdrogen wurden unfiltriert verwendet.

5.5. Analytische Methoden

5.5.1. Bestimmung des Trocknungsverlustes

Der Trocknungsverlust wurde nach den entsprechenden Vorschriften der Ph. Eur. 2002 zu den einzelnen Drogen und Extrakten durchgeführt:

1,000 g pulverisierter Droge (355) wurde 2 h in einem zuvor getrockneten und gewogenen Wägegläschen bei 100 bis 105°C erhitzt. Nach dem Abkühlen in einem Exsiccator wurde der Massenverlust durch Wiegen ermittelt und als Prozentualer Wert in Bezug zur Einwaage (m/m) ermittelt [PH.EUR (2002c)]

0,500 g Extrakt wurde 3 h in einem zuvor getrockneten und gewogenen Wägegläschen bei 100 bis 105°C erhitzt. Nach dem Abkühlen im Exsiccator über Silicagel wurde der Masseverlust durch Wiegen ermittelt und als prozentualer Wert in Bezug zur Einwaage (m/m) berechnet [PH.EUR. (2002e)]

5.5.2. Bestimmung der Korngrößenverteilung

Jeweils 40,0 g Untersuchungsmaterial wurden auf einen Turm aus 6 getrockneten und gewogenen Analysensieben (Maschenweite 1000; 710; 500; 355; 180; 53 µm; Analysensiebe, *Fa. Retsch*, Haan;) mit Boden gegeben und bis zur konstanten Verteilung gesiebt (5 min). Der Rückstand auf den einzelnen Sieben wurde durch Wiegen ermittelt und in prozentualem Anteil zur Einwaage (m/m) angegeben [PH.EUR.(2002d)].

5.5.3. Bestimmung des Freisetzungsverhaltens

1,00 g Extrakt wurde in einen 100 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 100,0 ml MeOH 70 % (Baldrianextrakt) bzw. MeOH 60% (Sennesfrüchteextrakt) versetzt. Zur Extraktion wurde das Gemisch bei 25°C (Sennesfrüchteextrakt) bzw. 30°C (Baldrianextrakt) für 30 min ins Ultraschallbad gegeben, und nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 und 30 min je 1,0 ml Suspension mittels einer Spritze (Omnifix-F 1ml, *Fa. Braun*, Melsungen) abgezogen. Die Proben wurden über einen 0,2 µm Filter (Rotilabo Spritzenfilter Nylon 0,2 µm, *Fa. Roth*, Karlsruhe) in die Probengefäße filtriert. Dabei wurden die ersten 0,5 ml verworfen und je zweimal 200 µl abfiltriert. Die letzten 100 µl wurden ebenfalls verworfen.

Die Proben wurden mittels HPLC nach isokratischer Methode nach FREYTAG (Baldrianextrakt; siehe 5.5.4.3.) bzw. nach MEILHAMMER (Sennesfrüchteextrakt; siehe 5.5.4.4.) auf ihren Gehalt an Rhein (Sennes) bzw. Valerensäure (Baldrian) hin untersucht.

5.5.4. HPLC-Methoden

5.5.4.1. Gradient 1 zur Trennung von mittel- und unpolaren Baldrianinhaltsstoffen

Säule: Eurospher 100-C18, 4 x 250 mm, 5 µm, Fa. Knauer, Berlin

Vorsäule: Eurospher 100-C18, 4,6 x 30 mm, 5 µm, Fa. Knauer, Berlin

Säulentemperatur: 30°C

Flussrate: 0,8 ml/min

Mobile Phase: Fließmittel A: Wasser

Fließmittel B: Acetonitril

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektion: UV 225 nm

Gradient:

Zeit [min]	%B
0	2
8	5
25-32	15
42	20
60	40
66-82	65
85-90	100
92-97	2

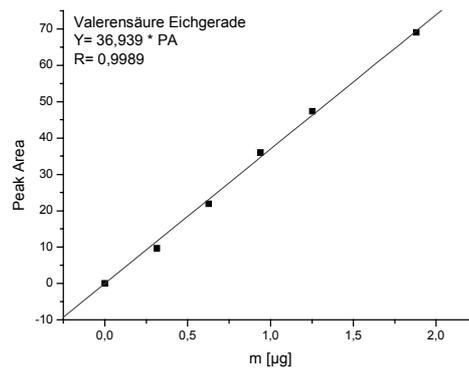
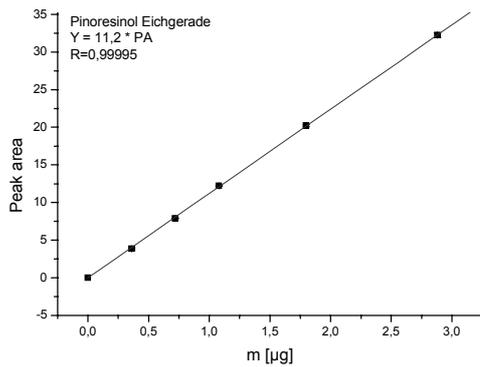
Die Reproduzierbarkeit wurde durch mehrmaliges (n=3) Einspritzen der Standardsubstanzen und durch Bestimmung des Variationskoeffizienten der Peakflächen belegt:

Valerensäure 1,22 %

Pinoresinol 0,99 %

Gehaltsbestimmungen:

	Kalibrierfunktion $y [\mu\text{g/ml}] =$	Regressions- koeffizient r^2	Nachweis- grenze [ng]	Liearitäts- bereich [ng]
Valerensäure	$36,86 \times \text{PA}$	0,9989	200	300-1800
Pinoresinol	$11,2 \times \text{PA}$	0,9999	120	300-7200



Zur Gehaltsbestimmung wurden jeweils zwei Proben nach 5.4.4 aufbereitet und je zwei mal injiziert (n=4).

5.5.4.2. **Isokratische HPLC-Methode zur Analytik von Fraktion H1**

Säule: Eurospher 100-C18, 4 x 250 mm, 5 µm, *Fa. Knauer*, Berlin

Vorsäule: Eurospher 100-C18, 4,6 x 30 mm, 5 µm, *Fa. Knauer*, Berlin

Säulentemperatur: 30°C

Flussrate: 1 ml/min , isokratisch für 30 min

Mobile Phase: 45% Acetonitril

Injektionsvolumen 50 µl

Detektion:: UV 225 nm

5.5.4.3. Isokratische HPLC-Methode zur Bestimmung der Valerensäuren
[nach FREYTAG (1983)]

Säule: Eurospher 100-C18, 4 x 250 mm, 5 µm, *Fa. Knauer*, Berlin
 Vorsäule: Eurospher 100-C18, 4,6 x 30 mm, 5 µm, *Fa. Knauer*, Berlin
 Säulentemperatur: 30°C
 Flussrate: 1,5 ml/min , isokratisch für 30 min
 Mobile Phase: 650ml Acetonitril / 350ml Wasser/ 5 ml H₃PO₄
 Injektionsvolumen: 40 µl
 Detektion: UV 225 nm

5.5.4.4. Gradient 2 zur Trennung der Sennesproben [nach MEILHAMMER (2003)]

Säule: Eurospher 100-C18, 4 x 250 mm, 5 µm, *Fa. Knauer*, Berlin
 Vorsäule: Eurospher 100-C18, 4,6 x 30 mm, 5 µm, *Fa. Knauer*, Berlin
 Säulentemperatur: 25°C
 Flussrate: 1 ml/min
 Mobile Phase: Fließmittel A: 900 ml Wasser/ 100 ml Acetonitril/ 5 ml H₃PO₄
 Fließmittel B: Acetonitril
 Injektionsvolumen: 10 µl
 Detektion: UV 270 nm

Gradient:

Zeit [min]	%B
0	10
6	10
11	14
21	14
51	100
56	100
58	10
63	10

Gehaltsbestimmungen:

	Kalibrierfunktion y [$\mu\text{g/ml}$] =	Regressions- koeffizient r^2	Liearitäts- bereich [ng]
Sennosid B	15,65 x PA	0,9982	300-40000
Isorhamnetin	37,82 x PA	0,9993	400-3600
Rhein	47,47 x PA	0,9990	300-1800

Zur Gehaltsbestimmung wurden jeweils zwei Proben nach 5.4.4 aufbereitet und je zwei mal injiziert (n=4).

5.5.5. Dünnschichtchromatographie

5.5.5.1. DC-Untersuchung von Baldrianproben auf Valerensäuren

Die Trennbedingungen wurden in Anlehnung an die Monographie für Baldrianwurzel [PH.EUR. (2002)] geschaffen:

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F254-Alufolien 20 x 20 cm , *Fa. Merck*, Darmstadt

Mobile Phase: 2,5 T Eisessig p.a., *Fa. Merck*, Darmstadt

17,5 T Ethylacetat p.a., *Fa. Merck*, Darmstadt

325 T n-Hexan reinst, *Fa. Merck*, Darmstadt

Proben-
aufbereitung: 500mg Probenmaterial werden in 5,0 ml Methanol für 5 min im Ultraschallbad extrahiert und anschließend filtriert

Auftragevolumen: 30 μl bandförmig

Laufstrecke: 10 cm

Detektion: UV 365 nm, UV 254 nm nach dem Verdunsten des Fließmittels

Sprühreagenz: 10 min bei 100°C nach Besprühen mit Anisaldehyd / Schwefelsäure-reagens:

Zu einem Gemisch aus 10 ml Eisessig p.a., *Fa. Merck*, Darmstadt, 85 ml Methanol p.a., *Fa. Merck*, Darmstadt und 5 ml Schwefel-säure 95-97% p.a., *Fa. Merck*, Darmstadt werden 0,5 ml Anisaldehyd, *Fa. Merck*, Darmstadt gegeben und gelöst.

5.5.5.2. DC-Untersuchung von Baldrianproben auf Aminosäuren

Die Trennbedingungen wurden nach LAPKE (2000) gewählt:

Stationäre Phase:	Kieselgel 60 F254-Alufolien 20 x 20 cm , <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt
Mobile Phase:	50 T Aceton p.a., <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt 175 T Ethylacetat p.a., <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt 175 T Methanol p.a. , <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt 100 T 0,3 N Natronlauge
Proben- aufbereitung:	500mg Probenmaterial werden in 5,0 ml Methanol für 5 min im Ultraschallbad extrahiert und anschließend filtriert
Auftragevolumen:	20 µl bandförmig
Laufstrecke:	10 cm
Detektion:	Flecken nur nach dem Besprühen sichtbar
Sprühreagenz:	10 min bei 100°C nach Besprühen mit Ninhydrin Reagenz : 0,3g Ninhydrin in 100,0 ml Butanol p.a., <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt und 3,0 ml Eisessig p.a., <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt gelöst.

5.5.5.3. DC-Untersuchungen von Baldrianproben auf Lignane

Die Trennbedingungen wurden nach BODESHEIM (1996) modifiziert:

Stationäre Phase:	Kieselgel 60 F254-Alufolien 20 x 20 cm , <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt
Mobile Phase:	50 T Chloroform p.a., <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt 15 T Toluol p.a., <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt 30 T Methanol p.a. , <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt 5 T Ammoniaklösung 25%, p.a. , <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt
Proben- aufbereitung:	500mg Probenmaterial werden in 10,0 ml Methanol 70% für 5 min im Ultraschallbad extrahiert und anschließend filtriert. Die erhaltene Lösung wird zur Trockne einrotiert und in 1,0 ml Methanol suspendiert und zentrifugiert. Der Überstand dient als Untersuchungslösung.
Auftragevolumen:	10 µl bandförmig
Laufstrecke:	10 cm

Detektion:	Flecken nur nach dem Besprühen sichtbar
Sprühreagenz:	10 min bei 100°C nach Besprühen mit Anisaldehyd / Schwefelsäure - Reagens (siehe 5.5.4.1)

5.5.5.4. DC-Untersuchungen von Sennesproben

Die Trennbedingungen wurden in Anlehnung an die Monographie für Sennesblätter [PH.EUR. (2002f)] gewählt:

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F254-Alufolien 20 x 20 cm , *Fa. Merck*, Darmstadt

Mobile Phase: 5 T Eisessig p.a., *Fa. Merck*, Darmstadt

100 T Wasser

200 T Ethylacetat p.a., *Fa. Merck*, Darmstadt

200 T n-Propanol p.a., *Fa. Merck*, Darmstadt

Proben-
aufbereitung: analog 5.4.4.1.

Auftragevolumen: 20 µl bandförmig

Laufstrecke: 10 cm

Detektion: UV 365 nm, UV 254 nm, VIS nach dem Verdunsten des Fließmittels

Sprühreagenz: 1. 20% HNO₃ (V/V) für 10 min erhitzt auf 120 °C
2. KOH-Lösung (50g/l)

5.5.6. Bestimmung des Ätherischölgehaltes

Die Bestimmung wurde entsprechend der Baldrianmonographie [PH.EUR. (2002b)] durchgeführt:

In die vorgeschriebene Destillationsapparatur wurden 0,5 ml Xylol vorgelegt und in einen 2000 ml-Rundkolben 500 ml Wasser als Destillationsflüssigkeit gegeben. Nach 30 min des Destillierens wurde das genaue Volumen der Vorlage bestimmt und 40,0 g pulverisierte Droge in den Kolben gegeben und für 4 h mit einer Geschwindigkeit von 3 bis 4 ml/min destilliert. Die extrahierte Menge an ätherischem Öl wurde ermittelt und als prozentualer Wert zur Einwaage angegeben.

Zur Ermittlung des Gehaltes der Extrakte wurden einige Tropfen Silikonöl zur Entschäumung zugegeben. Die Einwaage betrug hier abweichend von der Vorschrift nur 20,0 g Extrakt.

Es wurden jeweils drei Proben untersucht und Mittelwert und relative Standardabweichung bestimmt.

5.6. Präparative Methoden

5.6.1. Isolierung von Lignanen aus Baldrianwurzel

5.6.1.1. Herstellung von Fraktionen verschiedener Polarität

350 g, für zwei Monate bei 70°C im Trockenschrank degradiertes pulverisierter Baldrianwurzel wurden in eine Extraktionshülse für eine 1000 ml Soxhlet-Apparatur eingewogen und drei mal mit je 1000 ml Hexan für je 8 h extrahiert (Fraktion H1). Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer auf in etwa ein Drittel seines Volumens eingengt und auf vier Portionen (ca. 250 ml) aufgeteilt. Jede Portion wurde vier mal mit je 250 ml 50% MeOH ausgeschüttelt, die vereinigten Methanolfractionen einrotiert und gefriergetrocknet (Ausbeute 3,95 g hellgrüner, cremeartiger Extrakt (Fraktion H1/M50)).

Die mit Hexan extrahierte Baldrianwurzel wurde getrocknet und anschließend drei mal mit je 1000 ml Ethylacetat extrahiert (Fraktion E1). Nach erneuter Trocknung wurde eine dreimalige Extraktion mit je 1000 ml Methanol durchgeführt (Fraktion M1). Nachdem das extrahierte Baldrianwurzelpulver ausgebreitet bei Raumtemperatur getrocknet worden war, wurde es in einem 1000 ml Becherglas drei Mal mit je 500 ml Wasser versetzt und für 15 min im Ultraschallbad extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden anschließend gefriergetrocknet (Fraktion W1; Ausbeute ca. 10 g dunkelbrauner Trockenextrakt).

5.6.1.2. Isolation von Lignanen und Valerensäuren mittels Säulenchromatographie

Stationäre Phase:	Lichroprep RP-18, Partikelgröße 25-40µm , Fa. Merck, Darmstadt Füllmenge ca. 80 g
Säule:	Beidseitig offenes Glasrohr aus Duranglas (Fa. Schott, Mainz); Länge 85 cm , ID 2cm, an beiden Enden durch einen Stahlstempel mit einer lösungsmittelresistenten Quetschdichtung verschlossen; Füllhöhe ca. 60 cm
Mobile Phase:	Methanol/ Wasser- Mischungen (10% Stufen von 10-90% Methanol, ca. 50 –70 Fraktionen pro Stufe); Zudosierung über die peristaltische Pumpe mittels Teflonschläuchen

Flussrate:	40 ml/h
Detektion:	UV 254 nm, gekoppelt mit automatischem Schreiber
Auftragemenge:	2g von Fraktion H1/M50 (Pinoresinol, HVS,AVS) bzw. W1(weitere Lignane)
Fraktionierung:	10 ml/15 min pro Glas; ca. 400 Einzelfraktionen; Vereinigung zu 22 Sammelfraktionen anhand der Peaks im aufgezeichneten Profil
Aufarbeitung:	Entfernung des Lösungsmittels der Sammelfraktionen mittels Rotationsverdampfer; endgültige Trocknung nach Zugabe einiger ml Wasser durch Gefriertrocknung
Zuordnung:	Aufnahme eines DAD/UV-HPLC-Chromatogramms der einzelnen Sammelfraktionen

5.6.2. Isolation von Inhaltsstoffen aus Sennesdrogen

5.6.2.1. *Vorextraktion zur Isolation von Tinnevelinglykosid aus Sennesfrüchten*

250 g pulverisierte Droge wurden mit je 2000 ml Hexan und Ethylacetat durch Soxhlet-Extraktion vorextrahiert. 2 g des nach Trocknung der resultierende Ethylacetat-Fraktion erhaltenen Extraktes wurden wiederum in wenig Ethylacetat aufgenommen und auf 250 g Kieselgel in einer 10 cm weiten Glasfritte aufgegeben. Unter Vakuum wurde mit 200 ml Ethylacetat eluiert und die Lösung verworfen. Der Rückstand wurde erneut mit 200 ml Methanol eluiert. Diese Lösung wurde auf 5 ml einrotiert und die erhaltene Suspension für die Chromatographie verwendet (5.6.2.3).

5.6.2.2. Vorextraktion zur Isolation von Flavonglykosiden aus Sennesblätterextrakt

150 g Sennesblätterextrakt wurden mit vier mal 500 ml Methanol durch Soxhlet-extraktion vorextrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und auf 500ml eingeeengt. Nach Zufügen von 500 ml Wasser wurde in Portionen von 250 ml mit 2 l Ethylacetat ausgeschüttelt. Der resultierende Auszug wurde einrotiert und getrocknet (Ausbeute : 6,5g). 2 g dieses Extraktes wurden nach Suspension in gleicher Weise wie der Ethylacetatextrakt unter 5.6.2.1 gereinigt. Nach Elution mit Methanol wurde noch mit 200 ml Wasser eluiert. Das wässrige Eluat wurde auf 5 ml eingeeengt und zur Chromatographie verwendet (5.6.2.3).

5.6.2.3. Isolation von Tinnevellinglykosid und Flavonglykosiden aus Sennesdrogen

Stationäre Phase:	Lichroprep RP-18, Partikelgröße 25-40µm , <i>Fa. Merck</i> , Darmstadt Füllmenge ca. 80 g
Säule:	Beidseitig offenes Glasrohr aus Duranglas (<i>Fa. Schott</i> , Mainz); Länge 85 cm , ID 2cm, an beiden Enden durch einen Stahlstempel mit einer lösungsmittelresistenten Quetschdichtung verschlossen; Füllhöhe ca 60 cm
Mobile Phase:	Methanol/ Wasser- Mischungen (10% Stufen von 10-90% Methanol, ca 50 –70 Fraktionen pro Stufe); Zudosierung über die peristaltische Pumpe mittels Teflonschäuchen
Flußrate:	40 ml/h
Detektion:	UV 254 nm, gekoppelt mit automatischem Schreiber
Auftragemenge:	siehe jeweils 5.6.2.1 und 5.6.2.2
Fraktionierung:	10 ml/15 min pro Glas; ca. 400 Einzelfraktionen; Vereinigung zu Sammelfraktionen entsprechend der UV-Detektion
Aufarbeitung:	Entfernung des Lösungsmittels der Sammelfraktionen mittels Rotationsverdampfer; endgültige Trocknung nach Zugabe einiger ml Wasser durch Gefriertrocknung
Zuordnung:	nach HPLC-Analyse durch UV-DAD Detektion

6. Anhang

6.1. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren

6.1.1. Pinoresinol-4,4'-di-O- β -glykosid

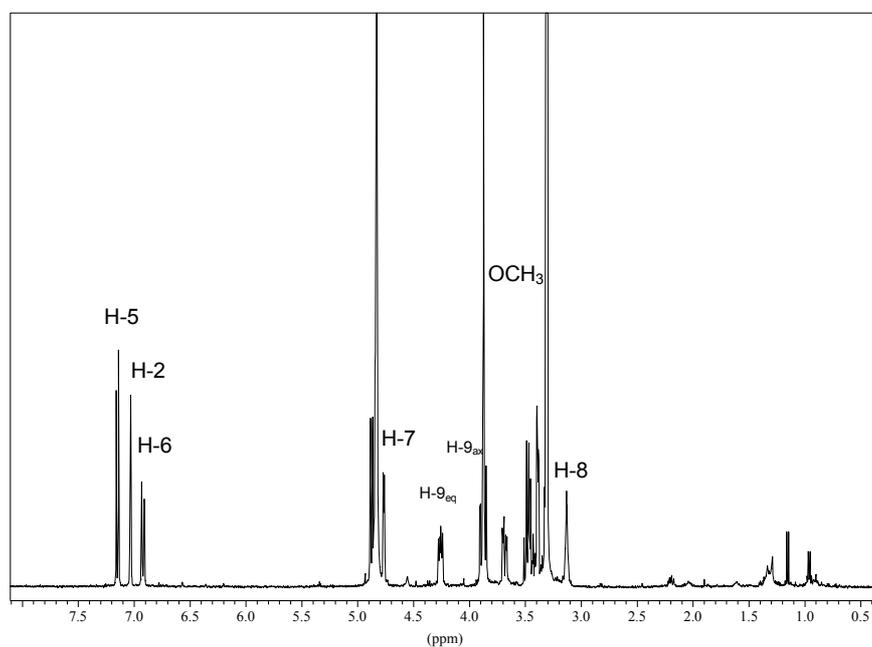


Abb. 156: $^1\text{H-NMR}$ von Pinoresinol-diglykosid in CD_3OD , 400 MHz, δ -Skala in ppm

6.1.2. Pinoresinol

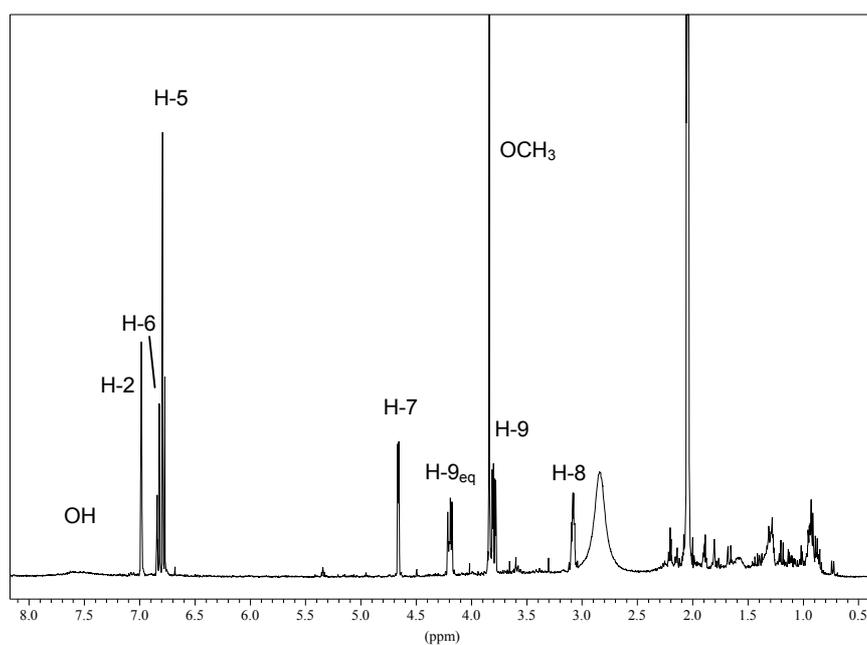


Abb. 157: $^1\text{H-NMR}$ von Pinoresinol in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 MHz, δ -Skala in ppm

6.2. MS-Spektren

6.2.1. Hydroxyvalerensäure

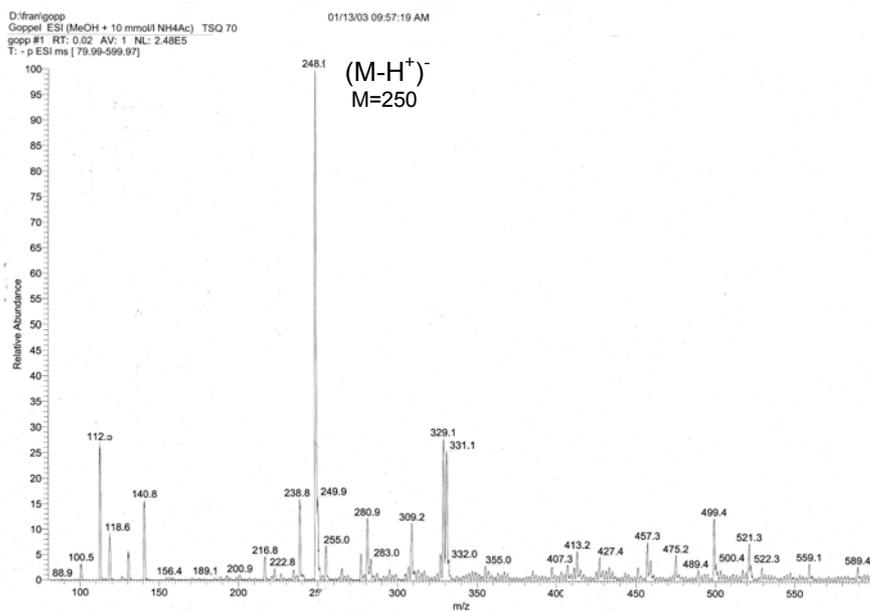


Abb. 158: ESI-MS von Hydroxyvalerensäure

6.2.2. Acetoxyvalerensäure

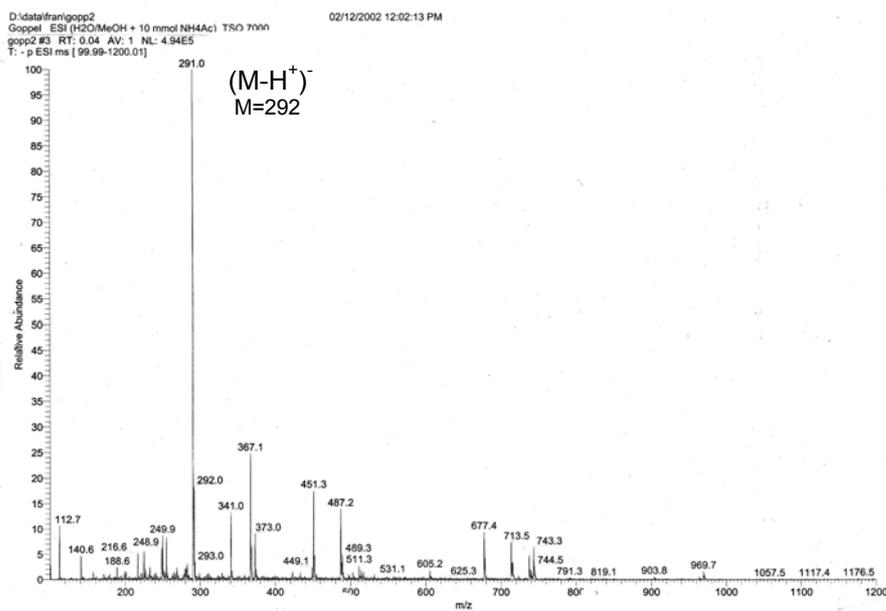


Abb. 159: ESI-MS von Acetoxyvalerensäure

6.2.3. Pinoresinol

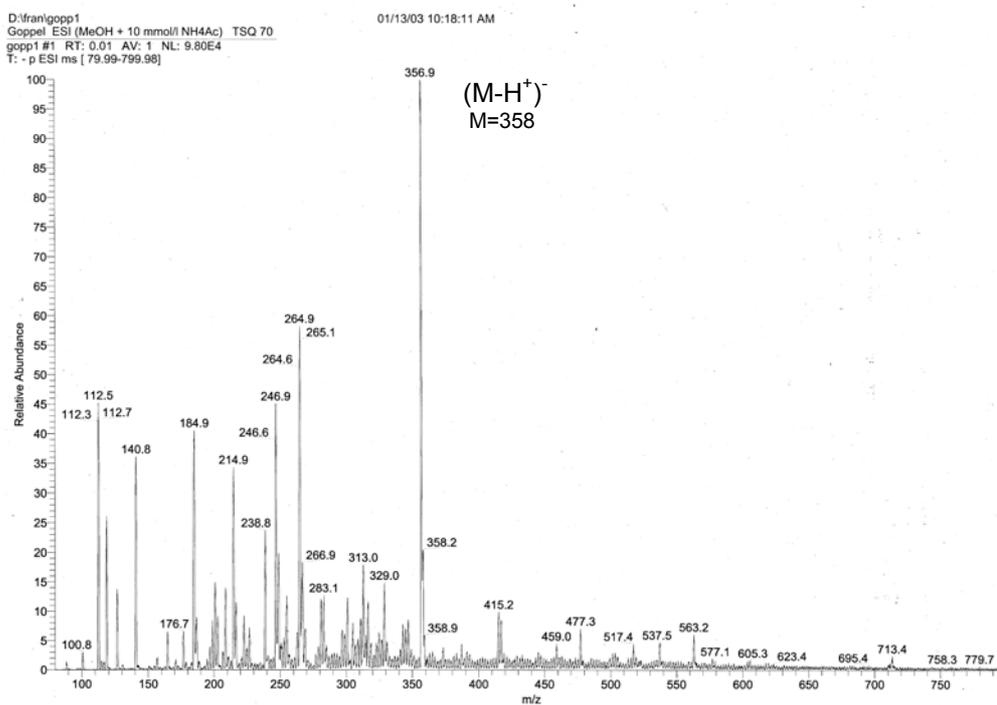


Abb. 160: ESI-MS von Pinoresinol

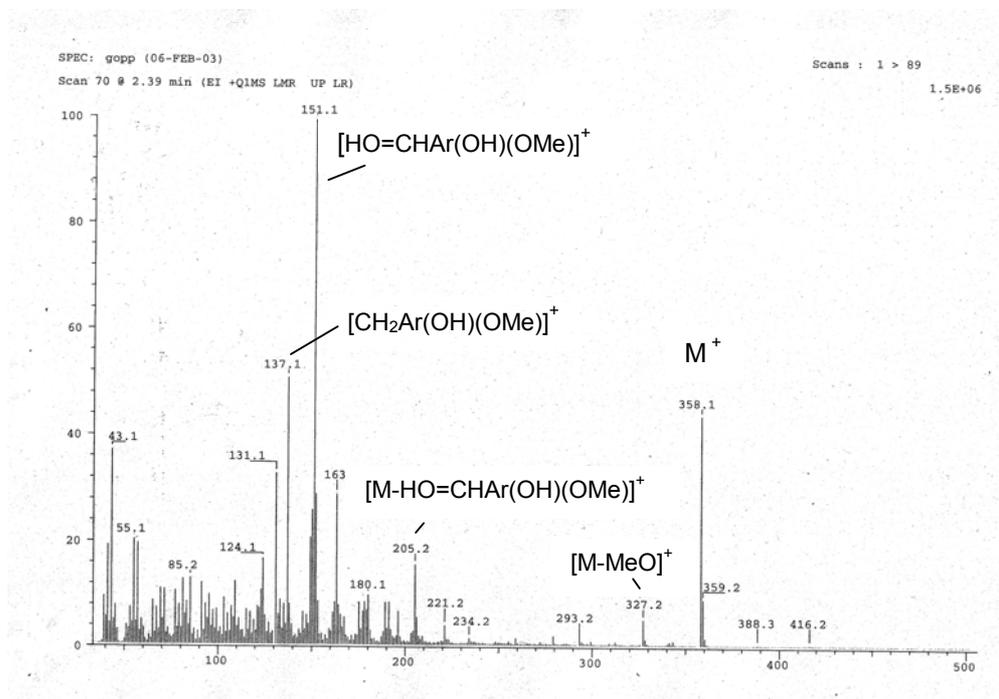


Abb. 161: EI-MS von Pinoresinol

6.2.4. Hydroxypinoresinol (LC-MS)

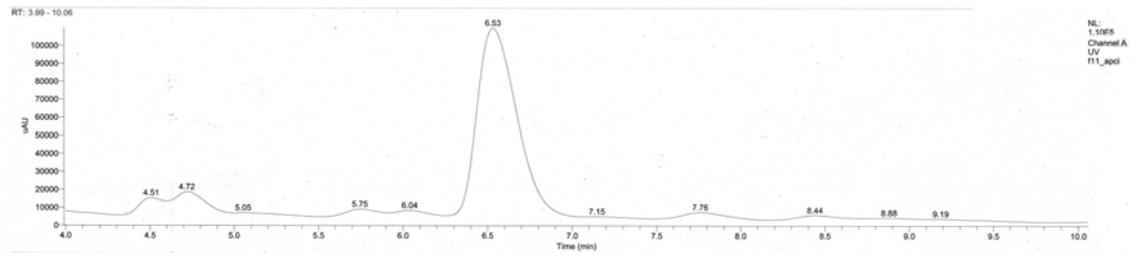


Abb. 162: HPLC-Profil / UV-Detektion

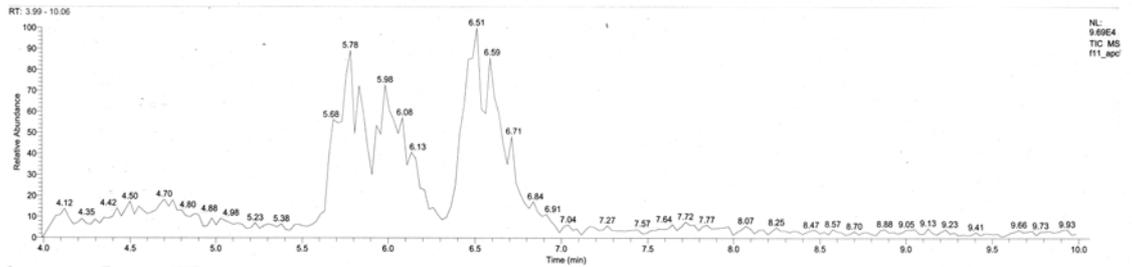


Abb. 163: HPLC-Profil / apci-Massendetektor (TIC)

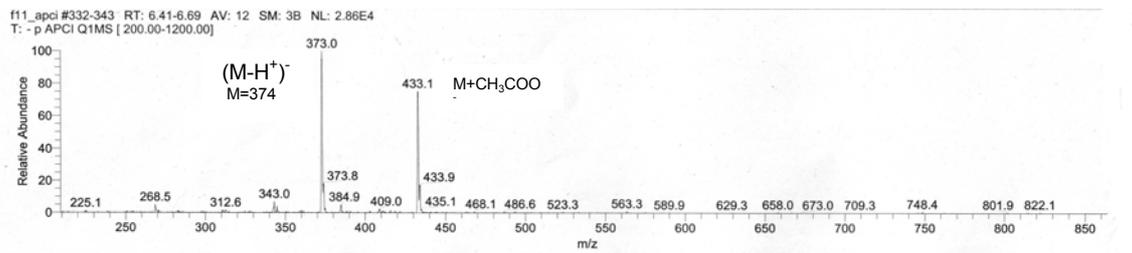


Abb. 164: MS der Substanz bei einer Retentionszeit von 6.53 min

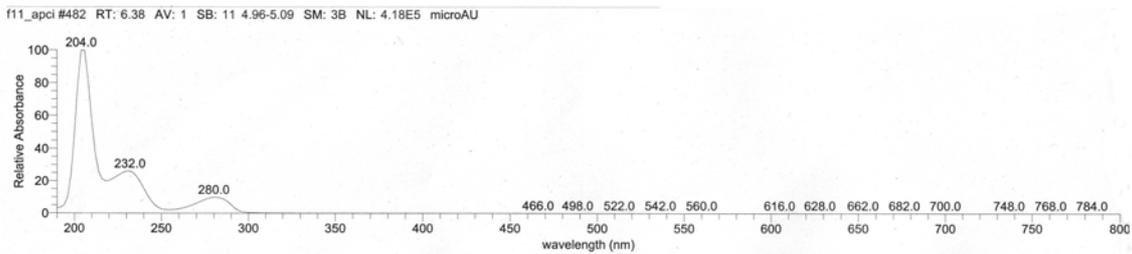


Abb. 165: UV-Spektrum der Substanz bei einer Retentionszeit von 6.53 min

6.2.5. Pinoresinol-O-diglykosid

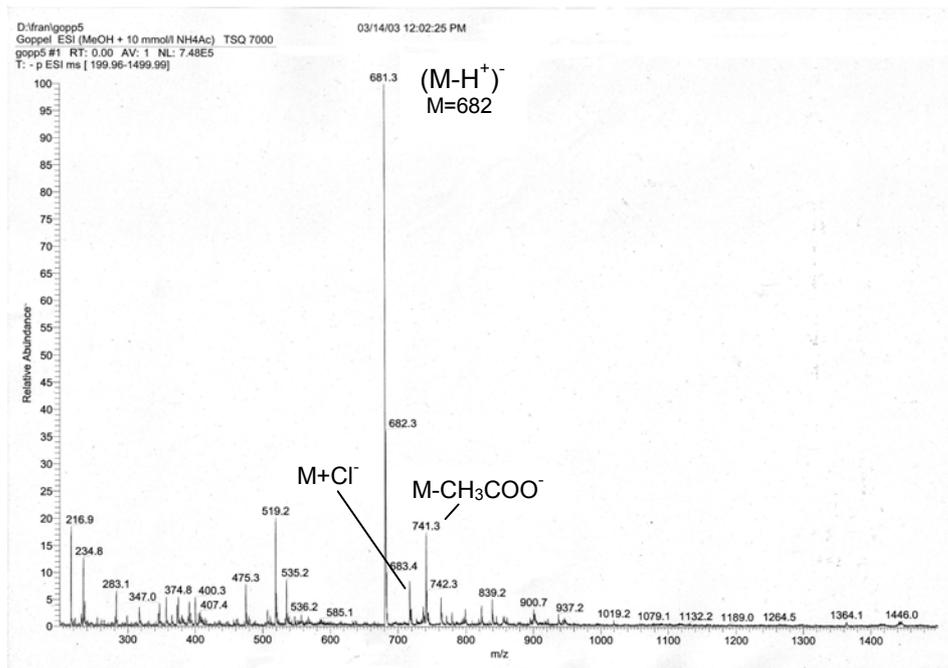


Abb. 166: ESI-MS von Pinoresinol-O-diglykosid

6.2.6. Isorhamnetin-gentiobiosid

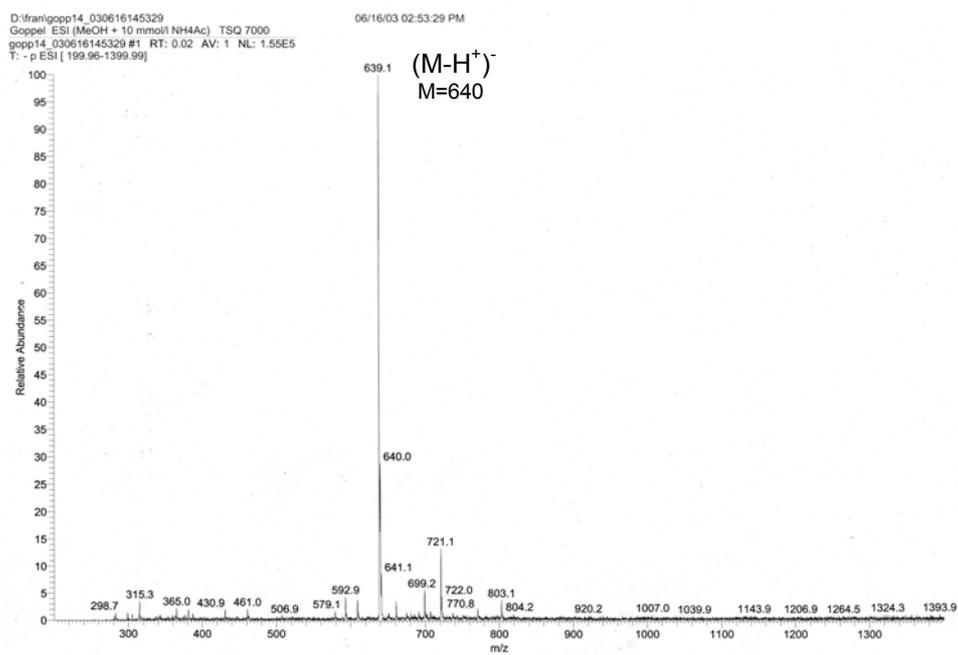


Abb. 167: ESI-MS von Isorhamnetin-gentiobiosid

6.2.7. Kämpferol-gentiobiosid

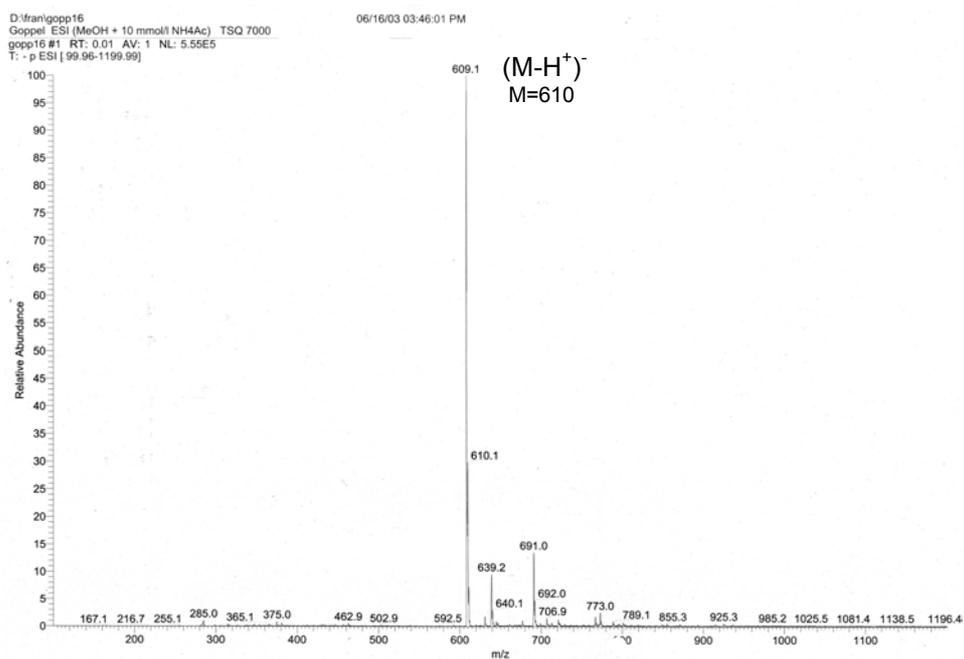


Abb. 168: ESI-MS von Kämpferol-gentiobiosid

6.2.8. Quercetin-gentiobiosid

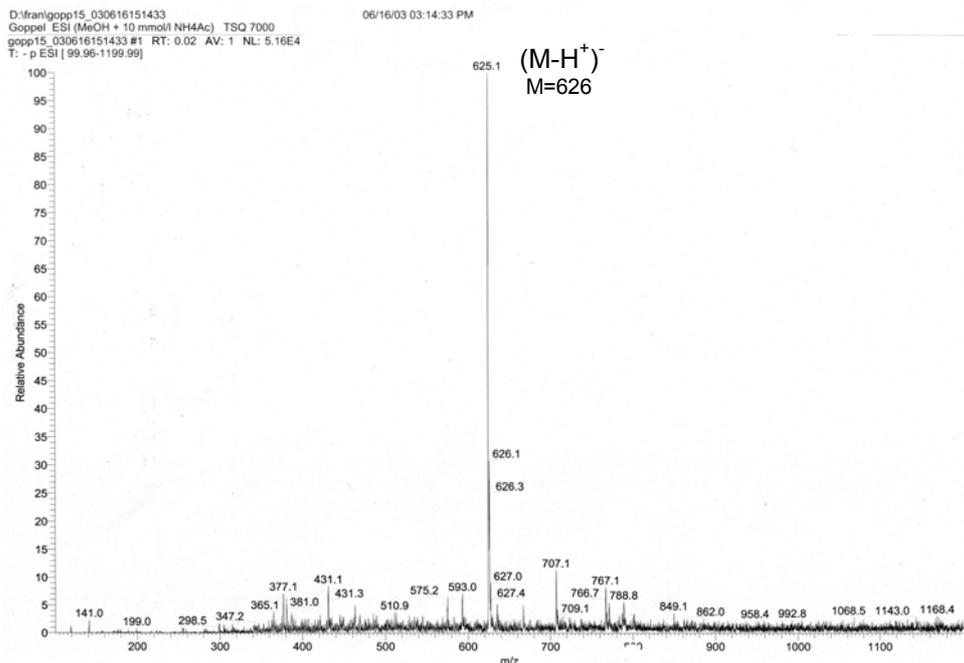


Abb. 169: ESI-MS von Quercetin-gentiobiosid

6.2.9. Tinnevellin-glykosid

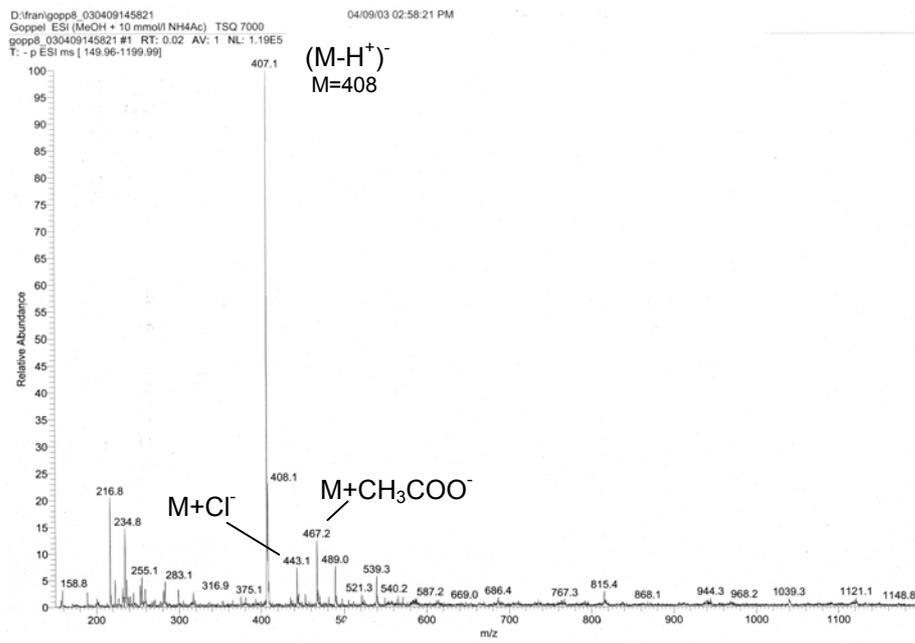


Abb. 170: ESI-MS von Tinnevellin-glykosid

6.3. Dokumentation konstanter Klimabedingungen

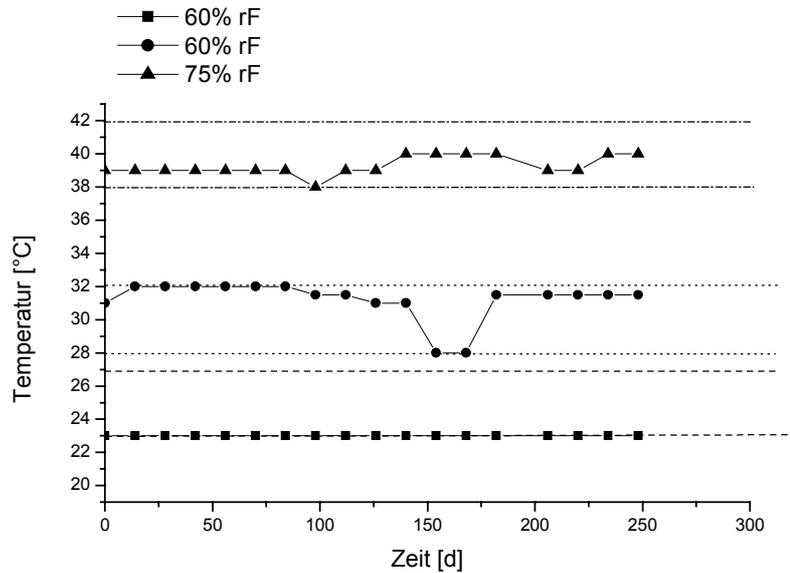


Abb. 171: Dokumentation der Temperaturschwankungen (die horizontalen Linien geben die zulässigen Intervalle an)

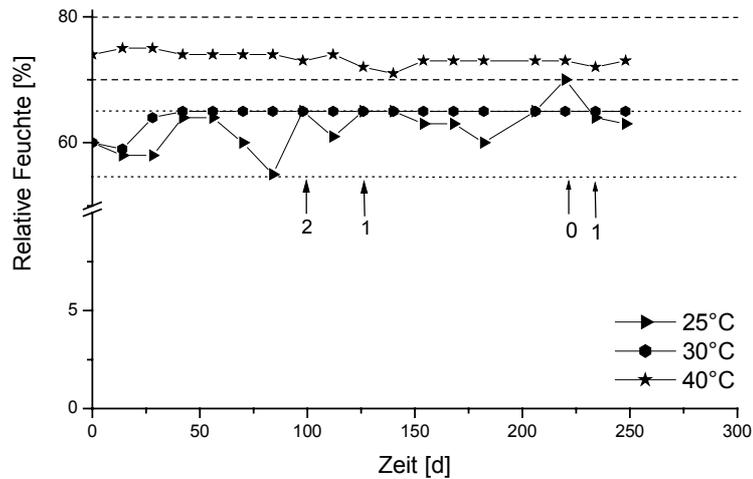


Abb. 172: Dokumentation der Schwankungen der relativen Feuchte (die horizontalen Linien geben die zulässigen Intervalle wieder). Die Ziffern unter den Pfeilen geben die Zahl der Luftbefeuchter wieder, die im auf 25°C klimatisierten Raum eingesetzt wurden

7. Abkürzungsverzeichnis

%B	Anteil an Fließmittel B bei Gradientensystemen
µl	Mikroliter
¹ H-NMR	Protonen-Kernresonanzspektroskopie
AMG	Arzneimittelgesetz
apci	atmospheric pressure chemical ionisation
Ch.B.	Chargenbezeichnung
d	Tag
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DEV	Droge/ Extrakt –Verhältnis
EI	electron impact
ESCOP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
ESI	electrospray ionisation
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration (USA)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPTLC	High performance thin layer Chromatography
ICH	International conference on harmonization
ID	Innendurchmesser
m/z	Massenzahl
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometrie

MW	Mittelwert
n	Stichprobenanzahl
n.b.	nicht bestimmt
p.a.	pro analysi
PA	Peak Area
Ph.Eur.	Pharmacopoea Europaea
ppm	part per million
r^2	Regressionskoeffizient
rF	Relative Luftfeuchte [%]
RP	Reversed Phase
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
Senn.fol.ex.	Sennesblätterextrakt
Senn.fol.ex.nat.	nativer Sennesblätterextrakt
Senn.fol.pulv.	pulverisierte Sennesblätter
Senn.fruct.ex.	Sennesfrüchteextrakt
Senn.fruct.ex.nat.	nativer Sennesfrüchteextrakt
Tab.	Tabelle
t_R	Retentionszeit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
Val.ex.nat.	nativer ethanolischer Baldrianwurzeltrockenextrakt
Val.ex.sicc.	methanolischer Baldrianwurzeltrockenextrakt
Val.ex.spir.sicc.	ethanolischer Baldrianwurzeltrockenextrakt
Val.rad.pulv.	pulverisierte Baldrianwurzel
VK	Variationskoeffizient

8. Literaturverzeichnis

Adam, K., Becker, H.: Analytik biogener Arzneistoffe, Wiss. Verlags Ges., Stuttgart, 373-374 (2000)

Alert, D.: Beiträge zur Stabilitätsanalytik von Anthrachinondrogen unter Verwendung der vollautomatischen Dünnschichtchromatographie. Dissertation, Würzburg (1985)

AMG (Gesetz über den Verkehr von Arzneimitteln); Fassung vom 11. Dez. 1998, zuletzt geändert durch Gesetz vom 13. Dez. 2001; § 22 (1) Nr. 14, 15

Atzorn, R.; Weiher, E.W.; Zenk, M.H.: Formation and distribution of sennosides in *Cassia angustifolia* as determined by a sensitive and specific radioimmunoassay. *Planta Med.* 41, 1-14 (1981)

Bakshi, M.; Singh, S.: Development of validated stability indicating assay methods-critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 1011-1040 (2002)

Bala, S.; Uniyal, G.C.; Dubey, T.; Singh, S.P.: An improved method for the analysis of sennosides in *Cassia angustifolia* by high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* 32, 277-280 (2001)

Bauer, H.; Frömming, K.H.; Führer, C.: Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. 6. Auflage, Wiss. Verlags Ges., Stuttgart, 432-448 (1999a), 24-34 (1999b), 393-422 (1999c)

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

Bilia, A.R.; Bergonzi, M.C.; Lazari, D.; Vincieri, F.F.: Characterisation of commercial Kava-kava herbal drug and herbal drug preparations by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5016-5025 (2002b)

Bilia, A.R.; Bergonzi, M.C.; Mazzi, G.; Vincieri, F.F.: Analysis of plant complex matrices by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy: St. John's Wort extract. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2115-2124 (2001)

Bilia, A.R.; Bergonzi, M.C.; Mazzi, G.; Vincieri, F.F.: NMR spectroscopy: a useful tool for characterisation of plant extracts, the case of supercritical CO₂ arnica extract. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, 321-330 (2002a)

Bodesheim, U.: Isolierung, Strukturaufklärung, Analytik und Radiorezeptorassays von Alkaloiden und Lignanen aus *Valeriana officinalis* L., Dissertation, Marburg (1996)

Bodesheim, U.; Hölzl, J.: Isolierung, Strukturaufklärung, Analytik und Radiorezeptorassays von Alkaloiden und Lignanen aus *Valeriana officinalis* L., *Pharmazie* 52, 386-391 (1997)

- Borkowski, B.; Lutomski, J.:** Die Gewinnung von Alkaloiden aus den getrockneten Wurzeln und Wurzelstöcken von *Valeriana officinalis* L., Pharm. Zentralhalle 100 (11), 575-584 (1961)
- Bos, R.; Hendriks, H.; Bruins, A.P.; Kloostermann, J.; Sipma, G.:** Isolation and identification of valerenane sesquiterpenoids from *Valeriana officinalis*. Phytochemistry 25 (1), 133-135 (1986)
- Bos, R.; Woerdenbag, H.J.; van Putten, F.M.S.; Hendriks, H.; Scheffer, J.J.C.:** Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. Planta Med. 64, 143-147 (1998)
- Bos, R.; Woerdenbag, J.; Hendriks, H.; Zwaving, J.H.; DeSmet, P.; Tittel, G.; Wikström, H.V.; Scheffer, J.C.:** Analytical aspects of phytotherapeutic valerian preparations. Phytochem. Analys. 7, 143-151 (1996)
- Bountah, C.; Richert, L.; Beck, J.P.; Haag-Berrurier, M.; Anton, R.:** The action of Valepotriates on the synthesis of DNA and proteins of cultured hepatoma cells. Planta Med. 49, 138-142 (1984)
- Boventer, W.:** Quantitative Untersuchungen einzelner Anthranoide in Sennesdrogen und ihren Zubereitungen mittels densitometrischer Bestimmungsmethoden. Dissertation, Berlin (1988)
- Braun, R.; Dittmar, W.; Machut, M.; Weickmann, S.:** Valepotriate mit Epoxidstruktur-beachtliche Alkylantien. Dtsch. Apoth. Ztg 21, 1109-1113 (1982)
- Braun, R.; Dittmar, W.; Machut, M.; Wendland, S.:** Valepotriate in Fertigarzneimitteln. Dtsch. Apoth. Ztg. 124, 2049-2050, (1984)
- Bruneton, J.:** Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants, 2nd edition, Lavoisier Publishing Springer Verlag, London, 595-600 (1999)
- Bundesanzeiger (BAnz):** 21.7.1993; Monographien Sennesblätter und Sennesfrüchte (Kommission E)
- Bundesanzeiger (BAnz):** Nr. 90; 15.05.1985; Monographie Baldrianwurzel (Kommission E)
- Carstensen, J.T.:** Drug stability, principles and practices, 2nd edition, revised and expanded, Marcel Dekker, Inc., 281ff (1995)
- Casanova, J.; Felix, T.:** Carbon-13 NMR, a tool for essential oil analysis. Annales des falsifications de l'Expertise chimique et toxicologique 93, 313-330 (2000)

- Christ, B.; Pöppinghaus, T.; Wirtz-Peitz, F.:** Isolierung und Strukturaufklärung eines neuen Sennosides aus *Cassia senna* L., *Arzneim. Forschg.* 28, 225-231 (1978)
- CPMP** (Committee for proprietary medicinal products) : Note for guidance on quality of herbal medicinal products. CPMP/QWP/2819/00 (2001)
- CPMP** (Committee for proprietary medicinal products) : Note for guidance: Stability testing of new drug substances and related finished products CPMP/QWP/556/96 (1998)
- CPMP** (Committee for proprietary medicinal products) : Note for guidance on specifications: test procedure and acceptance criteria for herbal drug preparations and herbal medicinal products. CPMP/QWP/2820/00 (2001)
- CPMP** (Committee for proprietary medicinal products) : Note for guidance on stability testing of new drug substances and products. CPMP/ICH/380/95 (1998)
- Crelli, J.K.; Fairbairn, J.W.; Friedmann, C.A.; Ryan, H.A.:** New glycosides from senna. *J. Pharm. Pharmacol.* 13, 639-40 (1961)
- DAB (Deutsches Arzneibuch):** Monographie: Baldrianwurzel trockenextrakt, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart / Govi Verlag Eschborn (2002)
- De Witte, P.:** Metabolism and pharmacokinetics of anthranoids. *Pharmacology* 47 (suppl.), 86-97 (1993)
- Dieckmann, H.:** Untersuchungen zur Pharmakokinetik, Metabolismus und Toxikologie von Baldriinalen. Dissertation, Berlin (1988)
- Donath, F.; Quispe, S.; Diefenbach, K.; Maurer, A.; Fietze, I.; Roots, I.:** Critical evaluation of the effect of valerian extract on sleep structure and sleep quality. *Pharmacopsychiat.* 33 (6), 47-53 (2000)
- Dossaji, S.F.; Becker, H.:** HPLC separation and quantitative determination of valepotriates from *Valeriana kilimandscharica*. *Planta Med.* 43, 179-162 (1981)
- ESCOP** (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) : Monographie Sennae fructus, Fascicule 5, (1997)
- ESCOP** (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) : Monographie Valerianae radix, Fascicule 4, (1997)
- ESCOP** (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) : Monographie Sennae folium, Fascicule 5, (1997)
- Essig, D.; Hofe, J.; Schmidt, P.C.; Stumpf, H.:** Stabilisierungstechnologie, Wege zur haltbaren Arzneiform. *Wiss. Verlags Ges., Stuttgart,* 65-78 (1986)

- Evans, W.C. :** Trease and Evans' Pharmacognosy, 13th edition, Baillière Tindall, 398-404 (1989)
- FAH** (Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller): Stability testing of herbal medicinal products. Pharm. Ind. 64, Nr.1, 20-23 (2002)
- Fairbairn, J.W.; Moss, M.J.R.:** The relative purgative activities of 1,8-Dihydroxyanthraquinone derivatives. J. pharm. pharmacol. 22, 584-593 (1979)
- FDA** (Food and Drug Administration); Guideline for submitting documentation for the stability of human drugs and biologics. Rockville, MD. , 6-7 (1987)
- Fink, C.:** Analytik, Pharmakokinetik und pharmakologische Wirkung der Valepotriate unter besonderer Berücksichtigung des Valtrats. Dissertation, Marburg (1982)
- Fintelmann, V., Weiss, R.:** Lehrbuch der Phytotherapie, 10. völlig neu bearbeitete Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 290-292 (2002)
- Franck, B.; Petersen, U.; Hüper, F.:** Valerianin, ein tertiäres Monoterpen-Alkaloid aus Baldrian, Angew. Chem. 21,875-876 (1984)
- Franz, G.:** The Senna drug and its chemistry. Pharmacology 47 (suppl 1) 2-6 (1993)
- Franz, G.:** Typen pflanzlicher Extrakte. Dtsch. Apoth. Ztg. 14; 1771-1775 (2002)
- Franz, G.; Bauer, R.; Blaschek, W. ; Hamacher, H.; Nahrstedt, A.:** Zukunftsperspektive für pflanzliche Extrakte. Pharm. Ztg. 7 , 26-32 (2001)
- Freytag, WE.:** Bestimmung von Valerensäuren und Valerenal neben Valepotriaten in *Valeriana officinalis* durch HPLC. Pharm. Ztg. 51, 2869-2871 (1983)
- Fuchs, P.:** Qualität von Fertigarzneimitteln. Die Offizin 1, 37-48 (1986)
- Gaedcke, F.:** Qualität von Phytopharmaka; Dtsch. Apoth. Ztg. 138, 1762 (1998)
- Gaedcke, F. in Gaedcke F.; Steinhoff, B.:** Phytopharmaka. Wiss. Verlags Ges., Stuttgart, 5-66 (2000)
- Gerhardt, U.:** Gewürze in der Lebensmittelindustrie, Behrs Verlag, 212-229 (1990)
- Godau, P.:** Analytik und Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Valeriana officinalis* L.s.l. und deren pharmakologische Testung mit Rezeptor-Bindungsstudien. Dissertation, Marburg (1991)
- Gorbato, S.; Lolla,E.:** A new HPLC method for the analysis of valerenic acids in *Valeriana officinalis*. Fitoterapia, Volume LXVII, No.2, 159-162 (1996)
- Grimm, W.:** Stability testing of drug products; Wiss. Verlags Ges., Stuttgart, 171-208 (1985)

- Grimm, W.:** Toleranzen für Veränderungen während der Stabilitätsprüfung: Lösungsansätze zu einer brennenden Fragestellung. Pharm. Ind. 45, 715, 796-800 (1983)
- Grimm, W.; Krummen, K.:** Stability testing in the EC, Japan and the USA, Wiss. Verlags Ges., Stuttgart, 17-44 (1993)
- Grimminger, W.; Wittholm, K.:** Analytics of senna drugs with regard to the toxicological discussion of anthranoids; Pharmacology 47 (suppl 1) 98-109 (1993)
- Gross, D.; Edner, G., Schütte, H.R.:** Über monoterpene Valeriana-Alkaloide, Arch. Pharm. 304, 19-27 (1971)
- Hänsel, R., Schulz, J.:** GABA und andere Aminosäuren in der Baldrianwurzel, Arch. Pharm. 314, 380-381, (1981)
- Hänsel, R. (Hrsg.), Sticher, O.; Steinegger, E.:** Pharmakognosie-Phytopharmazie, 6. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg, Sticher, O.:456-464 (1999a), 910-915 (1999b)
- Hänsel, R., Schulz, J.:** Beitrag zur Qualitätssicherung von Baldrianextrakten, Pharm. Ind. 47, Nr.5, 531-533, (1985)
- Hänsel, R., Hölzl, J.:** Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie, Springer Verlag (1996): S.61-71
- Hänsel, R.; Schulz, J.:** Valerensäuren und Valerenal als Leitstoffe des officinellen Baldrians. Dtsch. Apoth. Ztg. 5, 215-219 (1982)
- Hattori, M. ; Akao, T. ; Kobashi, K. ; Namba, T.:** Cleavages of the O- and C-glucosyl bonds of anthone and 10,10'-Bianthrone derivatives by human intestinal bacteria. Pharmacology 47 (suppl.), 125-133 (1993)
- Hayashi, S.; Yoshida, A.; Tanaka, H.; Mitani, Y.; Yoshizawa, K.:** Analytical studies on the active constituents in crude drugs. Determination of sennosides in Senna and formulations by high-performance liquid chromatography. Chem. Pharm. Bull. 28 (2), 406-412 (1980)
- Hefendehl, F.W.:** Qualitätsprüfung von Drogen, Drogenzubereitungen und Homöopathika in der Apotheke; Die Offizin 1, 49-56 (1986)
- Heigl, D.:** Untersuchungen zur Stabilität von flavonoid- und gerbstoffhaltigen Drogen. Dissertation, Regensburg (2003)
- Hietala, P.; Lainonen, H.; Marvola, M.:** New aspects on the metabolism of the sennosides. Pharmacology 36: suppl. 1, 138-143 (1988)
- Hiller, K.; Melzig, M.F.:** Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen. Bd.1, Spektrum akadem. Verlag, Heidelberg, Berlin (2000) S.382

- Holz, M.; Dill, D.; Frank, R.; Wember, T.:** Auswertung und Optimierung von Haltbarkeitsuntersuchungen bei pharmazeutischen Produkten. Pharm. Ind. 63, 85-93 (2001)
- Hölzl, J., Seligmann, O., Chari, V.M.:** Zur Struktur von drei genuinen Valtrathydrinen aus *Valeriana tiliefolia*. Tetrahedron lett. ,1171-73, (1976)
- Hölzl, J.:** Baldrian- Ein Mittel gegen Schlafstörungen und Nervosität. Dtsch. Apoth. Ztg. 10, 751-759 (1996)
- Hörner, I.:** Ontogenetische Einflüsse auf Wachstum, Ertrag und Wirkstoffgehalt von *Valeriana officinalis* L., Baldrian. Dissertation Gießen (1989)
- Jaggy, H.; Koch, E.:** Chemistry and biology of alkylphenols from *Gingko biloba* L. Pharmazie 52, 735-738 (1997)
- Jänicke, C., Grünwald, J., Brendler, T.:** Handbuch Phytotherapie, Indikationen-Anwendungen-Wirksamkeit-Präparate, Wiss. Verlags Ges., Stuttgart 36-39 (2003)
- Janot, M.M., Guilhem, J.; Contz, O.; Venera, G.; Cionga, E.:** Contribution à l'étude des alcaloides de la Valériane (*Valeriana officinalis* L.): Actinidin et naphthyridylmèthylcèton, nouvel alcaloïde; Ann. Pharm. Fr. 37 (9-10), 413-420 (1979)
- Kallmann, S.:** Beiträge zur pharmazeutischen Qualitätsprüfung häufig verwendeter Arzneidrogen, Dissertation, Berlin (1987)
- Kiefl, B.:** Untersuchungen zur Stabilität von Ätherischödrogen. Dissertation, Regensburg (1998)
- Kinjo, J.; Ikeda, T.; Watanabe, K.; Nohara, T.:** An anthraquinone glycoside from *Cassia angustifolia* leaves. Phytochemistry 37, 1685-1687 (1994)
- Kommentar zum europäischen Arzneibuch,** Monographie Extrakte, Wiss. Verlags Ges., Stuttgart (1998)
- Krämer, J.:** AM-Stabilität international harmonisieren. Pharm. Ztg. 5, 388-391 (1996)
- Lainonen, H.:** The effect of chloramphenicol pre-treatment on the laxative action and metabolism of pure sennosides and stored sennoside solution in mice; Acta Pharmaceutica Fennica 97, 51-58 (1988b)
- Lainonen, H.; Marvola, M.; Hietala, P.; Parviainen, T.:** The effect of different storage conditions on the chemical stability, laxative effect and acute toxicity of sennoside solution; Pharm. Tox. 63, 37-41 (1988a)
- Lang, F.:** Stabilitätsprüfung von Phytopharmaka - Anspruch und Wirklichkeit; Vortrag APV-Kurs-Nr. 552 vom 6.-7. November (2001)

- Lang, F.; Stumpf, H.:** Considerations on future pharmacopoeial monographs for plant extracts. *Pharmeuropa* 11, No.2, 268-275 (1999)
- Lapke, C. ; Schilcher, H.; Riedel, E.:** Free amino acids in common preparations of *Valeriana officinalis* L.; *Pharm. Pharmacol. lett.* 7, 172-174 (1997)
- Lapke, C.:** Freie Aminosäuren in Arzneipflanzen mit psychotroper Wirkung unter besonderer Berücksichtigung von *Valeriana officinalis*. Dissertation, Zürich (2000)
- Lazarowych, N.J.; Pecos,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 Journal* 32, 497-512 (1998)
- Leathwood, P.D.; Chauffard, F.:** Quantifying the effects of mild sedatives. *J. Psychiatr. Res.* 17 (2), 115-122 (1983)
- Leathwood, P.D.; Chauffard, F.; Heck, E.; Munoz-Box, R.:** Aqueous extract of valerian root (*Valeriana officinalis* L.) improves sleep quality in man. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17 (1), 65-71 (1982)
- Lemli, J., Cuveele, J.; Verhaen, E.:** Chemical Identification of Alexandrian an Tinnevely Senna. *Planta Med.* 49, 36-37 (1983)
- Lemli, J.:** *Fitoterapia* 57, 33-40 (1986)
- Lemli, J.; Cuveele, J.:** Les transformations des hétérosides anthroniques pendant le séchage des feuilles de *Cassia senna* et de *Rhamnus frangula* . *Planta Med.* 34, 311-318 (1978)
- Lemli, J.; Toppet, S.; Cuveele, J.; Janssen, G.:** Naphtalene glycosides in *Cassia senna* and *Cassia angustifolia*. *Planta Med.* 43, 11-17 (1981)
- Leng-Peschlow, E.:** Effect of Sennosides and related compounds on intestinal transit in the rat. *Pharmacology* 36, suppl. 1, 40-48 (1988)
- Leuenberger, H.:** *Physikalische Pharmazie*. 4.Auflage, Wiss. Verlags Ges., Stuttgart S.335ff (2002)
- Liptah, J.; Verzar-Petri, G.:** Titrimetrische Bestimmung der Valepotriate. *Sci. Pharm* 48, 203-206 (1980)
- List, P.H.; Schmidt, P.C.:** *Technologie pflanzlicher Arzneizubereitungen*, Wiss. Verlags Ges., Stuttgart, 369-382 (1984)
- Mahaini, L.:** Stabilität des Arzneistoffes Phenprocoumon unter dem Einfluß des Hilfsstoffes Kieselsäure in einer Pulvermischung. Dissertation, Hamburg (1986)

- Malingre, T.:** Die Stabilität von Pflanzenextrakten. Pharm. Ind. 31, Jhrg., Heft 1 ,15-20 (1969)
- Meilhammer, B.:** Untersuchungen zur Hydroxyanthracenfreisetzung aus Abführtees unter haushaltsnahen Extraktionsbedingungen. Dissertation, Regensburg (2003a)
- Meilhammer, B.; Paper, D.; Franz, G.:** Definierter Arzneipflanzenextrakt auch aus der Teetasse? Pharm. Ztg. 8, 636-643 (2003b)
- Mengs, U. ;:** Zur Sicherheit von Sennalaxanzien. in **Loew, D. (Hrsg.); Rietbrock , N.:** Phytothompharmaka II, Steinkopf Verlag Darmstadt, 161-166 (1996)
- Metzger, W.; Reif, K.:** Determination of 1,8-dihydroxyanthranoids in senna. J. Chromatogr. A. 740, 133-138 (1996)
- Miething, H.; Boventer, W.; Hänsel, R.:** Sennoside in wässriger Zubereitung; Dtsch. Apoth. Ztg. 127, 2587-2588 (1987)
- Mikell, J.R.; Ganzera, M.; Khan, I.A.:** Analysis of sesquiterpenes in *Valeriana officinalis* by capillary electrophoresis. Pharmazie 56 (12), 946-948, (2001)
- Müller, B.M.; Kraus, J.; Franz, G.:** Chemical structure and biological activity of watersoluble polysaccharides from *Cassia angustifolia* leaves. Planta Med. 55, 536-539 (1989)
- Nabeta, K., Nakahara, K., Yonekubo, J., Okuyama, H., Sasaya, T.:** Lignan biosynthesis in *Larix leptolepsis* callus, Phytochemistry 30 (11), 3591-3593, (1991)
- Nahajima, K.; Yamanchi, K.; Kuwano, S.:** Isolation of a new Aloe-Emodin dianthron diglucoside from senna and its potentiating effect on the purgative activity of sennoside A in mice. J. pharm. pharmacol. 37, 703-706 (1985)
- Noller, P.:** Untersuchung der Variabilität von Valerensäuren, Valerenal und Valeranon in Wildpopulationen und in Zuchtmaterial von *Valeriana officinalis*, Dissertation, Gießen, (1989)
- Oshio, H.; Imai, S.; Fujioka, S.; Sugawara, T.; Miyamoto, M.; Tskui, M.:** Investigation of rhubarbs. New purgative constituents, Sennosides E and F., Chem. Pharm . Bull. 22, 823-831 (1974)
- Pentii, H.; Marvola, M.; Parviainen, T. ; Lainonen, H.:** Laxative potency and acute toxicity of some anthraquinone derivatives, senna extracts and fractions of senna extracts. Pharmacol. Toxicol. 61, 153-156 (1987)
- PH.EUR.** (Pharmacopoea Europaea) : Allgemeine Methoden: 2.9.12 Siebanalyse, 4. Ausgabe, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/ Govi Verlag Eschborn, Band 1, 251-252 (2002d)

- PH.EUR.** (Pharmacopoea Europaea) : Allgemeine Methoden : 2.8.17 Trocknungsverlust. 4. Ausgabe, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/ Govi Verlag Eschborn, Band 1, 233 (2002c)
- PH.EUR.** (Pharmacopoea Europaea) : Allgemeine Monographien: Extrakte. 4. Ausgabe, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/ Govi Verlag Eschborn, 3. Nachtrag , 3765-3767 (2002e)
- PH.EUR.** (Pharmacopoea Europaea) : Allgemeine Methoden: 2.8.12 Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls in Drogen. 4. Ausgabe, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/ Govi Verlag Eschborn, Band 1, 227-228 (2002b)
- PH.EUR.** (Pharmacopoea Europaea) : Monographie Nr. 0453 : Baldrianwurzel. 4. Ausgabe, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/ Govi Verlag Eschborn, Band 2, 1245-1247 (2002a)
- PH.EUR.** (Pharmacopoea Europaea): Monographie Nr. 0207 : Alexandriner Sennesfrüchte, 4. Ausgabe, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/ Govi Verlag Eschborn, Band 2, 2851-2852 (2002h)
- PH.EUR.** (Pharmacopoea Europaea): Monographie Nr.0206 : Sennesblätter. 4. Ausgabe, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/ Govi Verlag Eschborn, Band 2, 2848-2849 (2002f)
- PH.EUR.** (Pharmacopoea Europaea): Monographie Nr.1261: Eingestellter Sennesblätter-trockenextrakt. 4. Ausgabe, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/ Govi Verlag Eschborn, Band 2, 2850-2851 (2002g)
- Rabach, H.:** Verfügbarkeit des Wassers in Hilfsstoffen für die Hydrolyse eines Wirkstoff-Modells in Tabletten, Dissertation, Hamburg (1980)
- Ranjith, H., Darmaratne, W., Dhammika Nanayakkara, N.P., Khan, A.:** (-)-3 β ,4 β -Epoxyvalerenic acid from *Valeriana officinalis*. *Planta Med.* 68, 661-662 (2002)
- Rätsch, C.:** Enzyklopädie der psychoaktiven Pflanzen; Botanik, Ethnopharmakologie und Anwendung. Wiss. Verlags Ges., Stuttgart, 587-588 (1998)
- Rezzi, S. ; Ange, B. ; Castola, V.; Casanova, J.:** Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using ¹³C-NMR spectroscopy. Application to the analysis of Oleoresin of *Pinus nigra*. *Appl. Spectroscop.* 56 (3), 312-317 (2002)
- Rimpler, H. (Hrsg) ; Franz, C.; Glasl, H.; Illes, P.; Kleine, B.; Merfort, I.; Wichtl, M.:** Biogene Arzneistoffe, 2. neu bearbeitete Auflage; Dtsch. Apoth. Verlag, Stuttgart, 361-362 (1999)
- Santos, M.S., Ferreira, F., Cunha, A.P., Carvalho, A.P., Macedo, T. :** An aqueous extract of valerian influences the transport of GABA in synaptosomes. *Planta Med.* 60, 278-279, (1994)

- Schimmer, O.; Röder, A.:** Valerensäuren in Fertigarzneimitteln und selbst bereiteten Auszügen aus der Wurzel von *Valeriana officinalis* L.s.l.; Pharm. Ztg. / Wiss. 1, 5./137 ; (1992)
- Schmid, W.; Angliker, E.:** Sennosid C, ein neues Glucosid aus *Cassia angustifolia*. Helv. Chim. Acta. 48, 1911-1921 (1965)
- Schneider, G. (Hrsg.); Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H.:** Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 5. vollst. neu bearbeitete Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg; (1992a): Band 2, 1020-1033; (1992b) Band 4, 1082-1092; (1992c) Band 6, 701-725
- Schneider-Leukel, K.:** Untersuchungen zur Flavonoidfreisetzung aus Drogen und Drogenmischungen bei der Teezubereitung. Dissertation, Regensburg, 27-28 (1994)
- Scholle, S.:** Neue Lignane aus *Valeriana officinalis*: Isolierung, Strukturaufklärung und Radiorezeptorassays. Dissertation, Marburg (1998)
- Schulte, K.E., Reisch, J., Busch, P.:** Ein Acetylenkohlenwasserstoff als Inhaltsstoff der Baldrianwurzel. Arzneim. Forsch. 14, 844, (1964)
- Schultze, W.; Jahn, K.; Richter, R.:** Volatile constituents of the dried leaves of *Cassia angustifolia* and *C. acutifoliae* (Sennae folium). Planta Med. 62, 540-543 (1996)
- Schulz, H.; Stolz, C.; Müller, J.:** The effect of valerian extract on sleep polygraphy in poor sleepers: a pilot study. Pharmacopsychiatry. 27 (4); 147-51 (1994)
- Schulz, H.U. ; Schürer, M.; Silber, W.:** Pharmakokinetische Untersuchungen eines Sennesfrüchteextraktes. Z. Phytother. 19, 190-194 (1998)
- Schulz, V.; Hänsel, R.:** Rationale Phytotherapie; Ratgeber für die ärztliche Praxis, 3. völlig überarbeitete Auflage, Springer Verlag Berlin 84ff (1996)
- Schumacher, B., Scholle, S., Hölzl, J., Khudeir, N., Hess, S., Müller, C.E.:** Lignans isolated from Valerian: Identification and characterization of a new olivil derivative with partial agonistic activity at A₁ Adenosine receptors, J. Nat. Prod. 65, 1479-1485 (2002)
- Stahl, P.H.:** Feuchtigkeit und Trocknen in der pharmazeutischen Technologie. Dr. Dietrich Steinkopp Verlag Darmstadt, 84-89, 121-123 (1980)
- Standardzulassungen für Fertigarzneimittel**, Text und Kommentar. Braun, R. (Hrsg.); 14. Ergänzungslieferung, Monographie Baldrianwurzel (2000)
- Standardzulassungen für Fertigarzneimittel**, Text und Kommentar; Braun, R. (Hrsg.); 12. Ergänzungslieferung, Monographie Sennesblätter (1997)
- Stevinson, C.; Ernst, E.:** Valerian for insomnia: a systematic review of randomized clinical trials. Sleep med. 1 (2), 91-99 (2000)

- Stoll, A.; Becker, B.; Kussmaul.:** Die Isolierung der Anthraglykoside aus Sennadrogen. Helv. chim. acta 32, 1892-1903 (1950)
- Stoll, A.; Becker, B.; Helfenstein, A.:** Die Konstitution der Sennoside. Helv. chim. acta 33, 313-336 (1949)
- Stoll, A.; Seebeck, E.:** Die Isolierung von Hesperitinsäure, Behensäure und von zwei unbekannten Säuren aus Baldrian. Liebigs Ann. Chem. 603, 158-168 (1957)
- Sun, S.W.; Su, H.T.:** Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets. J. Pharm. Biomed. Anal. 29, 881-894 (2002)
- Szentpetery, G.R., Nyomarkay, K.M., Sarkany, S, Horvath, K.B.:** Untersuchung der nicht-flüchtigen Wirkstoffe der ungarischen Arzneibaldriane. Pharmazie 18, 816 (1963)
- Tanaka, H.; Murata, R.; Yoshida, A.; Hayashi, S.:** Analytical studies on the active constituents in crude drugs. The structure of Sennoside G, a new glucoside from Senna. Chem. Pharm. Bull. 30 (5) 1550-1556 (1982)
- Terreaux, C.; Wang, Qi.; Loset, J.-R. ; Ndjoko, K. ; Grimminger, W.; Hostettmann, K.:** Complete LC/MS analysis of a Tinnevely senna pod extract and subsequent isolation and identification of two new benzophenone glucosides. Planta Med. 68, 349-354 (2002)
- Teuscher, G.:** Biogene Arzneimittel, Wiss. Verlags Ges., Stuttgart, 5. Aufl. , 359ff (1990)
- Thies, P.W., Funke, S.:** Über die Wirkstoffe des Baldrians, XIV, Konstitutive Zuordnung der Acyloxysubstituenten in Valepotriaten via ¹³C-NMR-Spektroskopie. Planta Med. 41, 15-20 (1981)
- Thies, P.W.:** Über die Wirkstoffe des Baldrians, Nachweis und Isolierung von sedativ wirksamen Isovaleriansäureestern aus Wurzeln und Rhizomen von verschiedenen *Valeriana*- und *Kentranthus* Arten. Tetrahedron lett. 11, 1155-1163 (1966)
- Thies, P.W.:** Valerosidatum ein Iridoidesterglykosid aus *Valeriana* Arten. Tetrahedron lett. 28, 2471-2472 (1970)
- Thies, P.W.:** Zum chromogenen Verhalten der Valepotriate; 5. Mitteilung über die Wirkstoffe des Baldrians. Arzneim. Forsch. 19, 320-322, (1969)
- Tittel, G.; Chari, V.M.; Wagner, H.:** HPLC-Analyse von *Valeriana mexicana* Extrakten. Planta med. 34, 311-318 (1978)
- Tobler, M.; Schneider, E.:** Naturgerechte Standardisierung von Phytopharmaka. Z. Phytother. 22, 10-21 (2001)

- Torsell, K., Wahlberg, K.:** The structure of the principle alkaloids from *Valeriana officinalis* L., *Tetrahedron lett.* 4, 445-448, (1966)
- Voigt, R.:** Pharmazeutische Technologie; 9.Auflage, Dtsch. Apoth. Verlag, Stuttgart, 477-510 (2000a), 440-456 (2000b)
- Volk, O.H.; Schunk, R.:** Beitrag zur Kenntnis von *Radix Valerianae* aus Franken. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 104, 187-188 (1964)
- Wagner, H.:** Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe. 6. Auflage, Wiss. Verlags Ges. Stuttgart, 131-134 (1999a), 299-300 (1999b)
- Wagner, H.; Hörhammer, L.; Hölzl, J.; Schaette, R.:** Zur Wertbestimmung der Baldrian-Droge und ihrer Zubereitungen. *Arzneim. Forsch.* 8, 1149-1152 (1970)
- Wells, J.I.:** Pharmaceutical preformulation: the physicochemical properties of drug substances, Ellis Horwood Limited Publ. Chichester, 153ff (1988)
- Westendorf, J.:** Pharmakologische und toxikologische Bewertung von Anthranoiden; *Pharm. Ztg.* 138, 3891-3902 (1993)
- Wichtl, M. (Hrsg.):** Teedrogen und Phytopharmaka. 4. Auflage, Wiss. Verlags Ges. Stuttgart, 563-567 (2002)
- Willems, M.:** Chemische und pharmakologische Untersuchungen über Abbauprodukte des Valtrats. Dissertation, Frankfurt (1980)