

**Qualitative und quantitative Analytik von Pflanzen aus der
Traditionellen Chinesischen Medizin am Beispiel von
Artemisiae scopariae herba, Saponnikoviae radix und
Siegesbeckiae herba**



Dissertation

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

vorgelegt von

Rosmarie Barbara Scherübl

aus Regensburg

2014

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern und meiner Schwester Christina

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2010 bis Dezember 2013 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg angefertigt

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 23.01.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2014

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Sigurd Elz (Vorsitzender)

Prof. Dr. Jörg Heilmann (Erstgutachter)

PD Dr. Detlef Manns (Zweitgutachter)

Prof. em. Dr. Gerhard Franz (dritter Prüfer)

Danksagung

Bei Prof. Dr. Jörg Heilmann und Prof. em. Dr. Gerhard Franz möchte ich mich für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten, die fachliche Betreuung und stets gute Kommunikation bedanken.

Darüber hinaus geht mein Dank an:

Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte für den Auftrag zur Erarbeitung der DAB Monographien und die Finanzierung des Projekts, ins besondere an PD Dr. Detlef Manns.

Gabi Brunner und Anne Grashuber für eure praktische Hilfe und freundliche Zusammenarbeit. Ich hoffe, ich habe alles wieder zurückgebracht was ich in den 3,5 Jahren ausgeliehen habe.

Prof. Dr. Fatih und Prof. Dr. Betül Demirci (Anadolu University, Eskişehir) für die GC-FID, GC-MS Messung und Auswertung des ätherischen Öls, sowie bei Hale Gamze Duymus, H. Tuba Kryan, Dr. Fatih Göger für die besonders schöne Zeit in Eskişehir.

Annika Orland und Prof. Werner Knöss (Universität Bonn) für die genetische Untersuchung der Artemisiae scopariae herba Proben und die freundliche Korrespondenz.

Dr. Heidi Heuberger (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung) für die informativen Gespräche, den Wissensaustausch, zur Verfügung stellen von Proben aus deutschem Anbau und der speziellen Ernte von *Artemisia scoparia* Proben.

Dr. Birgit Kraus und Marcel für intensive Gespräche und gute Zusammenarbeit im PB1 Praktikum. Ich hoffe, die PB1-Hitliste wird weitergeführt.

Die Mitarbeiter der Zentralen Analytik, besonders Herr Kiermaier für die Aufnahme der MS- und Herrn Dr. Shenderovich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Meine alte „Laborgang“ Kathi, Susanne und Sebastian für das gute Arbeitsklima, nette Gespräche und die eine oder andere Labordisko ab 17 Uhr.

Die Mädls (Anne, Beata, Kathi, Magda) für unsere Horrorfilmabende, die meist ohne Film endeten (Stößchen).

Dr. Martin Rothenhöfer für viele „Arbeitsbesprechungen“ in der Primo Espressobar.

Dr. Tobias Brem für die Einarbeitung in das Thema.

Dr. Guido Jürgenliemk, Susann, Regina, Sarah, Matej, Daniel, Moni, Markus, Stefan, Edna, Hieu und Ilya für die reibungslose Zusammenarbeit und unterhaltsame Kaffeerunden am Lehrstuhl.

Unsere Sekretärinnen Frau Ohli und Frau Wolf für ihre Hilfe im Bürokratiedschungel.

Die Firma Camag für das zur Verfügung stellen der HPTLC-Geräte, sowie ins besonderen Dr. Eike Reich und Dr. Anita Ankli für die fachliche Diskussionen und Unterstützung.

Die Firmen SinoPhytoMed, Lian Chinaherb und Plantasia (Erich Stöger) für das kostenlose zur Verfügung stellen von Pflanzenmaterial und die Firma Phytolab für Referenzsubstanzen.

Meinen Masterstudent Andrew Beggs und meine Wahlpflichtstudenten Daniela Pemp, Mario Eichenseer und Christina Baur.

Meine Freunde Angelika Falzboden und Tobias Hartl, sowie Amelie und Benni Kaufner, die immer für pharmazeutische und rechtliche Fragen aller Art zu haben sind.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Christina für die Unterstützung während des Studiums und meiner Doktorarbeit, obwohl es kein „Synthesethema“ geworden ist.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen

R. Scherübl, D. Manns, J. Heilmann, G. Franz, Chromatographia 76 (2013) 1537–1543,
Comparison of HPLC versus HPTLC-Densitometry for the Quantification of Chromone
Glucosides in Saponnikoviae divaricatae radix

Scherübl R, Orland A, Demirci B, Knöss W, Heuberger H, Baßer K, Manns D, Franz G,
Heilmann J, in preparation 2014, Morphological, genetic and phytochemical analysis of
Artemisiae scopariae herba from different growing areas

Poster

R. Scheruebl, A. Orland, B. Demirci, W. Knoess, K.H. Baßer, G. Franz, J. Heilmann, Planta Med 77 (2011), Comprehensive Analysis of Artemisiae scopariae herba from different growing areas, 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Antalya

R. Scherübl, A. Beggs, G. Franz, J. Heilmann, D. Manns, Planta Med 78 (2012), Analysis of chromone glycosides in saponnikovia divaricata for the establishment of a monograph of the german pharmacopoeia, 60th International Congress (Joint Meeting with ASP, AFERP, PSE and SIF) and Annual Meeting of GA, New York

Masterarbeit

Andrew Gaeme Beggs, University of Aberdeen, Department of Chemistry, 2012

Inhaltsverzeichnis

1	ALLGEMEINE EINLEITUNG	1
1.1	TRADITIONELLE CHINESISCHE MEDIZIN.....	1
1.1.1	<i>Geschichte und aktuelle Lage.....</i>	1
1.1.2	<i>Philosophische Grundlagen der TCM.....</i>	2
1.1.3	<i>Wissenschaftlich dokumentierte Erfolge der TCM</i>	4
1.2	AKTUELLE PROBLEMATIK VON TCM-DROGEN DES EUROPÄISCHEN MARKTES	5
1.2.1	<i>Identifizierung</i>	5
1.2.2	<i>Processing.....</i>	6
1.2.3	<i>Verunreinigung mit Schwermetallen, Pestiziden und synthetischen Arzneimitteln</i>	7
1.2.4	<i>Toxikologie</i>	8
1.3	RECHTLICHE EINORDNUNG VON TCM-DROGEN.....	10
1.4	ANFORDERUNGEN DES ARZNEIBUCHES.....	11
1.5	IMPLEMENTIERUNG VON TCM-DROGEN IN DAS DEUTSCHE UND EUROPÄISCHE ARZNEIBUCH	12
2	ZIELSETZUNG.....	17
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	VERWENDETE CHEMIKALIEN	18
3.2	VERWENDETE REFERENZSUBSTANZEN	19
3.3	VERWENDETE MATERIALIEN	19
3.4	VERWENDETES DROGENMATERIAL	20
3.4.1	<i>Artemisiae scopariae herba.....</i>	20
3.4.2	<i>Saposhnikoviae radix.....</i>	21
3.4.3	<i>Siegesbeckiae herba</i>	22
3.5	VERWENDETE GERÄTE	23
3.6	VERWENDETE METHODEN.....	24
3.6.1	<i>Makroskopische Beschreibung</i>	24
3.6.2	<i>Mikroskopische Beschreibung</i>	24
3.6.3	<i>Dünnschichtchromatographie (DC und HPTLC)</i>	25
3.6.3.1	Durchführung:	25
3.6.3.2	Derivatisierungsreagenzien	25
3.6.4	<i>Reinheitsbestimmungen</i>	26
3.6.4.1	Bestimmung des Trocknungsverlustes	26
3.6.4.2	Bestimmung der Asche.....	27
3.6.4.3	Bestimmung der Salzsäureunlöslichen Asche.....	27
3.6.5	<i>Gehaltsbestimmungen</i>	27
3.6.5.1	Gehaltsbestimmung mit HPLC.....	27

Inhaltsverzeichnis

3.6.5.2	Gehaltsbestimmung mit HPTLC/Densitometrie	27
3.6.6	<i>Genetische Untersuchung der verschiedenen Artemisia spec. Herkünfte</i>	28
3.6.6.1	DNA Isolierung und Amplifizierung	28
3.6.6.2	Probenaufarbeitung und Sequenzierung.....	28
3.6.6.3	Auswertung	29
3.6.7	<i>Gaschromatographische Untersuchungen</i>	29
3.6.7.1	Gehaltsbestimmung des Ätherischen Öls.....	29
3.6.7.2	GC-FID Untersuchung	29
3.6.7.3	GC-MS Identifizierung	30
3.6.8	<i>TLC-MS Kopplung</i>	31
3.6.9	<i>Isolierung und Identifizierung des charakteristischen Flavonoids aus Artemisiae scopariae herba aus deutschem Anbau</i>	32
3.6.9.1	Extraktherstellung	32
3.6.9.2	Isolierung.....	32
3.6.9.3	NMR-Spektroskopie.....	33
3.6.9.4	Massenspektrometrie	33
3.6.10	<i>Validierung der Prüfung auf Identität mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie</i>	33
3.6.10.1	Methodenbeschreibung	33
3.6.10.2	Validierung	35
3.6.11	<i>Validierung von Gehaltsbestimmungen mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie</i>	39
3.6.11.1	Methodenbeschreibung	39
3.6.11.2	Validierung	40
3.6.12	<i>Validierung der Gehaltsbestimmung mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie/Densitometrie</i>	52
3.6.12.1	Methodenbeschreibung	52
3.6.12.2	Validierung	54
4	HAARIGES BESENBEIFÜKRAUT	61
4.1	EINLEITUNG	61
4.2	METHODEN	65
4.2.1	<i>Dünnschichtchromatographie</i>	65
4.2.2	<i>Flüssigkeitschromatographie</i>	69
4.3	MAKROSKOPISCHE BESCHREIBUNG.....	71
4.4	MIKROSKOPISCHE BESCHREIBUNG.....	73
4.5	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG.....	74
4.5.1	<i>Untersuchung verschiedener Fingerprints der vorhandenen Inhaltsstoffe</i>	74
4.5.1.1	Flavonoidglykoside	74
4.5.1.2	Sesquiterpenlactone.....	75
4.5.1.3	Ätherisches Öl	76
4.5.2	<i>Evaluation der neuen Monographie ChP 2010</i>	77
4.5.2.1	Mianyinchen (Frühjahrsdroge)	77

4.5.2.2	Huayinchen- Yinchenhao (Herbstdroge)	78
4.5.3	<i>Chlorogensäure als analytischer Marker</i>	79
4.5.3.1	Fließmittelsysteme in der Ph. Eur.....	79
4.5.3.2	Validierung	81
4.5.4	<i>Chromatographische Unterscheidung (Fingerprint) der verschiedenen Erntezeitpunkte von Artemisiae scopariae herba</i>	89
4.6	REINHEITSUNTERSUCHUNGEN	91
4.6.1	<i>Trocknungsverlust</i>	91
4.6.2	<i>Asche</i>	92
4.6.3	<i>Salzsäureunlösliche Asche</i>	94
4.7	GEHALTSBESTIMMUNG MITELS HPLC.....	96
4.7.1	<i>Chlorogensäure: Evaluation von Gehaltsbestimmungen nach ChP und Ph. Eur</i>	96
4.7.2	<i>Validierung</i>	96
4.7.2.1	Stabilität des Extraktes	97
4.7.2.2	Spezifität.....	97
4.7.2.3	Kalibrierung	99
4.7.2.4	Wiederholpräzision	102
4.7.2.5	Laborpräzision	103
4.7.2.6	Probenauswertung und Prognoseintervall	104
4.7.2.7	Robustheit	104
4.7.2.8	Wiederfindung.....	105
4.7.2.9	Nachweisgrenze	105
4.7.2.10	Quantifizierungsgrenze	105
4.8	CHROMATOGRAPHISCHE UNTERScheidUNG VON <i>ARTEMISIA CAPILLARIS</i> THUNB. UND <i>ARTEMISIA SCOPARIA</i> WALDST. ET KIT.	
	105	
4.8.1	<i>HPTLC</i>	106
4.8.2	<i>HPLC</i>	106
4.9	ANALYSE DES GENETISCHEN FINGERPRINTS VON <i>ARTEMISIAE SCOPARIAE</i> HERBA VERSCHIEDENER HERKÜNFTEN	108
4.10	GASCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG DES ÄTHERISCHEN ÖLS VON <i>ARTEMISIAE SCOPARIAE</i> HERBA	112
4.10.1	<i>Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls</i>	112
4.10.2	<i>GC-FID Untersuchung</i>	113
4.10.3	<i>GC-MS Identifizierung der Bestandteile des ätherischen Öls</i>	115
4.11	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG EINES CHARAKTERISTISCHEN FLAVONOIDS AUS <i>ARTEMISIAE SCOPARIAE</i> HERBA AUS BAYERISCHEM ANBAU	122
4.12	DISKUSSION DER ERGEBNISSE-HAARIGES BESENBEIFÜLKRAUT.....	125
5	SAPOSHNIKOVIAWURZEL.....	131
5.1	EINLEITUNG	131
5.2	METHODEN.....	135
5.2.1	<i>Dünnschichtchromatographie</i>	135

Inhaltsverzeichnis

5.2.2	<i>Flüssigkeitschromatographie</i>	137
5.3	MAKROSKOPISCHE BESCHREIBUNG	138
5.4	MIKROSKOPISCHE BESCHREIBUNG	139
5.5	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN	140
5.5.1	<i>Untersuchung verschiedener Fingerprints</i>	140
5.5.1.1	Ätherisches Öl: Nachweis von Panaxynol	140
5.5.1.2	ChP 2010: Chromonglucoside als Markersubstanzen	141
5.5.1.3	Fließmittelloptimierung der DC-Trennung	141
5.5.1.4	Validierung	142
5.6	REINHEITSUNTERSUCHUNGEN	151
5.6.1	<i>Trocknungsverlust</i>	151
5.6.2	<i>Asche</i>	152
5.6.3	<i>Salzsäureunlösliche Asche</i>	153
5.7	GEHALTSBESTIMMUNGEN	154
5.7.1	<i>HPLC</i>	154
5.7.1.1	Optimierung	154
5.7.1.2	Validierung	155
5.7.1.3	Stabilität des Extraktes	156
5.7.1.4	Spezifität	156
5.7.1.5	Kalibrierung	156
5.7.1.6	Wiederholpräzision	162
5.7.1.7	Laborpräzision	163
5.7.1.8	Probenauswertung und Prognoseintervall	163
5.7.1.9	Robustheit	164
5.7.1.10	Wiederfindung	165
5.7.1.11	Nachweisgrenze	165
5.7.1.12	Quantifizierungsgrenze	165
5.7.2	<i>HPTLC/Densitometrie</i>	166
5.7.2.1	Optimierung der HPTLC Methode	166
5.7.2.2	Validierung	167
5.7.2.3	Spezifität	169
5.7.2.4	Kalibrierung	170
5.7.2.5	Wiederholpräzision	175
5.7.2.6	Laborpräzision	176
5.7.2.7	Probenauswertung und Prognoseintervall	176
5.7.2.8	Robustheit	177
5.7.2.9	Wiederfindung	178
5.7.2.10	Nachweisgrenze	178
5.7.2.11	Quantifizierungsgrenze	178
5.8	UNTERSUCHUNGEN DES ÄTHERISCHEN ÖLS	179
5.8.1	<i>Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls</i>	179
5.8.2	<i>GC-FID Untersuchung</i>	179

5.8.3 <i>TLC- MS Identifizierung</i>	180
5.9 UNTERSUCHUNG DER PROBEN BAYERISCHER HERKUNFT	181
5.9.1 <i>Dünnschichtchromatographische Untersuchung</i>	181
5.9.2 <i>Gehaltsbestimmung</i>	183
5.9.2.1 HPLC	184
5.9.2.2 HPTLC/Densitometrie	186
5.9.2.3 Vergleich beider Methoden.....	187
5.10 DISKUSSION DER ERGEBNISSE-SAPOSHNIKOVIAWURZEL	188
6 SIEGESBECKIENKRAUT.....	193
6.1 EINLEITUNG	193
6.2 METHODEN	197
6.2.1 <i>Dünnschichtchromatographie</i>	197
6.2.2 <i>Flüssigkeitschromatographie</i>	199
6.3 MAKROSKOPISCHE BESCHREIBUNG.....	200
6.4 MIKROSKOPISCHE BESCHREIBUNG.....	201
6.5 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG.....	203
6.5.1 <i>Untersuchung verschiedener Fingerprints</i>	203
6.5.1.1 Flavonoide	204
6.5.1.2 Lipophile Komponenten	205
6.5.2 <i>Evaluation der Monographie von Siegesbeckiae herba im ChP 2010</i>	206
6.5.2.1 Optimierung	207
6.5.2.2 Validierung	207
6.5.3 <i>Fingerprint unterschiedlicher Stammpflanzen</i>	216
6.5.4 <i>Analytik verschiedener Siegesbeckiae herba Granulate</i>	217
6.6 REINHEITSUNTERSUCHUNGEN	219
6.6.1 <i>Trocknungsverlust</i>	219
6.6.2 <i>Asche</i>	220
6.7 GEHALTSBESTIMMUNGEN.....	221
6.7.1 <i>HPLC</i>	221
6.7.1.1 Vergleich verschiedener Detektoren	221
6.7.1.2 Optimierung der Gehaltsbestimmungsmethode.....	223
6.7.1.3 Validierung	225
6.7.1.4 Stabilität des Extraktes	225
6.7.1.5 Spezifität.....	226
6.7.1.6 Kalibrierung	226
6.7.1.7 Wiederholpräzision	230
6.7.1.8 Laborpräzision	231
6.7.1.9 Probenauswertung und Prognoseintervall	232
6.7.1.10 Robustheit	232
6.7.1.11 Wiederfindung.....	233

Inhaltsverzeichnis

6.7.1.12	Nachweisgrenze	233
6.7.1.13	Quantifizierungsgrenze	233
6.7.2	<i>HPTLC/Densitometrie</i>	234
6.7.2.1	Optimierung	234
6.7.2.2	Validierung	234
6.7.2.3	Spezifität.....	237
6.7.2.4	Kalibrierung	237
6.7.2.5	Wiederholpräzision	241
6.7.2.6	Laborpräzision.....	242
6.7.2.7	Probenauswertung und Prognoseintervall	243
6.7.2.8	Robustheit	243
6.7.2.9	Wiederfindung.....	244
6.7.2.10	Nachweisgrenze	245
6.7.2.11	Quantifizierungsgrenze	245
6.8	DISKUSSION DER ERGEBNISSE-SIEGESBECKENKRAUT.....	246
7	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	251
8	SUMMARY	253
9	MONOGRAPHIEVORSCHLÄGE FÜR DAS DAB	255
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	282
11	LITERATUR	283

1 Allgemeine Einleitung

1.1 Traditionelle Chinesische Medizin

1.1.1 Geschichte und aktuelle Lage

Die Traditionelle Chinesische Medizin (TCM) beruht auf über tausendjähriger empirischer Anwendung und stetiger Verbesserung von traditionellen Rezepturen. Bis ins frühe 19. Jahrhundert, zu Zeit der Opiumkriege, als englische Missionare konventionelle Arzneimittel nach China brachten, wurde dort lediglich TCM praktiziert. Die ersten schriftlich niedergelegten Funde ca. 500 v. Chr. beinhalteten 120 Drogenbeschreibungen pflanzlichen, tierischen und mineralischen Ursprungs. Im 3. Jahrhundert n. Chr. wurde zur Therapie mit Drogendekokten die Akupunktur und nach und nach das Schröpfen, Qigong, Massagen und Moxibustion, das Erwärmen bestimmter Punkte im Körper, hinzugefügt. Als Endpunkt der Entwicklung der klassischen TCM wird die Qing-Zeit (1644-1911 n. Chr.) genannt, in der der Gelehrte Zhao Xue Min 1765 n. Chr. den Nachtrag zum „Ben Cao Gang Mu“ (Leitfaden der Materia Medica) herausgab, worauf die Zahl der in China verwendeten Drogen auf 2608 stieg [1].

Die Akzeptanz der TCM, als Teil der nichtkonventionellen Medizin ist heutzutage in der Westlichen Welt höher denn je. Die USA gelten mit einem Volumen von ca. 7,6 Milliarden US\$ (2010) als größter Importeur von chinesischen traditionell angewandten Drogen, gefolgt von Europa mit 2 Milliarden US\$ und einem prognostizierten Wachstum von 10% pro Jahr [2]. Diese Entwicklung spiegelt sich auch in China wider. Obwohl sich zurzeit weniger asiatische Patienten allein auf TCM verlassen, stiegen die Investitionen in die Erforschung von TCM-Drogen von 2001 auf 2010 um das Vierfache auf 770,5 Millionen US\$ [2]. Bedingt durch die hohe Nachfrage sind allerdings sowohl einige pflanzliche als auch tierische Drogen auf der Liste der bedrohten Arten mit der Konsequenz, dass der Export z. T. eingeschränkt werden musste [3].

Allgemeine Einleitung 2

1.1.2 Philosophische Grundlagen der TCM

Grundlage der TCM ist das freie Fließen an Qi (Lebensenergie), bedingt durch ein Gleichgewicht von Yin und Yang im Körper. Yin und Yang bezeichnen dabei immer ein Gegensatzpaar wie Sonne (Yang) und Mond (Yin) oder Tag und Nacht, das bei Ungleichgewicht die Qiströme blockiert. Der Fluss des Qi im Körper wird durch die fünf Wandlungsphasen, die jeweils zwei Organen zugeordnet werden, repräsentiert. Die menschlichen Organe sind dabei durch Meridiane mit der Körpermitte verbunden und sichern damit die Qidynamik. Alle Wandlungsphasen stehen miteinander in Verbindung, können ineinander übergehen und spiegeln die Wandlung der Natur im Körper wider. Bei Kindern kann eine gestörte Holz-Wandlungsphase zu Wachstumsschwierigkeiten führen, da Holz mit Wachstum und Frühjahr assoziiert wird (Tabelle 1) [1].

Tabelle 1: Beschreibung der fünf Wandlungsphasen in der TCM

Wandlungsphase	Holz	Feuer	Erde	Metall	Wasser
Organe	Leber, Galle	Herz, Dünndarm	Milz, Magen	Lunge, Dickdarm	Niere, Blase
Geschmack	Sauer	Bitter	Süß	Scharf	Salzig
Jahreszeit	Frühling	Sommer	Spätsommer	Herbst	Winter
Farbe	Grün	Rot	Gelb	Weiß	Schwarz

Das Ungleichgewicht von Yin und Yang wird somit als Ursache von Erkrankungen angesehen und kann in drei Klassen eingeteilt werden:

- die äußeren klimatischen Faktoren (Wind, Kälte, Feuchtigkeit, Feuer, Sommerhitze und Trockenheit), da sie die Funktionen des Körpers und somit den Qifluss stören
- die inneren emotionalen Faktoren (Wut, Freude, Grübeln, Trauer, Angst, Sorge und Schock), da Körper und Geist nicht getrennt voneinander sind. So lässt beispielsweise Zorn das Qi zu Kopf steigen und verursacht damit Kopfschmerzen und Leberschäden
- falsche Lebensführung zu denen Ernährung, aber auch Schicksalsschläge und Unfälle zählen

Diagnostiziert werden diese Verschiebungen der Energie, respektive des Ungleichgewichtes von Yin und Yang, durch Betrachtung der Haut (Farbe, Schwitzen), der Zunge (Form, Farbe, Belag), Interpretation der Stimme (Husten, Atemgeräusche) und des Geruchs sowie Abtasten des Körpers und des Pulses und eine Befragung nach dem allgemeinen Empfinden (Temperatur, Appetit, Ausscheidungen) [4]. Anders als in der westlichen Medizin beginnt in der TCM die Behandlung nicht erst bei Ausbrechen der Erkrankung, sondern bei den ersten augenfälligen Anzeichen eines Ungleichgewichts der Wandlungsphasen.

Die TCM Therapie erfolgt meist mit pflanzlichen, tierischen oder mineralischen Drogen, die nach verschiedenen Eigenschaften eingeteilt sind [1], [4]:

- Geschmacksrichtung (Wu Wei): scharf, süß, sauer, bitter, salzig und neutral
Die Geschmacksrichtung stellt die Grundtendenz der Droge dar. So wirken scharf schmeckende Drogen zerstreuend, nach außen treibend und Poren öffnend. Sie beinhalten zumeist Alkaloide oder ätherisches Öl. Süße Drogen (Aminosäuren, Schleime, Glykoside) werden wegen ihres aufbauenden Charakters häufig zur Harmonisierung anderer Drogen verwendet. Eine Droge kann jedoch mehrere Geschmacksrichtungen besitzen.
- Temperaturverhalten: heiß, warm, neutral, kühl und kalt
Heiße und warme Drogen werden bei Erkrankungen, die durch Kälte und Feuchtigkeit ausgelöst werden, verwendet. Eine Droge kann dabei nur ein Temperaturverhalten zeigen.
- Wirksamkeit, Toxizität: Stark giftig, mäßig giftig, schwach giftig und ungiftig
Der Begriff Toxizität (duxing) bedeutet hier drastische Wirkung und nicht Giftigkeit nach Verständnis der westlichen Medizin.
- Wirkrichtung, Wirktendenz: Steigen, Fallen, Schweben und Sinken
Steigen bedeutet nach oben gerichtete Wirkung, Fallen nach unten, Schweben nach oben und nach außen und Sinken nach unten und nach innen.
- Meridianbezug

Allgemeine Einleitung 4

Nach neueren Erkenntnissen wird bei pflanzlichen Drogen die Qualität und Wirksamkeit einer Droge auch durch den Anbauort bestimmt. Pflanzliches Material aus bestimmten geographischen Bereichen wird als geoauthentisch oder „Top-geoherb“ bezeichnet, da die Inhaltsstoffzusammensetzung aufgrund ökologischer oder genetischer Variationen unterschiedlich sein kann. So ist beispielsweise der Phenolgehalt in *Magnoliae officinalis cortex* in den Proben aus Sichuan sechsmal höher als in den aus Jiangxi stammenden [5]. Die Dao di Region, also diejenige in der die beste Drogenqualität erreicht wird, ist für jede Droge unterschiedlich. Auf Seite der Importeure fehlen jedoch häufig Informationen zum Anbau und der Ernte der jeweiligen Materialien.

1.1.3 Wissenschaftlich dokumentierte Erfolge der TCM

Neben der erfolgreichen Therapie verschiedenster Krankheiten weltweit mit pflanzlichen, tierischen oder mineralischen TCM-Drogen, stellt die Entdeckung von Artemisinin als Leitstruktur in der Malariabehandlung eine der größten Errungenschaft der TCM dar [6]. Artemisininderivate, die halbsynthetisch aus *Artemisia annua* L. hergestellt werden, stellen eine neue und einzigartige Stoffklasse unter den Antimalariamitteln dar [7]. Ein weiteres Beispiel für Wirkstoffe aus dem Bereich der TCM ist das mineralische Arsen(III)oxid (As_2O_3), das bei Promyelozytenleukämie, einer Sonderform der akuten myeloischen Leukämien erfolgreich verwendet wird und unter dem Handelsnamen Trisenox zugelassen ist [8].

Huperzin A aus *Huperzia serrata* (THUNB.) TREVIS. zeigte in mehreren klinischen Studien gute Erfolge als Acetylcholinesterasehemmer und wird in China als Alzheimertherapeutikum verwendet. In den USA und Europa konnte das Medikament wegen fehlender klinischer Daten noch nicht zugelassen werden [9].

Dia Xin Xue Kang Kapseln sind das einzige derzeit in Europa zugelassene TCM-Arzneimittel. Sie beinhalten 100 mg getrockneten Wasserextrakt aus *Dioscorea nipponica* MAKINO und werden bei Kopf- und Muskelschmerzen angewendet. Die im Mai 2012 erhaltene Zulassung beschränkt sich derzeit jedoch nur auf die Niederlande und nicht auf ganz Europa [10]. Weitere europäische Zulassungen mit erweiterten Indikationsspektren sind vorgesehen.

1.2 Aktuelle Problematik von TCM-Drogen des europäischen Marktes

1.2.1 Identifizierung

Die in Europa bislang unbekannten, aber in China traditionell verwendeten Pflanzen sorgen hierzulande in manchen Fällen für Verwirrung, da unterschiedliche Arzneien teilweise ähnlich klingende oder sogar denselben volkstümlichen Namen aufweisen [11]. So wurde z. B. in den 90er Jahren *Stephania tetranda* S. MOORE, auch „Fen Fangji“ genannt, mit *Aristolochia fangchi* Y. C. WU EX L. D. CHOW ET S. M. HWANG („Guang Fangji“) verwechselt, da beide mit „Fangji“ abgekürzt oder falsch übersetzt wurden. Die in Aristolochiaarten in hohen Mengen enthaltene Stoffklasse der Aristolochiasäuren führte bei Patienten in Belgien und anderen europäischen Ländern zu akutem Nierenversagen und Karzinomen [12]. Ähnliches wurde für *Solanum lyratum* THUNB. und *Aristolochia mollissima* HANCE beschrieben, die denselben Trivialnamen „Baimaoteng“ teilen [13]. Erschwerend kommt hinzu, dass im asiatischen Raum für einige pflanzliche Drogen und Rezepturen je nach Land (China, Japan, Korea) unterschiedliche Stammpflanzen und Zusammensetzungen der Rezepturen beschrieben werden [11]. Ein weiteres Problem stellt die Verwendung von lokalen Varietäten in manchen Regionen dar. Bedingt durch die klimatischen Unterschiede von Nord- und Südchina können nicht alle Pflanzen überall angebaut werden. Es entstehen Versorgungslücken durch ungenügende Transportsysteme zur Belieferung aller chinesischen Provinzen. Deshalb wurden in manchen Regionen anstelle der herkömmlich verwendeten Droge, lokal angebaute Pflanzen, die eine ähnliche Wirkung zeigten, verwendet. So wird z. B. *Salvia przewalskii* MAXIM. („gan su dan shen“) in Sichuan, Yunnan und Tibet noch heute anstelle der im ChP 2010 offiziell beschriebene Art *Salvia miltiorrhiza* BGE. („dan shen“) verwendet [14]. Ferner finden sich, unter den in der TCM verwendeten Arzneipflanzen ca. 50% Radix- oder Rhizomdrogen, die entweder längs oder quergeschnitten („sliced“) sind und ein z. T. sehr ähnliches Aussehen zeigen. Meistens ist daher durch makroskopische Untersuchungen die Identität der Droge nicht eindeutig feststellbar. So geschieht es häufig, dass *Spatholobus suberectus* DUNN. mit *Sargentodoxa cuneata* (OLIV.) REHD. ET WILS. verwechselt wird, wie aus Hongkong berichtet, obwohl beide Drogen eine unterschiedliche Indikation und Inhaltsstoffe, aber ein ähnliches Aussehen besitzen [11].

1.2.2 Processing

Processing, oder auch „Pao Zhi“ genannt, ist in Europa unüblich, wird allerdings in China bei den meisten TCM-Drogen durchgeführt. Darunter versteht man eine Vorbehandlung des pflanzlichen, tierischen oder mineralischen Materials nach Gewinnung und Trocknung. Wobei das Entfernen von Blättern und Haaren, aber auch des Schneiden von Wurzel und Rhizomdrogen nach Wässerung in Längs- oder Querscheiben zur Oberflächenvergrößerung und Säuberung ebenfalls zu den Processingmethoden zählt. Größtenteils werden die Drogen, zum Entfernen von unangenehmen Gerüchen und Geschmack entweder mit Wasser oder mit Hitze behandelt. Dazu gehören das Trocknen ohne Flüssigkeit, das Verkohlen, das Erhitzen mit Honig, Ingwer oder Reiswein und weiteren Hilfsstoffen und das Calzifizieren bis zur Rotglut, was bei Mineralien Anwendung findet [15]. Häufig werden Hitze- und Wasserbehandlung kombiniert und die Drogen mit Wasser oder anderen Flüssigkeiten (Hilfsstoffen) gekocht oder gedämpft. Diese wenig standardisierten komplexen Methoden dienen Großteils der Veränderung der therapeutischen Wirkung oder zur Reduzierung von Nebenwirkungen sowie der Toxizität [16]. Eines der bekanntesten Beispiele zum Thema „Processing“ ist Aconiti radix (*Aconitum carmichaeli* DEBx.) mit der behandelten Form Aconiti lateralis radix praeparata (chin. Fu Zi). Während die Rohdroge einen Gehalt an Aconitin, Mesaconitin und Hypaconitin bis zu 0,17% besitzt, ist der Anteil in „Fu Zi“ 70-90% geringer [17]. Der Gehalt an toxischen Diterpenalkaloiden hängt dabei stark von der Art der Zubereitung, des Anbauortes und des Processings ab.

Das heutige Processing unterscheidet sich teilweise von den vor 500 v. Chr. erstmals schriftlich festgehaltenen Methoden. Aufgrund technologischer Entwicklungen, aber auch durch mangelhafte Übersetzung, wurden viele Processingmethoden optimiert. Hinzu kommt, dass Processingmethoden sowohl in den verschiedenen chinesischen Provinzen, in Hongkong und anderen asiatischen Ländern für dieselbe Droge uneinheitlich angewendet werden. Angelicae sinensis radix wird beispielsweise in Vietnam mit Ethanol (40%) in Japan mit heißem Wasser und in China mit Reiswein gekocht [13].

In ChP 2010 findet sich darüber hinaus keine Spezifikation zu den verwendeten Processinghilfsstoffen, lediglich Angaben wie z. B. „yellow rice wine“ ohne genaue Beschreibung der Konzentration oder der zu verwendenden Gefäße. Aufgrund der fehlenden

Informationen zur Durchführung sowie authentischem Drogenmaterial, an denen die verschiedenen Processingschritte nachvollzogen werden können, sind bis jetzt ausschließlich Monographien unbehandelter TCM-Drogen in das Ph. Eur implementiert worden. Dennoch ist Processing ein wichtiger Teil der TCM und sollte daher in der achten Version des europäischen Arzneibuchs im Detail beschrieben werden.

1.2.3 Verunreinigung mit Schwermetallen, Pestiziden und synthetischen Arzneimitteln

Seit Mitte der Neunziger Jahre tauchen immer wieder Berichte über Schwermetallvergiftungen durch Drogen aus Fernost auf. Wu et al. berichtete 1990 von einem dramatischen Fall in Taiwan, bei dem zwei Patienten Cordyceps Pulver einnahmen, dass 20 000 ppm Blei enthielt [18]. Die Höchstmenge für pflanzliche Drogen im Ph. Eur liegt bei Blei bei 5 ppm. Darüber hinaus sind Vergiftungen mit Arsen und Quecksilber in den USA [19], sowie mit Cadmium in Taiwan [20] bekannt. Ein Erklärungsansatz für so hohe Schwermetallbelastungen könnte einerseits die starke Umweltverschmutzung in einigen asiatischen Ländern und somit eine Belastungen der Anbauflächen sein [21]. Nachweise von Schwermetallen in TCM Rezepturen können andererseits durchaus gewollt sein, da Mineralien wie Kalomel (Hg_2Cl_2) und Regular (As_2S_2) in der TCM als Therapeutikum verwendet werden. Die Verunreinigung mit Quecksilber oder Arsen könnten auch durch nicht ordnungsgemäß gesäuberte Produktionsstätten zustande kommen. Obwohl immer noch von Vergiftungen berichtet wird [22], hat sich die globale Situation deutlich verbessert. Eine Studie, bei der 344 verschiedene TCM-Drogen untersucht wurden zeigte, dass nur bei 1% der Proben der Grenzwert für Schwermetalle und bei 5% für Pestizide überschritten war [23].

Problematischer erscheint eher die Untermischung von synthetischen Arzneimitteln mit Drogen der TCM, um eine schnellere und bessere Wirksamkeit zu erzielen. So wurden unter anderem in Rezepturen zur oralen und topischen Applikation Corticoide [24], [25], Schmerzmittel wie Phenylbutazon und Diclofenac [26] und Ephedrin [27] gefunden, was zu Chushing-Syndrom und starken Psychosen führte. Das Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker stellte neben den schon angedeuteten Verunreinigungen zudem eine Kontamination mit Aflatoxin B1 bei Biotae semen (*Biota orientalis*, Cupressaceae) fest [28]. Ähnliche Funde wurden in der TCM-Klinik in Bad Kötzting für die fetthaltige Samendroge gemacht [29]. Aflatoxine sind in der Praxis für andere Drogen eher selten aufzufinden, seit

Allgemeine Einleitung 8

der Aflatoxin VerbotsV 2000 [30] muss jedoch jede Droge darauf getestet und bei einem positiven Fund aus dem Verkehr gezogen werden.

1.2.4 Toxikologie

Im Gegensatz zur westlichen Medizin werden in der TCM auch Giftstoffe enthaltende Pflanzen zur Therapie verwendet. Allerdings werden diese nicht als Einzeldroge, ohne vorherige Behandlung (Processing) oder nur als abgekochte wässrige Zubereitungen (Dekokt) verabreicht. Um die therapeutische Gesamtwirkung sowie mögliche Nebenwirkungen zu beurteilen, werden TCM-Drogen in Klassen eingeteilt und mit anderen Drogen kombiniert [16]. Arzneien mit „übergagendem Status“ haben eine gute Wirksamkeit und wenig bis keine Nebenwirkungen. So gehört beispielsweise Ginseng radix et rhizoma zu dieser Klasse und kann bedenkenlos über einen längeren Zeitraum eingenommen werden. Ephedrae herba gehört hingegen zur zweiten Klasse mit „mittelmäßigem Status“ d. h. die Droge ist effektiv, zeigt jedoch auch toxische Nebenwirkungen. Ephedrae herba sollte somit nicht über einen längeren Zeitraum und nur unter ärztlicher Überwachung angewendet werden. Zur dritten Gruppe mit dem niedrigsten Status gehört z. B. Aconiti radix lateralis praeparata (Fu Zi), die bei nicht ordnungsgemäßem Processing und praktischer Anwendung mehr Nebenwirkung als therapeutische Effekte aufweist. Vertreter aus letzter Gruppe werden wegen ihrer therapeutischen Schlüsselwirkung bei bestimmten Indikationen unter strenger Kontrolle eingesetzt, haben allerdings in der TCM Praxis einen hohen Stellenwert. Da TCM-Drogen meist nie einzeln verabreicht werden, sondern Teil komplexer Rezepturen sind, ist die Gesamttoxizität oftmals schwer zu beurteilen. Eine traditionelle Rezeptur gliedert sich in Kaiser und Minister, die für die Hauptwirkung zuständig sind sowie Assistent und Bote, die die Nebenwirkungen abschwächen sollen [31]. Ein Beispiel für solch eine „Entgiftungsdroge“ ist Glycyrrhizae radix, die den Gehalt von Aconitin in Fu Zi durch eine gesteigerte Hydrolyse während des Processing, verringert.

Im Rahmen der Giftigkeit von Materialien aus der TCM muss, wie in der westlichen Medizin, zwischen akuter und chronischer Toxizität unterschieden werden [32]. Akute Toxizität ist konzentrationsabhängig und kann einem pharmakologischen Target zugeordnet werden, bei chronischer Toxizität jedoch zeigen sich die Symptome z. T. erst nach Jahren und können häufig nicht mehr mit der verursachenden Arzneidroge in Verbindung gebracht werden. Zu den akut toxischen Drogen gehört neben anderen Ephedrae herba wegen des hohen L-Ephedrin- und Pseudoephedringehalts, Aconiti radix aufgrund des Vorkommens an

Diterpenalkaloiden (Aconitin) und Xanthii fructus, welche erhebliche Mengen des stark giftigen Diterpens Atractylosid enthalten. Im Gegensatz zu Ephedrae herba können Aconiti radix und Xanthii fructus durch Processing entgiftet werden, wobei die Toxizität maßgeblich von der Processingmethode und ausreichender Zeit der Abkochung (Dekoktierung) abhängt [33].

Aristolochiasäurehaltige Pflanzen sind ein in der Praxis vorkommendes Beispiel für chronische Toxizität. Die mutagenen und kanzerogenen Alkaloide kommen in mindestens 30 Spezies der Familie der Aristolochiaceen in der Gattung *Aristolochia* und *Asarum* vor [34] und führen durch die Bildung von DNA-Adukkten zu Schädigung oder Mutation an verschiedenen Chromosomen [35].

Die in einigen TCM-Drogen vorhandenen Pyrrolizidinalkaloide rufen ebenfalls akute und chronische Toxizität hervor. Unter den alkaloidhaltigen Asteraceen werden in China *Senecio*- und *Tussilago*-Arten sowie verschiedene Boraginaceen und Fabaceen traditionell angewendet [36]. Untersuchungen zu *Senecionis scandentis* herba ergaben eine Vielzahl an Pyrrolizidinalkaloiden [37], obwohl der wässrige Extrakt der Droge von 6 g/kg bei Ratten keine akute Lebertoxizität zeigte. Aufgrund jüngster Funde von deutlichen Mengen an Pyrrolizidinalkaloiden in einheimischen Kräutertees und Arzneidrogen [38], sollte dieses Problem nicht außer Acht gelassen und bei der Implementierung bekannter alkaloidhaltiger TCM-Drogen darauf Rücksicht genommen werden.

Problematisch sind ebenfalls Wechselwirkungen von TCM-Drogen mit definierten Arzneistoffen. Bei gleichzeitiger Einnahme von synthetischen Arzneimittel und TCM-Drogen mit einem ähnlichen Wirkprofil kann es zu schweren Wechselwirkungen oder synergistischen Effekten kommen [16]. Hierbei sollten Arzneidrogen wie Ephedrae herba, die sympathomimetische Wirkung zeigen, nicht von Patienten angewendet werden die unter Hypertonie, Epilepsie oder Diabetes leiden, da die Droge z. B. die Wirkung von gleichzeitig verabreichten Betablockern herabsetzen kann. Ginkgo folium (Yin Xing Ye) und Salviae miltiorrhizae radix (Dan shen) werden verwendet, um den Blutfluss des Körpers zu verbessern. Sie können Wechselwirkungen mit gerinnungs- und thrombozyten-aggregationshemmenden Arzneimitteln zeigen [39]. Darüber hinaus sollte bei Patienten mit Bluthochdruck auf diuretisch wirkende TCM Arzneien wie Plantaginis semen verzichtet beziehungsweise die bestehende Medikation darauf abgestimmt werden [16].

1.3 Rechtliche Einordnung von TCM-Drogen

Die rechtliche Zuordnung von TCM-Drogen variiert je nach Anwendungsbereich. So können pflanzliche Materialien wie beispielsweise Gojibeeren, Kardamon oder Zimtrinde als Lebensmittel in Verkehr gebracht werden, da sie dazu bestimmt sind, dass sie in verarbeitetem, teilweise verarbeitetem oder unverarbeitetem Zustand von Menschen als Lebensmittel oder Gewürz aufgenommen werden (Artikel 2 Verordnung (EG) Nr.178/2002) und unterliegen somit dem Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch LFGB. Darüber hinaus sind Extrakte chinesischer Heilpflanzen wie z. B. *Perilla frutescens* (L.) BRITT. (TUIM® Ateria, Fa. Schwabe) als Nahrungsergänzungsmittel in Deutschland im Handel. 2002 entschied das Niedersächsische Oberverwaltungsgericht, dass aus China importierte unbehandelte oder nur grob vorbehandelte getrocknete Pflanzenteile, die in der TCM zu Heilzwecken verwendet werden, als solche noch keine Arzneimittel iSd § 2 AMG darstellen. Diese Zweckbestimmung erhalten sie erst dann, wenn mehrere unterschiedliche Pflanzenteile in der Apotheke aufgrund ärztlicher Verordnung gezielt zusammengestellt und vermischt werden [40]. In einem Statement von 2010 der Bayerischen Landesapothekerkammer und des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt und Gesundheit werden TCM-Drogen und japanische Kampo-Kräuter nicht als Arzneimittel nach § 2 Abs. 1 AMG eingestuft. Im Gegensatz dazu erfüllen TCM-Granulate die Merkmale eines Präsentationsarzneimittels und bedürfen bei Import aus einem Nicht-EU-Land einer Einführerlaubnis nach § 72 AMG. Erst nach Mischen, Dekoktieren oder Abgabe von Einzeldrogen handelt es sich bei TCM Rohdrogen um Arzneimittel, für deren Identität und Qualität der abgebende Apotheker die volle Verantwortung trägt. Das bedeutet, falls ein Prüfzertifikat für die Rohdroge vorhanden ist [41], muss mindestens die Identität nachgewiesen werden (§ 6 ApBetrO). Kann die Identität nicht zweifelsfrei festgestellt werden, was häufig bei TCM-Granulaten der Fall ist, dürfen diese als bedenkliches Arzneimittel (§ 5 AMG) nicht in den Verkehr gebracht werden. 2011 erarbeitete die Arzneimittelinformationsstelle der Bayerischen Apothekerkammer in Würzburg eine Übersicht über stark wirksame TCM-Drogen sowie deren möglichen Risiken bei der Anwendung [42]. Diese ist jedoch nicht rechtlich bindend, gibt jedoch Auskunft über mögliche bedenkliche TCM-Drogen, deren Abgabe aufgrund toxischer Inhaltsstoffe oder möglicher Verwechslungsgefahr mit z. B. *Aristolochia*-Arten nicht erfolgen sollte.

1.4 Anforderungen des Arzneibuches

Das Arzneibuch besteht laut § 55 AMG aus dem Deutschen, Europäischen und dem Homöopathischen Arzneibuch und beinhaltet eine „bekannt gemachte Sammlung anerkannter pharmazeutischer Regeln über die Qualität, Prüfung, Lagerung, Abgabe und Bezeichnung von Arzneimitteln und den bei ihrer Herstellung verwendeten Stoffen“. Die Arzneibücher werden dabei einerseits in Deutschland von der Deutschen-Arzneibuchkommission und der Deutschen Homöopathischen Arzneibuchkommission des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) in Bonn, andererseits von der Europäischen Arzneibuchkommission des Europarates in Straßburg beschlossen. Sinn und Zweck jedes Arzneibuches ist es, „die Gesundheit der Bevölkerung mit Hilfe anerkannter, gemeinsamer Regeln zu fördern, die von den Verantwortlichen im Gesundheitswesen und allen Personen, die sich mit der Qualität der Arzneimittel befassen, zu beachten und einzuhalten sind. Die Regeln müssen von geeigneter Qualität sein, um so eine sichere Anwendung der Arzneimittel für den Patienten zu gewährleisten“ [43]. Verbindlich ist das Arzneibuch somit für alle, die Arzneimittel herstellen, prüfen und in Verkehr bringen, also Apotheken, pharmazeutische Großhändler und pharmazeutische Unternehmer (§ 54 AMG). Die Qualität eines Arzneimittels wird dabei im § 4 Abs. 15 AMG als Beschaffenheit, „die nach Identität, Gehalt, Reinheit, sonstigen chemischen, physikalischen, biologischen Eigenschaften oder durch das Herstellungsverfahren bestimmt wird“ bezeichnet und gilt für chemisch definierte wie für pflanzliche Arzneimittel. Die Verfahren zur Bestimmung der Qualität müssen dabei auf dem neusten Stand der Technik validiert und dokumentiert werden (§ 14 Abs. 3 und 4 AMHHV), da sie vom Anwender ohne zusätzliche Überprüfung übernommen werden können. In der ICH Guideline Q2 (R1) [44] finden sich einheitliche Richtlinien zu Validierungen, die in Europa, Japan und den USA anerkannt werden. Das Europäische Arzneibuch besitzt, aufgrund eines Übereinkommens des Europarates 1964, Gültigkeit in 38 europäischen Ländern, zu denen die 28 EU-Mitgliedsländer, drei Länder der EU Freihandelszone (EFTA) Island, Norwegen und Schweiz sowie Kroatien, Türkei, Mazedonien, Bosnien-Herzegowina, Serbien, Montenegro und die Europäische Union zählen. Darüber hinaus gibt es 24 Beobachter, zu denen unter anderem China, USA und die Weltgesundheitsorganisation WHO gehört, die an den Sitzungen der Kommission teilnehmen können [45]. Die zurzeit existierende lose Blattsammlung des

Deutschen Arzneibuches ergänzt somit die Monographien und Methoden des Europäischen Arzneibuches.

1.5 Implementierung von TCM-Drogen in das Deutsche und Europäische Arzneibuch

1997 befasste sich das Europäische Parlament erstmals mit dem Thema „Nichtkonventionelle Medizin“, welche die Traditionelle Chinesische Medizin, Homöopathie und die Anthroposophische Medizin beinhaltet. Das Europäische Parlament erließ die Direktive A4-0075/97 [46] die besagt, dass Arzneimittel aus Nichtkonventioneller Medizin in das Europäische Arzneibuch aufgenommen werden können. Bis dahin galt bezugnehmend auf § 6 ApBetrO die Monographien der aktuellen englischen Übersetzung des Chinesischen Arzneibuchs, da keine TCM Monographie im Europäischen oder Deutschen Arzneibuch enthalten waren. In der achten Ausgabe des ChP von 2005, sowie in der neunten von 2010 sind wesentliche Teile von Monographien ungenau übersetzt. Es fehlen z. T. verwendete Chemikalien (Referenzsubstanzen), die in Europa nicht erhältlich sind. Daraufhin fasste die Deutsche Arzneibuchkommission 2005 einen Beschluss zur nationalen Erarbeitung von TCM-Monographien für das DAB sowie die Europäische Arzneibuchkommission 2008 die Organisation einer TCM-Arbeitsgruppe, um die Qualität von TCM-Drogen nach den Regeln des Ph. Eur sicherzustellen. Priorität erhielten TCM-Drogen mit existierender Monographie im ChP 2005 und bekannten Toxizitäts- oder Qualitätsproblemen, die in der Folge von Experten der TCM Arbeitsgruppe in Straßburg sowie der Arzneibuchkommission in Deutschland bearbeitet wurden [47]. Die neuen Ph. Eur und DAB-Monographien wurden zu Beginn auf Basis der ChP 2005 später auch ChP 2010 Vorschriften evaluiert und den europäischen Rahmenrichtlinien angepasst (EDQM, Technical Guide: Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparations [50]).

Tabelle 2: Bereits im Deutschen Arzneibuch 2012 implementierte Monographien von TCM-Drogen

Deutscher Monographietitel	Lateinischer Monographietitel
Chinesisches Mutterkraut	Leonuri herba
Goldfadenwurzelstock	Coptidis rhizoma
Forsythienfrüchte	Forsythiae fructus

Im Deutschen Arzneibuch 2012 (Tabelle 2) finden sich derzeit drei TCM-Drogen Monographien, Goldfadenwurzelstock (*Coptidis rhizoma*), Forsythienfrüchte (*Forsythiae fructus*) und Chinesisches Mutterkraut (*Leonuri herba*) wohingegen 40 TCM Monographien in Europäischen Arzneibuch 8.1 zu finden sind (Tabelle 3). Interessanterweise sind 39 davon pflanzlicher Herkunft, nur eine Droge *Poria* bezeichnete den Fruchtkörper des Pilzes *Poria cocus* (SCHW.) WOLF.

Tabelle 3: Bereits im Europäischen Arzneibuch 8.1 implementierte Monographien von TCM-Drogen

Englischer Monographietitel	Lateinischer Monographietitel
Acanthopanax bark	<i>Acanthopanacis gracilistyl cortex</i>
Angelica dahurica root	<i>Angelicae dahuricae radix</i>
Angelica pubescens root	<i>Angelicae pubescentis radix</i>
Angelica sinensis root	<i>Angelicae sinensis radix</i>
Astragalus mongolicus root	<i>Astragali mangholici radix</i>
Atractylodes lancea rhizome	<i>Atractylodis lanceae rhizoma</i>
Atractylodes rhizome, largehead	<i>Atractylodis macrocephala rhizoma</i>
Baical skullcap root	<i>Scutellariae baicaliensis radix</i>
Belamcanda chinensis rhizome	<i>Belamcanda chinensis rhizoma</i>
Bistort rhizome	<i>Bistotae rhizoma</i>
Clematis armandii stem	<i>Clematis armandii caulis</i>
Coix seed	<i>Coicis semen</i>
Common selfheal fruit-spike	<i>Prunellae spica</i>
Drynaria rhizome	<i>Drynariae rhizoma</i>
Eclipta herb	<i>Ecliptae herba</i>
Ephedra herb	<i>Ephedrea herba</i>
Eucommia bark	<i>Eucommia cortex</i>
Fleeceflower root	<i>Polygoni multiflori radix</i>
Fourstamen stephania root	<i>Stephaniae tetrandrae radix</i>
Fraxinus rhynchophylla bark	<i>Fraxinus rhynchophylla cortex</i>
Ginkgo leaf	<i>Ginkgonis folium</i>
Ginseng	<i>Ginseng radix</i>
Isatis root	<i>Isatidis radix</i>
Knotgrass	<i>Polygoni avicularis herba</i>
Kudzuvine root	<i>Puerariae lobatae radix</i>
Long Pepper	<i>Piperis longi fructus</i>
Magnolia officinalis bark	<i>Magnoliae officinalis cortex</i>
Magnolia officinalis flower	<i>Magnoliae officinalis flos</i>
Mandarin epicarp and mesocarp	<i>Citri reticulatae epicarpium et mesocarpium</i>
Notoginseng root	<i>Notoginseng radix</i>
Orientvine stem	<i>Sinomenii caulis</i>
Pepper	<i>Piperis fructus</i>
Poria	<i>Poria</i>
Safflower flower	<i>Carthami flos</i>
Salvia miltiorrhiza root and rhizome	<i>Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma</i>
Sanguisorba root	<i>Sanguisorbae radix</i>
Schisandra fruit	<i>Schisandrae chinensis fructus</i>

Allgemeine Einleitung 14

Sophora flower	Sophorae japonicae flos
Sophora flower-bud	Sophorae japonicae flos immaturus
Thomson kudzuvine root	Puerariae thomsonii radix
Amomum fruit	Amomi fructus
Dioscorea oppositifolia rhizome	Dioscorea oppositifolia rhizome
Round amomum fruit	Amomi rotundus fructus

Bei den drei bereits im DAB 2012 implementierten TCM-Drogen ist in der jeweiligen Monographie neben dem deutschen und dem lateinischen Namen auch die Pinyin Bezeichnung, die phonetische Umschrift des chinesischen Namens der Droge, zu finden. Durch das Fehlen des Pinyins und Sinograms in den Ph. Eur Monographien sind die TCM-Monographien nicht als solche zu erkennen, was die genaue Identifizierung der Droge erschwert und zu Recht häufig kritisiert wird.

Die Definitionen der TCM-Drogen unterscheiden sich bezüglich Herkunft und der Angabe des Minimalgehalts von Markersubstanz(en). Formulierungen wie „dried in the sun“, die auf eine in China übliche Praxis der Wildsammlung und anschließende Trocknung meist am Wegesrand Bezug nimmt, entspricht nicht den in Europa üblich Standards (GACP) und ist somit in den deutschen/europäischen Vorschriften nicht aufgeführt.

Die Identitätsfeststellung verläuft im ChP und im DAB über eine makroskopische Beschreibung der Droge (Identität A) und mikroskopische Beschreibung des Pulvers (Identität B), wobei im ChP zusätzlich Aufsicht, Quer- oder Längsschnitte durch die jeweiligen Pflanzenorgane beschrieben sind. Die dünnenschichtchromatographische Identifizierung (Identität C) erfolgt im ChP 2010 auf DC, im DAB und im Ph. Eur auf DC und HPTLC-Platten unter Angabe einer tabellarischen Beschreibung des erhaltenen Chromatogramms (Fingerprint) und einer bildlichen Darstellung im Appendix (DAB).

Zur Reinheitsuntersuchung von pflanzlichen Drogen wird im ChP 2010 und im DAB 2012 der Trocknungsverlust, die Aschebestimmung und falls erforderlich, die Salzsäureunlösliche Asche oder Sulfataschebestimmung sowie der Test auf fremde Bestandteile durchgeführt. In den ChP 2010 Monographien wird in der Regel noch ein Test auf extrahierbare Substanzen angeschlossen.

Im ChP 2010 und im DAB 2012 wird zur Gehaltsbestimmung in der Regel HPLC mit UV-Detektion verwendet.

Zusätzlich werden in den Monographien des ChP 2010 Angaben zum Processing, der Wirkweise sowie der Indikation und der Lagerung der TCM-Drogen aufgeführt.

Der direkte Transfer einer chinesischen Monographie ins Deutsche/ Europäische Arzneibuch ist demnach aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus einer Monographie nicht möglich (Tabelle 4).

Allgemeine Einleitung 16

Tabelle 4: Unterschiede in den Monographien von pflanzlichen Drogen im ChP 2010 und DAB 2012

Chinesisches Arzneibuch 2010, engl. Edition	Deutsches Arzneibuch 2012
Titel	Titel
Lt. Name	Dt. Name
Sinogramm, Pinyin	Lt. Name
Engl. Name	(Pinyin bei TCM-Drogen)
Herkunft	Definition
Stammpflanze, Familie	Stammpflanze
Verwendeter Pflanzenteil, Erntezeitpunkt	Verwendeter Pflanzenteil, Erntezeitpunkt
Trocknung, Vorbehandlung (Slicing)	Beschaffenheit der Droge
Beschaffenheit der Droge	Minimalgehalt der Markersubstanz (en)
Beschreibung	Identität
Makroskopische Beschreibung der Droge	A) Makroskopische Beschreibung der Droge B) Mikroskopische Beschreibung der pulverisierten Droge C) Dünnschichtchromatographie (DC/HPLC) mit Beschreibung des Chromatogramms in Tabellenform (Fingerprint) und als Bild im Appendix
Identität	Prüfung auf Reinheit
1) Mikroskopische Beschreibung der pulverisierten Droge oder einzelner Organe (Aufsicht, Längs-, Querschnitt) 2) Dünnschichtchromatographie (DC) 3) Nasschemische Verfahren	Fremde Bestandteile Trocknungsverlust Asche, Salzsäureunlösliche Asche, Sulfatasche
Fremde Bestandteile	
Trocknungsverlust	
Asche/ Salzsäureunlösliche Asche	
Extrahierbare Stoffe	
Gehaltsbestimmung	Gehaltsbestimmung
Processing	Lagerung
Eigenschaften und Geschmack	
Meridianbeeinflussung	
Wirkung	
Indikation	
Anwendung und Dosierung	
Lagerung	

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, pflanzliches Drogenmaterial aus der Traditionellen Chinesischen Medizin qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Anhand der gewonnenen Ergebnisse sollten Monographieentwürfe für das DAB entwickelt werden. Die drei bearbeiteten Drogen, Artemisiae scopariae herba, Saponnikoviae divaricatae radix und Siegesbeckiae herba wurden von der Deutschen Arzneibuchkommission aufgrund ihres häufigen Gebrauchs, bekannter Qualitätsprobleme oder schon vorhandener Monographien in Ph. Eur von verwandten Species zur Überprüfung ausgewählt. Die erarbeiteten Monographievorschläge wurden in erster Linie für das DAB erstellt und können nach Evaluierung in das Ph. Eur implementiert werden. Ausgangspunkt für die Analysen der drei Pflanzen waren die existierenden Monographien der englischen Ausgabe des ChP 2005 und 2010, der HKCMMS Vol. 3 und 6 (Vorschlag), die erarbeiteten chromatographischen Fingerprintanalysen von Wagner et al. [48] sowie existierende Monographien für verwandte Spezies oder ähnliche Markersubstanzen im Ph. Eur 2012. Untersucht wurden dabei mindesten 5 Drogenmuster unterschiedlicher Importeure sowie Muster aus einem deutschen Pilotprojekt der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft [49]. Bei den Punkten „Identität“ wurden mittels makroskopischer und mikroskopischer Beschreibung sowie durch Dünnschichtchromatographie die aktuellen Monographien des ChP 2010 evaluiert und hinsichtlich europäischer Standards optimiert [50]. Dasselbe galt für „Reinheitsuntersuchungen“ und die „Gehaltsbestimmungen“ der Markersubstanzen, bei denen einerseits bestehende HPLC-Methoden verbessert und andererseits alternative Testmethoden auf ihre Durchführbarkeit überprüft wurden. Die Prüfung auf Identität C (Dünnschichtchromatographie) wurde mit DC und HPTLC-Platten entwickelt und hinsichtlich Stabilität, Spezifität, Präzision und Robustheit validiert, um mögliche Verfälschungen oder Verwechslungen des Drogenmaterials zu erkennen [51]. Als Grundlage der Validierung der Gehaltsbestimmungen galt die ICH Guideline Q2 [44], die die Parameter Stabilität, Präzision, Spezifität, Linearität, Robustheit, Wiederfindung sowie die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze beinhaltet. Darüberhinaus wurde das Drogenmaterial aus den verschiedenen geographischen Herkünften untersucht, verglichen und bei Unterschieden des Inhaltsstoffspektrums evaluiert.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Chemikalien

Aceton, p.a.	Merck, Darmstadt
Acetonitril, HPLC rein/ p.a.	Merck, Darmstadt
Ameisensäure 98-100%, p.a.	Merck, Darmstadt
Blei(II)acetat, p.a.	Merck, Darmstadt
Butylacetat, p.a.	Merck, Darmstadt
Chloroform, p.a.	Merck, Darmstadt
Dichlormethan, stabilisiert mit Amylen, p.a.	Acros Organics, USA
Diphenylboryloxyethyla min, p.a.	Fluka/SIGMA-ALDRICH, USA
Essigsäure 99%, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylacetat, p.a.	Acros Organics, USA
Ethylmethylketon, p.a.	Merck, Darmstadt
Hexan, p.a.	Acros Organics, USA
Macrogol 400, p.a.	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid, p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol, HPLC rein/ p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol-d ₄ , 99,8%	Deutero GmbH, Kastellaun
4-Methoxybenzaldehyd, p.a.	Merck, Darmstadt
Petrolether 60-80%, p.a.	Merck, Darmstadt
ortho-Phosphorsäure 85%, p.a.	Merck, Darmstadt
Salzsäure rauchend, 36%	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, 95-97%, p.a.	Merck, Darmstadt
Toluol, p.a.	Acros Organics, USA
Vanillin, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Wasser, entionisiert	Universität Regensburg
p-Xylol, p.a.	Merck, Darmstadt

3.2 Verwendete Referenzsubstanzen

	Substanz, Reinheit	Anbieter
Artemisiae scopariae herba	Chlorogensäure, 96%	Phytolab, Vestenbergsgreuth
	Rutin, DC-rein	Carl Roth, Karlsruhe
	Scoparon, DC-rein	Uni Regensburg
Saposhnikoviae divaricatae radix	Cimifugin, DC-rein	Phytolab, Vestenbergsgreuth
	4'-O- β -D -Glucosyl-5-O-methylvisamminol, 96%	Phytolab, Vestenbergsgreuth
	5-O-Methylvisamminol, DC-rein	Phytolab, Vestenbergsgreuth
Siegesbeckiae herba	Orientin, DC-rein	Phytolab, Vestenbergsgreuth
	Prim-O-glucosylcimifugin 1, 90%	Phytolab, Vestenbergsgreuth
	Prim-O-glucosylcimifugin 2, 98%	Cfm Oscar Tropitzsch, Marktredwitz
Siegesbeckiae herba	Kirenol, 100%	Phytolab, Vestenbergsgreuth
	β -Sitosterol, DC-rein	Phytolab, Vestenbergsgreuth

3.3 Verwendete Materialien

DC-Aluminium Platten Kieselgel 60 F ₂₅₄ 20 x 20 cm	Merck, Darmstadt
DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Faltenfilter	Sartorius Stedim, Göttingen
HPTLC Platten Kieselgel 60 F ₂₅₄ 10 x 10 /20 x 10 cm	Merck, Darmstadt
HPLC- Säulen: Purosphere STAR RP-18e (5 μ m), LiChroCART RT250-4 Nucleosil 5 μ m SI, 250 x 4,6 5 μ m Vorsäule: LiChroCART 4-4	Merck, Darmstadt Phenomenex, Aschaffenburg Merck, Darmstadt
Kieselgel zur Säulenchromatographie 60 (0,062-0,2 mm)	Merck, Darmstadt
pGEMT	Promega, Mannheim
Primer	Operon, Ebersberg
PSP® Spin Stool DNA Kit	Stratec, Berlin
PureYield™ Plasmid miniprep System	Operon, Ebersberg
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Spritzenvorsatzfilter, 0,4 μ m	WICOM, Heppenheim

3.4 Verwendetes Drogenmaterial

3.4.1 Artemisiae scopariae herba

Tabelle 5: Verwendetes Drogenmaterial an Artemisiae scopariae herba

Bezeichnung/Stammpflanze	Anbieter
Artemisiae scopariae herba	Arobemed
<i>Artemisia capillaris</i> THUNB.	CAMAG
<i>Artemisia scoparia</i> WALDST. ET KIT	CAMAG
<i>Artemisia capillaris</i> THUNB.	Chinamedica
<i>Artemisia capillaris</i> THUNB.	Chengdu, Ernte 2009, Plantasia
<i>Artemisia scoparia</i> WALDST. ET KIT	TCM Apotheke in Hangzhou
<i>Artemisia scoparia</i> WALDST. ET KIT	Universität Harbin
<i>Artemisia capillaris</i> THUNB.	Herbasinica, Provinz Hunan
<i>Artemisia scoparia</i> WALDST. ET KIT	Bay. Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
LfL 11 - BLBP 01, Praxisanbau Franken, Anbau 2009, Ernte im Herbst	
LfL 12 - BLBP 01, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2009, 1. Schnitt	
LfL 13 - BLBP 01, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2009, 2. Schnitt	
LfL 14 - BLBP 01, Versuchsanbau Saatzucht Steinach Straubing, Anbau 2009, 1.+2. Schnitt	
LfL 15 - BLBP 01, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2009, 2. Schnitt	
LfL 16 - BLBP 01, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2009, 2. Schnitt	
LfL 17 - BLBP 01, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2009, 2. Schnitt	
LfL 18 - BLBP 03, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2009, 2. Schnitt	
LfL 19 - BLBP 02, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2009, 2. Schnitt	
LfL 20 - BLBP 03, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2009, 1. Schnitt	
LfL 21 - BLBP 02, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2009, 1. Schnitt	
LfL 30 - BLBP 01, Praxisanbau Franken, Anbau 2011, 1. Schnitt	
LfL 31 - BLBP 01, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2011, 1. Schnitt	
LfL 32 - BLBP 02, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2011, 1. Schnitt	
LfL 33 - Syn1 EH7, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2011, 1. Schnitt	
LfL 34 - Syn1 Cd4, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2011, 1. Schnitt	
LfL 122 - BLBP 01, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2011, 2. Schnitt	
LfL 123 - BLBP 02, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2011, 2. Schnitt	
LfL 124 - BLBP 01, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2011, 3. Schnitt	
LfL 125 - BLBP 02, Versuchsanbau Baumannshof Ingolstadt, Anbau 2011, 3. Schnitt	
Artemisiae scopariae herba	Lian

Artemisiae scopariae herba	Pharmachin
Artemisiae scopariae herba	Phytax
<i>Artemisia capillaris</i> THUNB.	Shanghai, Ernte 2001, Plantasia
<i>Artemisia capillaris</i> THUNB.	Shanghai, Ernte 2005, Plantasia
<i>Artemisia capillaris</i> THUNB.	Yong Quan

3.4.2 Saposhnikoviae radix

Tabelle 6: Verwendetes Drogenmaterial an *Saposhnikoviae divaricatae radix*

Bezeichnung/Stammpflanze	Anbieter
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	Arobemed
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	TCM Apotheke in Baicheng
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	CaeLo
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	Chinamedica
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	Herbasinica
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	Bay. Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
LfL 10 - Anbau 2006	
LfL 11 - BLBP 03, Praxisanbau Franken, Anbau 2010, Ernte 2010	
LfL 101 - Anbau 2011	
LfL 102 - Anbau 2011	
LfL 103 - Anbau 2011	
LfL 104 - Anbau 2011	
LfL 105 - Anbau 2011	
LfL 106 - Anbau 2011 - Nachkömmling von 102	
LfL 107 - Anbau 2010 - Nachkömmling von 101	
LfL 108 - Anbau 2010 - Nachkömmling von 102	
LfL 109 - Anbau 2011 - Nachkömmling von 103	
LfL 110 - Anbau 2010 - Nachkömmling von 102	
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	Sinophyto
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	20110, Import aus China, Plantasia
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	740110, Import aus China, Plantasia
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	810110, Import aus China, Plantasia
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	910110, Import aus China, Plantasia
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (TURCZ.) SCHISCHK.	120110, Import aus China, Plantasia
<i>Carum carvi</i> L. (Wurzel)	Botanischer Garten, Regensburg
<i>Daucus carota</i> L. (Wurzel)	Botanischer Garten, Regensburg

Material und Methoden 22

<i>Seseli mairei</i> H. WOLFF (Wurzel)	Mei Wang, China
--	-----------------

3.4.3 Siegesbeckiae herba

Tabelle 7: Verwendetes Drogenmaterial an Siegesbeckiae herba

Bezeichnung/Stammpflanze	Anbieter
Siegesbeckiae herba	Arobemed
Siegesbeckiae herba	9097260560, CAMAG
Siegesbeckiae herba	780560, CAMAG
Siegesbeckiae herba	950560, CAMAG
Siegesbeckiae herba	Chinamedica
Siegesbeckiae herba- Granulat	Taiwan, Import über Complemedis
Siegesbeckiae herba- Granulat	Herbasinica
<i>Siegesbeckia pubescens</i> MAKINO	Herbasinica
<i>Siegesbeckia pubescens</i> MAKINO	Bay. Landesanstalt für Landwirtschaft, 2011
Siegesbeckiae herba	Pharmachina, Provinz Henan
Siegesbeckiae herba	Phytax
<i>Siegesbeckia orientalis</i> L.	Sinophyto, Provinz Henan
Siegesbeckiae herba	770560, Import aus China, Plantasia.
Siegesbeckiae herba	909-7-260560, Import aus China, Plantasia
Siegesbeckiae herba	950560, Import aus China, Plantasia
Siegesbeckiae herba	780560, Import aus China, Plantasia
<i>Siegesbeckia orientalis</i> L.	Import aus Vietnam
Siegesbeckiae herba	Yong Quan GmbH
<i>Siegesbeckia glabrescens</i> MAKINO	Xinmin City, Provinz Liaoning
<i>Siegesbeckia orientalis</i> L.	Xinmin City, Provinz Liaoning
<i>Siegesbeckia pubescens</i> MAKINO	Xinmin City, Provinz Liaoning
<i>Siegesbeckia orientalis</i> L., Wine-processed	Xinmin City, Provinz Liaoning

3.5 Verwendete Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte

DC	Flachbodenkammer: 20 x 20 cm Heizplatte Thermoplatte S Fotodokumentation CabUVIS	Desaga/Sahrstedt, Nümbrecht
Flash-Chromatographie	Spot Liquid Chromatography Flash, Software: Armen Glider Flash V2.3 Säulenkartusche: SVP D40-Si60 Vorsäule: Lichroprep RP18, 10 g	Armen, Saint Ave, Frankreich Merck, Darmstadt
GC-FID	HP 5890 Series II Agilent 6890N GC System	Hewlett Peckard, Böblingen Agilent, Böblingen
GC-MS	Agilent 5975 GC-MSD	Agilent, Böblingen
Gefriertrocknung	P 10 mit Pumpe PK8D	Ilmvac, Ilmenau
HPLC	Autosampler L-2200 Pumpe L-2130 Säulenofen L-2350 Diode Array Detector L-2455 Evaporating Light Scattering Detector 85 Software: EZChrom Elite software 3.1.7	VWR/Hitachi, Darmstadt
HPTLC	Auftragung Linomat 5 Entwicklung ADC2 Doppeltrogkammer: 10 x 10 cm, 20 x 10 cm, 20 x 20 cm Dokumentationseinheit Reprostar3 TLC Scanner 3 TLC-MS Interface Software: WinCATS 1.4.6	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Massenspektrometer	ThermoQuest Finnigan TSQ 7000 6540 (UHD) Accurate-Mass Q-TOF LC/MS System	Varian, Darmstadt Agilent Technologies, Böblingen
Mikroskopie	Mikroskop BX14	Olympus, Hamburg

Material und Methoden 24

	Objektmikrometer WF10xMicro Polfilter U-Pot	
Muffelofen	Naberterm	Naber, Lilienthal, Bremen
Mühle	UZM ZM1 Mühle Yellowline A10, Mühle	Retsch, Haan IKA-Werke, Staufen
NMR	Avance 400 Software: TopSpin 2.1	Bruker, Ettlingen
PCR	Thermocycler	Biometra, Göttingen
Rotationsverdampfer	Laborota 4003-control	Heidolph, Schwabach
Tauchgerät	HPTLC Tauchgerät mit Kammer	Universität Regensburg
Trockenschrank	Memmert	Memmert, Schwabach
Ultraschallbad	VWR Ultrasonic cleaner	VWR, Darmstadt
Waagen	Analytische Waage Research 160 P Extend ED 2245	Sartorius, Göttingen
Wasseraufarbeitung	MembraPure	MembraPure, Hennigsdorf

3.6 Verwendete Methoden

3.6.1 Makroskopische Beschreibung

Um die pflanzlichen Drogen makroskopisch zu beschreiben, wurden 100 g von jeweils fünf Drogenmustern auf einer weißen Unterlage ausgebreitet und die einzelnen Bestandteile analysiert. Die Komponenten wurden nach Aussehen, Farbe, Länge und charakteristischen Eigenschaften untersucht und mit der CarbUVIS Fotodokumentation fotografiert.

3.6.2 Mikroskopische Beschreibung

Die Durchführung der Mikroskopischen Beschreibung des Drogenpulvers erfolgte nach Ph. Eur 7.0/2.8.23 [52]

Die Droge wurde pulverisiert, gesiebt (Sieb mit 355 oder 500 µm Maschenweite, [53]) und mit Chloralhydrat-Lösung R aufgehellt. Alle charakteristischen Merkmale, die im Mikroskop BX14 sichtbar waren, wurden beschrieben und mit Hilfe des Objektmikrometers WF10xMicro vermessen. Zur besseren Identifizierung von verholzten Fragmenten wurde der U-Pot Polfilter verwendet. Zur Dokumentation wurden die beschriebenen Strukturen fotografiert.

3.6.3 Dünnschichtchromatographie (DC und HPTLC)

Die Durchführung der Dünnschichtchromatographie erfolge nach Ph. Eur 7.0/2.2.27 [54]

3.6.3.1 Durchführung:

Die Lösungen wurden mittels Linomat 5 auf die DC Kieselgel 60 F₂₅₄ Aluminiumplatten oder auf HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ Glasplatten aufgesprüht und danach getrocknet. Die Entwicklung erfolgte entweder in der automatischen Entwicklungskammer ADC 2 (20 x 10 cm) oder in einer Doppeltrog- bzw. Flachbodenkammer (10 x 10 cm, 20 x 10 cm, 20 x 20 cm) mit 20 min Kammersättigung. Die Fließmittelsysteme werden im Gliederungspunkt Methoden im Rahmen der bearbeiteten Pflanzen (siehe 4.2.1, 5.2.1 und 6.2.1) mit Angabe der Laufstrecke und der entsprechenden Detektion/Derivatisierung genannt. Dokumentiert wurden die Chromatogramme bei der entsprechenden Wellenlänge durch den Reprostar 2.

3.6.3.2 Derivatisierungsreagenzien

3.6.3.2.1 Acetanhydrid-Schwefelsäurereagenz

3.6.3.2.1.1 Herstellung

5 ml Acetanhydrid wurden mit 5 ml Schwefelsäure gemischt und zu 50 ml Ethanol gegeben.

3.6.3.2.1.2 Derivatisierung

Die Platte wurde besprüht und bei Weißlicht (WR) ausgewertet. Danach 5 min bei 100 °C erhitzt und erneut bei Weißlicht ausgewertet.

3.6.3.2.2 Anisaldehydreagenz

3.6.3.2.2.1 Herstellung

0,5 ml Anisaldehyd R wurde mit 10 ml Essigsäure 99% R, 85 ml Methanol R und 5 ml Schwefelsäure R in der angegebenen Reihenfolge unter Eiskühlung gemischt.

3.6.3.2.2.2 Derivatisierung

Die Platte wurde in die Lösung für 5 s eingetaucht bzw. besprüht und anschließen 3 min auf der Heizplatte bei 100 °C erwärmt. Die Auswertung erfolgte bei 366 nm bzw. Weißlicht (WR).

Material und Methoden 26

3.6.3.2.3 Naturstoff-/Macrogolreagenz nach Neu

3.6.3.2.3.1 Herstellung

Tauchlösung bzw. Sprühlösung I (Naturstoffreagenz)

0,5 g bzw. 1,0 g Diphenylboryloxyethylamin R wurden in 100 ml Methanol R gelöst.

Tauchlösung bzw. Sprühlösung II (Macrogolreagenz)

2,5 g bzw. 5,0 g Macrogol 400 R wurden in 100 ml Methanol R gelöst.

3.6.3.2.3.2 Derivatisierung

Tauchen bzw. Sprühen:

Die Platte wurde 5 min lang auf 100 °C erhitzt. Die noch warme Platte wurde in Tauchlösung I getaucht bzw. mit Sprühlösung I besprüht, 1 min bei 100 °C zwischen getrocknet und anschließend in Tauchlösung II getaucht bzw. mit Sprühlösung II besprüht.

Die Auswertung erfolgte unter ultraviolettem Licht bei 366 nm.

3.6.3.2.4 Vanillinreagenz ChP 2010

3.6.3.2.4.1 Herstellung

2,5 g Vanillin R wurden in 50 ml Schwefelsäure R gelöst.

3.6.3.2.4.2 Derivatisierung

Die Platte wurde besprüht, 3 min auf 100 °C erhitzt und bei Weißlicht ausgewertet.

3.6.4 Reinheitsbestimmungen

3.6.4.1 Bestimmung des Trocknungsverlustes

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes erfolgte nach Ph. Eur 7.0/2.2.32 Trocknungsverlust [55].

Zur Bestimmung des Trocknungsverlustes wurde ein Wägeglas 2 h bei 100-105 °C getrocknet und nach Abkühlen im Exsikkator das genaue Gewicht bestimmt. 1,00 g des pulverisierten und gesiebten (Sieb mit 355 bzw 500 µm Maschenweite) Drogenmaterials wurde in das Glas eingewogen und 2 h bei 100-105 °C im Trockenschrank getrocknet. Der Trocknungsverlust ist der in Prozent angegebene Massenverlust (m/m).

3.6.4.2 Bestimmung der Asche

Die Bestimmung der Asche erfolgte nach Ph. Eur 7.0/2.4.16. Asche [56].

1,00 g (bzw. 0,50 g bei Artemisiae scopariae herba) der pulverisierten und gesiebten (Sieb mit 355 bzw. 500 µm Maschenweite) Drogen wurden in einen, zuvor bei 600 °C 2 h lang ausgeglühten, Quarziegel eingewogen und bei 600 ± 25 °C im Muffelofen bis zur Massenkonsistenz gebrannt. Anschließend wurde der Tiegel im Exsikkator erkalten gelassen und ausgewogen.

3.6.4.3 Bestimmung der Salzsäureunlöslichen Asche

Die Bestimmung der Salzsäureunlöslichen Asche erfolgte nach Ph. Eur 7.0/2.8.1 Salzsäureunlösliche Asche [57].

Als Ausgangsmaterial zur Durchführung der Salzsäureunlöslichen Asche wurde der Rückstand aus der Aschebestimmung verwendet. Zum Ascherückstand wurden 15 ml H₂O und 10 ml Salzsäure 36% hinzugegeben, 10 min schwach zum Sieden erhitzt und filtriert. Danach wurde der Bodensatz mit H₂O so lange gewaschen bis das Filtrat neutral war. Nach vorsichtigem Überführen in einen Quarziegel wurde dieser bei 600 ± 25 °C im Muffelofen bis zur Massenkonsistenz gebrannt.

3.6.5 Gehaltsbestimmungen

3.6.5.1 Gehaltsbestimmung mit HPLC

Die Probe wurde, wie in der für 4.2.2 (Artemisiae scopariae herba), 5.2.2 (Saposhnikoviae divaricatae radix) und 6.2.2 (Siegesbeckiae harba) beschriebenen Methode, eingewogen und extrahiert. 10 µl (Saposhnikoviae divaricatae radix, Siegesbeckiae herba) bzw 25 µl (Artemisiae scopariae herba) der Testlösungen wurden in die HPLC (Elite La Chrom, Merck Hitachi) injiziert, chromatographiert und bei der beschriebenen Wellenlänge ausgewertet. Zu Berechnung des Gehaltes an Markersubstanz in der Probe wurde eine Kalibrierlösung hergestellt, wie beschrieben verdünnt und chromatographiert.

3.6.5.2 Gehaltsbestimmung mit HPTLC/Densitometrie

Die Probe wurde, wie in der unter 5.2.1 (Saposhnikoviae divaricatae radix) oder 6.2.1 (Siegesbeckiae herba) beschriebenen Methode, eingewogen und extrahiert. Ferner wurde eine Kalibrierlösung, wie in 5.7.2.4 oder 6.7.2.4 beschrieben, hergestellt und verdünnt. Die Testlösung und die Kalibrierstandards wurden, wie beschrieben, auf die HPTLC-Platte

Material und Methoden 28

aufgesprührt und chromatographiert. Bei der Gehaltsbestimmung von Kirenol in *Saposhnikoviae divaricatae radix* wurde die Platte nach Entwicklung mit Anisaldehydreagenz derivatisiert, um die Signalintensität zu erhöhen. Dazu wurde die Platte mittels einer Tauchkammer in die Derivatisierungslösung getaucht und danach 3 min auf 100 °C erhitzt. Zur Vermessung wurde die Platte in den TLC Scanner 3 überführt und die Absorption der Kalibrierstandards und der Testlösung bei der beschriebenen Wellenlänge bestimmt. Durch die Kalibrierfunktion, die für jede Platte einzeln bestimmt wurde, konnte der Gehalt an Markersubstanz in der Probe berechnet werden.

3.6.6 Genetische Untersuchung der verschiedenen *Artemisia* spec. Herkünfte

Die Isolierung der DNA, Amplifizierung und Auswertung der PCR Ergebnisse wurden von Frau Annika Orland im Rahmen ihrer Dissertation am Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn durchgeführt.

3.6.6.1 DNA Isolierung und Amplifizierung

Mit Hilfe eines PSP® Spin Stool DNA Kit wurde die DNA nach Herstellerprotokoll aus 50 mg des zuvor in einer Kugelmühle zerkleinerten Drogenmetriels isoliert. Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden universelle pflanzenspezifische ITS Primer verwendet. Als Forward-Primer wurde 5' GAACCTGCGGAAGGATCATTG 3' und als Reverse-Primer 5' GCTTAAACTCAGCGGGTAGTCC 3' verwendet um die ITS1, 5.8 S rDNA und die ITS2 Sequenz zu amplifizieren. Die PCR wurde in 25 µl, bestehend aus PCR Puffer, 0,5 µl DNATemplat, 0,5 µl von jedem Primer und 0,25 µl DNA-Polymerase, durchgeführt. Die DNA Verlängerung erfolgte in einem Biometra Thermocycler mit vorangehender Denaturierung bei 95 °C für 2 min, gefolgt von 35 Zyklen je 30 s bei 94 °C, 20 s bei 60 °C und 30 s bei 72 °C. Am Ende wurde die Temperatur bei 72 °C für 4 min gehalten.

3.6.6.2 Probenaufarbeitung und Sequenzierung

Diese Probenaufarbeitung und Sequenzierung wurden von GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

Alle Produkte der Nukleotidsequenzierung inklusive der entsalzten PCR Amplifikate wurden mittels eines QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend dem Herstellerprotokolls gewonnen. Da die Qualität der erhaltenen Produkte teilweise nicht ausreichend war, wurden die Amplifikate gebunden und durch PureYield™ Plasmid miniprep System in kompetente *E. coli* XL1 blue transformiert. Die transformierten Bakterienzellen wurden auf LB Agar Ampicillin-

Platten übertragen und selektierte Kolonien wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert. Danach wurde die Plasmid-DNA nach Herstellerprotokoll isoliert.

3.6.6.3 Auswertung

Mit Hilfe einer BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Analyse wurden Regionen mit hoher Ähnlichkeit zwischen den gewonnenen DNA-Sequenzen und der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ermittelt.

3.6.7 Gaschromatographische Untersuchungen

3.6.7.1 Gehaltsbestimmung des Ätherischen Öls

Die Gehaltsbestimmung der ätherischen Öle wurde nach Ph. Eur 7.0/2.8.12 [58] durchgeführt.

Um die organische Phase (0,5 ml *p*-Xylol) mit H₂O zu sättigen, wurde eine 30 minütige Vordestillation durchgeführt, bei der die Geschwindigkeit von 2 bis 3 ml pro min eingestellt wurde. Jeweils 50 g der Artemisiae scopariae herba und 25 g der Saponikoviae divaricatae radix Proben wurden mit der im Arzneibuch beschriebenen Wasserdampfdestillationsapparatur, 3 h destilliert. Nach 30 min Abkühlzeit wurde das Volumen der organischen Phase abgelesen und der Gehalt an ätherischem Öl in ml/kg errechnet.

3.6.7.2 GC-FID Untersuchung

Das erhaltene ätherische Öl wurde durch Wasserdampfdestillation (3.6.7.1) gewonnen, wobei *p*-Xylol durch Hexan ersetzt wurde. Nach Spülen der Destillationsapparatur wurde die organische Phase mit Hexan zu 5,0 ml verdünnt und jeweils 1 µl in die GC (HP 5890 series II) injiziert. Zur gaschromatographischen Trennung wurde ein 30 m Macrogol-Säule (Supelwax 10, Innendurchmesser 0,25 mm) und Helium als Trägergas verwendet. Die Detektion erfolgte mittels FID.

Material und Methoden 30

Tabelle 9: Parameter zur gaschromatographischen Trennung der ätherischen Öle von Artemisiae scopariae herba und Saponnikoviae divaricatae radix

Parameter	Artemisiae scopariae herba	Saponnikoviae divaricatae radix [59]
Flussrate	0,7 ml/min	1,0 ml/min
Injectortemperatur	250 °C	250 °C
Detektortemperatur	260 °C	260 °C
Temperaturprogramm	60 °C für 5 min, dann 250 °C mit 4 °C/min, Ausglühen bei 250 °C für 7,5 min	50 °C für 2 min, dann 180 °C mit 10 °C/min, 1 min auf 180 °C halten, dann 280 °C mit 6 °C/min, Ausglühen bei 280 °C für 10 min

3.6.7.3 GC-MS Identifizierung

Die Arbeiten zur Identifizierung des ätherischen Öls wurden in Zusammenarbeit mit dem Department for Pharmacognosy an der Anadolu Universität, Eskisehir (Prof. Dr. Fatih Demirci, Prof. Dr. Betül Demirci) Türkei durchgeführt.

Das zur Identifizierung verwendete ätherische Öl wurde wie unter 3.6.7.2 beschrieben, gewonnen. Die Analyse wurde mit Helium als Trägergas (0,8 ml/min) und einer Macrogolsäule Innowax FSC (60 m x 0,25 mm, 0,25 µm) durchgeführt. Der Split betrug 40:1. Die Temperatur wurde wie in [60] beschrieben für 10 min auf 60 °C gehalten, dann auf 220 °C mit 4 °C/min erhöht und diese Temperatur während 10 min konstant gehalten. Anschließend wurde die Temperatur auf 240 °C erhöht (1 °C/min), um die Säule auszuglühen. Nach der chromatographischen Trennung wurden die Bestandteile einerseits mittels eines Agilent 5975 GC-MSD Systems identifiziert und parallel mit einem Agilent 6890N GC-FID System (Detektortemperatur: 300 °C) die relative Fläche bestimmt. Die Injectortemperatur beim GC-MS betrug 250 °C und die Massenspektren wurden bei 70 eV zwischen m/z 35 bis 450 untersucht. Die erhaltenen Spektren wurden mit Werten verschiedener Datenbanken verglichen: Wiley GC/MS Library, MassFinder 3 Library, Bašer Library of Essential Oil Constituents. Um die Relativen Retentionsindizes (RRI) zu berechnen wurden n-Alkane als Referenzpunkte benutzt.

Tabelle 10: Verwendete Proben zur GC-MS Identifizierung von Artemisiae scopariae herba

Probe	Einwaage [g]	Volumen an Ätherischem Öl [ml]
Arobemed	24,79	< 0,01
Chengdu 2009	29,88	< 0,01
Harbin	25,80	< 0,01
Herbasinica	31,08	0,02
LfL 14	25,70	0,01
LfL 15	23,87	0,03
LfL 16	31,61	0,04
LfL 17	30,97	0,02
LfL 18	26,19	0,02
LfL 19	30,36	0,02
LfL 20	25,78	0,01
LfL 21	28,94	< 0,01
Lian	27,35	< 0,01
Pharmachin	25,49	< 0,01
Phytax	28,16	< 0,01
Shanghai 2001	24,53	< 0,01
Shanghai 2005	24,56	< 0,01
Yong Quan	26,35	< 0,01

3.6.8 TLC-MS Kopplung

Nach der chromatographischen Trennung wurde die zu analysierenden Bande ohne Derivatisierung mittels des TLC-MS Interface direkt von der Platte durch einen ovalen Elutionskopf (4 x 2 mm) und einer HPLC Pumpe (Fließmittel MeOH, H₂O 80:20 + 10 mM Ammoniumformiat) abgesaugt. Das Massenspektrum wurde mit einem ThermoQuest Finnigan TSQ 7000 (APCI-MS) vermessen.

Material und Methoden 32

3.6.9 Isolierung und Identifizierung des charakteristischen Flavonoids aus Artemisiae scopariae herba aus deutschem Anbau

3.6.9.1 Extrakttherstellung

946,6 g Pflanzenmaterial aus deutschem Anbau (Tabelle 11) wurden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 2,5 l MeOH für 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Das Filtrat wurde danach zur Trockene eingedampft und nach Auswaage (58,4 g) bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

Tabelle 11: Verwendetes Pflanzenmaterial zur Extrakttherstellung mit Einwaage

Probenbezeichnung	Einwaage [g]
LfL 11	10,2
LfL 12	19,0
LfL 13	16,5
LfL 14	79,0
LfL 15	169,0
LfL 16	232,4
LfL 17	190,7
LfL 31	81,7
LfL 122	78,1
LfL 124	70,0

3.6.9.2 Isolierung

2,16 g des Extraktes wurden in MeOH gelöst und mit 4,30 g Kieselgel 60 zur Trockene eingedampft. Der Extrakt wurde auf eine Flashsäule (manuell gepackt mit 90 g Kieselgel 60) aufgebracht und 30 min mit Ethylacetat, Aceton, H₂O (6:1:0,3; obere Phase) bei einer Flussrate von 30 ml/min mittels Flashchromatographie aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mit einem automatischen Fraktionssammler gesammelt, wobei eine Fraktion 20 ml enthielt. Zur Kontrolle wurden 5 µl der jeweiligen Fraktion auf eine DC Kieselgel 60 F₂₅₄ Platte aufgetragen und 7 cm mit Ethylacetat, Ameisensäure, H₂O (40:5:5) entwickelt. Nach Derivatisierung mit Naturstoffreagenz R wurde die zu isolierende Substanz bei R_F ~ 0,56 identifiziert und die Fraktionen 14-31 vereinigt. Die Ausbeute der Fraktion nach Flaschchromatographie betrug nach Gefrieretrocknung 37,76 mg.

Um die Fraktion weiter aufzutrennen, wurde eine weitere Säulenchromatographie mit dem gleichen Fließmittel (Ethylacetat, Aceton, H₂O (6:1:0,3; obere Phase)) durchgeführt. Dazu wurde die aus der Flashchromatographie gewonnene Fraktion in 500 µl des Fließmittels gelöst und auf eine offene Säule (l = 90 cm, Ø = 2cm, gepackt mit 40 g Kieselgel 60)

aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit wurde zuvor auf 1,5 ml/min eingestellt. Bei Glas 1-7 wurden 10 ml, 8-9 5 ml und ab Glas 24 jeweils 2 ml manuell gesammelt. Gläser 51-66 wurden nach DC-Kontrolle vereinigt und gefriergetrocknet. Die Ausbeute der offenen Säulenchromatographie betrug 6,45 mg. Da in der Sammelfaktion noch Chlorophyll (rot fluoreszierende Bande bei 366 nm nahe der Fließmittelfront) enthalten war, wurde sie in 10 ml MeOH, H₂O 1:1 gelöst und dreimal mit 10 ml CHCl₃ aufgeschüttelt. Die MeOH, Wasser-Phase wurde eingedampft und gefriergetrocknet. 5,07 mg der unbekannten Substanz wurden isoliert.

3.6.9.3 NMR-Spektroskopie

5,0 mg des erhaltenen Isolats wurde in ca. 0,5 ml MeOH -d₄ gelöst und an einem Avance 400 Spektrometer mittels ¹H- und ¹³C-NMR vermessen. Die Signale wurden auf das Lösungsmittel bezogen, mit TopSpin 2.1 ausgewertet und mit Literaturdaten [61], hinsichtlich Lage, Multiplizität und Kopplungskonstanten (*J*), verglichen. Desweitern wurde ein zweidimensionales ¹H, ¹H-NOESY Spektrum gemessen, um die genaue Verknüpfungsstelle des Zuckerrestes zu ermitteln.

3.6.9.4 Massenspektrometrie

Das Massenspektrum des isolierten Flavonoids wurde in der Zentralen Analytik der Universität Regensburg mittels eines 6540 (UHD) Accurate-Mass Q-TOF LC-MS Systems (ESI-MS) im Positivmodus ermittelt (HPLC-Säule: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 50 x 2,1 mm, 5 µm, Fließmittel A: H₂O + 0,1% Ameisensäure, B: ACN + 0,1% Ameisensäure, Flußrate: 0,6 ml/min, linearer Gradient: 5-95% B in 4 min).

3.6.10 Validierung der Prüfung auf Identität mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Das Protokoll zur Validierung der Prüfung auf Identität mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde nach [51] erstellt.

3.6.10.1 Methodenbeschreibung

3.6.10.1.1 Testlösung

Herstellung der zu verwendenden Testlösungen mit Angabe der Menge an Droge, der Extraktionsart und der Extraktionsdauer

Material und Methoden 34

3.6.10.1.2 Referenzsubstanzlösungen

Herstellung der verwendeten Referenzlösungen mit Angabe der Einwaage und des Lösungsmittels

3.6.10.1.3 Derivatisierungsreagenzien

Herstellung der verwendeten Derivatisierungsreagenzien

3.6.10.1.4 Stationäre Phase

Verwendete stationäre Phase und Größe der DC/HPTLC-Platten

3.6.10.1.5 Probenauftragung

Beschreibung des Auftragevolumens, Bandenbreite und Entfernung vom unteren Rand und von den Seitenrändern der DC/HPTLC-Platte

3.6.10.1.6 Temperatur und Luftfeuchtigkeit

Feuchtigkeits- und Temperaturdokumentation

3.6.10.1.7 Chromatographie

Beschreibung des verwendeten Kammertyps (Doppeltrogkammer oder Flachbodenkammer), der Sättigung (mit/ohne Filterpapier, Zeit), des Fließmittels mit Angabe der einzelnen Komponenten in Volumenanteilen, der Entwicklungsstrecke ab der Auftragungszone und der Trocknungszeit (Kalt- oder Warmluft)

3.6.10.1.8 Derivatisierung

Verwendung der Derivatisierungsreagenzien

3.6.10.1.9 Dokumentation

Angabe der zu dokumentierenden Chromatogramme (vor/nach der Derivatisierung: bei 254 nm, 366 nm oder Tageslicht)

3.6.10.1.10 Abbildung der Chromatogramme

Bilder der Chromatogramme bei den in 3.6.10.1.9 beschriebenen Wellenlängen mit zugehöriger Bahnzuordnung

3.6.10.1.11 Auswertung der Ergebnisse

Vergleich der Testlösung mit den Referenzlösungen und Beschreibung des Fingerprints der Testlösung unter Angabe von R_F -Werten der Markersubstanzen

3.6.10.2 Validierung

3.6.10.2.1 Materialien

3.6.10.2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Verwendete Chemikalien und Lösemittel mit Angabe der Reinheit und des Herstellers

3.6.10.2.1.2 Pflanzenproben

Verwendete Pflanzenproben mit Stammpflanze mit Angabe des Anbieters

3.6.10.2.1.3 Referenzstandards

Verwendete Referenzsubstanzen mit Angabe der Reinheit und des Anbieters

3.6.10.2.1.4 Platten

Verwendete Platten mit Angabe der Größe und des Anbieters

3.6.10.2.1.5 Geräte

Verwendete Geräte mit Angabe des Herstellers

3.6.10.2.1.6 Software

Verwendete Software mit Angabe des Herstellers

3.6.10.2.2 Stabilität

3.6.10.2.2.1 Stabilität der Analyten während der Chromatographie

Eine authentische Probe wird wie unter Punkt 3.6.10.1 beschrieben extrahiert und [x] µl werden punktförmig an der unteren Plattenecke einer 10 x 10 cm Platte (10 mm von jedem Ende) appliziert. Die Platte wird entwickelt und getrocknet wie unter Punkt 3.6.10.1.7 beschrieben. Nach der ersten Entwicklung wird die Platte um 90° nach gedreht und nochmals wie unter Punkt 3.6.10.1.7 beschrieben mit frischem Fließmittel entwickelt. Die Platte wird derivatisiert (wenn notwendig) und dokumentiert wie unter Punkt 3.6.10.1.8 und 3.6.10.1.9 beschrieben. Wenn alle sichtbaren Zonen auf der Diagonale, die den Auftragepunkt und die zwei Fließmittelfronten verbindet, liegen, ist die Probe während der Chromatographie stabil.

Material und Methoden 36

3.6.10.2.2.2 Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte

Eine authentische Probe wird wie unter Punkt 3.6.10.1 beschrieben extrahiert. Wie unter Punkt 3.6.10.1.5 beschrieben, werden [x] µl dieser Lösung auf eine 10 x 10 cm Platte aufgetragen. Die Platte mit der aufgetragenen Lösung wird mit Alufolie umwickelt und die Lösung wird an einem kühlen Ort aufbewahrt. Nach 3 h wird eine weitere Probe der authentischen Drogenprobe extrahiert (wie unter Punkt 3.6.10.1 beschrieben). 2 weitere Banden je [x] µl von der frisch herstellten Lösung werden auf die beiseite gestellte Platte aufgetragen und eine vierte Bande mit [x] µl der vor 3 h herstellten Lösung aufgetragen. Die Platte wird wie unter Punkt 3.6.10.1.7 bis 3.6.10.1.9 beschrieben behandelt.

Auftrageschema:

- (A) Probe, aufgetragen 3 h vor der Chromatographie
- (B) frische Probe
- (C) frische Probe
- (D) Probe, 3 h (in Lösung) vor der Chromatographie extrahiert

Der Test auf Stabilität in Lösung und auf der Platte wird akzeptiert, wenn sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Bandenintensität, Farbe und der R_F-Werte ergeben.

3.6.10.2.2.3 Stabilität der Ergebnisse

Eine authentische Probe wird wie unter Punkt 3.6.10.1 beschrieben extrahiert und wie unter den Punkten 3.6.10.1.5 bis 3.6.10.1.8 beschrieben chromatographiert. Nach der Dokumentation entsprechend Punkt 3.6.10.1.9 wird die Platte 1 h beobachtet. Jeweils nach 1, 5, 10, 15, 30, 60 min wird ein Bild der Platte dokumentiert. Die Bilder werden optisch verglichen. Der Test auf Stabilität der Ergebnisse wird akzeptiert, wenn sich keine signifikanten Änderungen in Lage, Intensität und Farbe der Banden innerhalb von 60 min zeigen.

3.6.10.2.3 Spezifität

3.6.10.2.3.1 Identifizierung von [x] Proben durch Vergleich von authentischen Drogenproben mit Referenzsubstanzen

Eine Testlösung wird wie unter Punkt 3.6.10.1 und die Referenzlösungen wie unter 3.6.10.1.2 beschrieben hergestellt. Alle Lösungen werden auf eine Platte aufgetragen, chromatographiert und dokumentiert wie in den Punkten 3.6.10.1.5 bis 3.6.10.1.9 aufgeführt. Die Ergebnisse der Chromatographie werden mit den Daten aus Punkt 3.6.10.1.10 verglichen. Der Test auf Identifizierung von [x] Proben durch Vergleich von authentischen Drogenproben mit Referenzsubstanzen wird akzeptiert, wenn die Banden der Referenzsubstanzen mit denen im Fingerprint der Testlösung in Lage, Intensität und Farbe übereinstimmen.

3.6.10.2.3.2 Detektion von Verfälschungen

Zur Ermittlung von Verfälschungen/Verwechslungen wird das Drogenmaterial wie unter Punkt 3.6.10.1 beschrieben extrahiert. Die Lösungen der authentischen Drogenproben und die Referenzlösung werden wie unter Punkt 3.6.10.1.2 beschrieben hergestellt. Alle Lösungen werden wie unter Punkt 3.6.10.1.5 beschrieben auf eine Platte aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt wie unter Punkt 3.6.10.1.7 beschrieben, die Derivatisierung erfolgt wie unter Punkt 3.6.10.1.8 beschrieben, die Dokumentation erfolgt nach Punkt 3.6.10.1.9. Die Ergebnisse der Chromatographie werden mit denen aus Punkt 3.6.10.1.10 verglichen. Der Test auf Verfälschung wird akzeptiert, wenn sich der Fingerprint der Verfälschung/Verwechslung bezüglich Lage, Intensität und Farbe signifikant unterschiedlich zum Fingerprint der authentischen Droge verhält.

3.6.10.2.4 Wiederholpräzision

Mindestens drei Proben der authentischen Drogen werden einzeln dreimal an einem Tag wie unter Punkt 3.6.10.1 beschrieben extrahiert. Auf drei 20 x 10 cm Platten werden je [x] µl der Extrakte wie unter den Punkten 3.6.10.1.5 bis 3.6.10.1.9 beschrieben aufgetragen und chromatographiert. Es wird dieselbe Kammer verwendet, aber mit frischem Fließmittel und frischem Filterpapier. Die Ergebnisse innerhalb jeder Platte und von Platte zu Platte werden ausgewertet. Die Durchschnitts-R_F-Werte der Markersubstanzen werden für jede Bahn und jede Platte bestimmt. Der Test auf Wiederholpräzision wird akzeptiert, wenn alle Banden der

Material und Methoden 38

jeweiligen drei Platten in Lage, Intensität und Farbe übereinstimmen. Die R_F -Werte der Markersubstanzen dürfen sich nicht mehr als 0,03 R_F -Einheiten unterscheiden.

3.6.10.2.5 Laborpräzision

Das unter Punkt 3.6.10.2.4 beschriebene Experiment wird an zwei weiteren Tagen mit jeweils einer Platte und frisch hergestellten Testlösungen wiederholt. Die Durchschnitts- R_F -Werte der Markersubstanzen werden für jede Bahn und jede Platte bestimmt und die Abweichungen von Platte zu Platte werden ausgewertet. Der Test auf Laborpräzision wird akzeptiert, wenn alle Banden der jeweiligen drei Platten in Lage, Intensität und Farbe übereinstimmen. Die R_F -Werte der festgelegten Markersubstanzen dürfen sich nicht mehr als 0,06 R_F -Einheiten unterscheiden.

3.6.10.2.6 Robustheit

3.6.10.2.6.1 Kammertyp/Plattentyp

Das Experiment wird wie unter Punkt 3.6.10.2.4 beschrieben mit authentlichem Drogenmaterial und den Referenzlösungen durchgeführt. Eine Flachbodenkammer mit einer Alu- DC- Platte und eine Doppeltrogkammer werden verglichen. Der Test auf Robustheit bezüglich auf Kammer/Plattentyp wird akzeptiert, wenn alle Banden DC und der HPTLC Platte in Lage, Intensität und Farbe übereinstimmen. Die R_F -Werte der festgelegten Markersubstanzen dürfen sich nicht mehr als 0,06 R_F -Einheiten unterscheiden.

3.6.10.2.6.2 Entwicklungsdistanz

Das Experiment wird wie unter Punkt 3.6.10.2.4 beschrieben mit authentlichem Drogenmaterial und den Referenzlösungen durchgeführt. Die Entwicklungsstrecke wird auf [x] mm erniedrigt und/oder auf [x] mm erhöht. Der Test wird akzeptiert, wenn alle Banden DC und der HPTLC Platte in Lage, Intensität und Farbe übereinstimmen. Die R_F -Werte der festgelegten Markersubstanzen dürfen sich nicht mehr als 0,06 R_F -Einheiten unterscheiden.

3.6.11 Validierung von Gehaltsbestimmungen mit Hilfe der Flüssigkeits-chromatographie

Das Protokoll zur Validierung der Gehaltsbestimmung mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie wurde nach [62], [44] erstellt.

3.6.11.1 Methodenbeschreibung

3.6.11.1.1 Testlösung

Herstellung der zu verwendenden Testlösungen mit Angabe der Menge an Droge, der Extraktionsart und der Extraktionsdauer

3.6.11.1.2 Referenzsubstanzlösungen

Herstellung der verwendeten Referenzlösungen mit Angabe der Einwaage und des Lösungsmittels

3.6.11.1.3 Stationäre Phase

Verwendete stationäre Phase mit Angabe der Säulenlänge, Durchmesser, Korngröße und Vorsäule

3.6.11.1.4 Probeninjektion

[x] µl der Untersuchungslösungen und Kalibrierlösungen. Die Konzentrationen der Kalibrierlösungen werden unter Punkt 3.6.11.2.4.1 Messbereich (Range) festgelegt

3.6.11.1.5 Chromatographie

Gerät: LaChrom Elite: DAD L-2455, Autosampler L-2200, Pumpe L-2130, Säulenofen L-2350, EZChrom Elite (alle Instrumente von Merck Hitachi). Verwendetes Fließmittelsystem: A: H₂O [falls notwendig mit Zusatz], B: Organische Lösungsmittel [falls notwendig mit Zusatz], Gradient, Flussrate, Detektionswellenlänge, Temperatur des Säulenofens

3.6.11.1.6 Dokumentation

Chromatogramm bei UV [x] nm

3.6.11.1.7 Abbildung des Chromatogramms

Abbildung eines typischen Chromatogramms einer authentischen Droge

3.6.11.1.8 Auswertung des Ergebnisses

Zur Quantifizierung verwendeter Peak mit Angabe der Retentionszeit

Material und Methoden 40

3.6.11.1.9 Methodeneignungstest

Auflösung des zu quantifizierenden Peaks und dem vorherigen oder folgendem Peak

3.6.11.2 Validierung

3.6.11.2.1 Materialien

3.6.11.2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Verwendete Chemikalien mit Angabe des Herstellers und der Reinheit

3.6.11.2.1.2 Pflanzenproben und Referenzen

Verwendete Pflanzenproben mit Angabe der Stammpflanze, und falls vorhanden des Anbieters und der Referenzen mit Hersteller und Reinheit

3.6.11.2.1.3 Geräte

Verwendete Geräte mit Angabe des Herstellers

3.6.11.2.1.4 Software

Verwendete Software mit Angabe der Version

3.6.11.2.2 Stabilität des Analyten in Lösung

Eine authentische Drogenprobe wird nach 3.6.11.1.1 extrahiert und [x] µl wie in 3.6.11.1.5 chromatographiert. Dieselbe Probe wird über einen Zeitraum von mindestens 6 h kontinuierlich eingespritzt und die Peakfläche der Markersubstanz bestimmt. Der Test auf Stabilität wird akzeptiert wenn die relative Standardabweichung unter 5% liegt.

3.6.11.2.3 Spezifität

Eine authentische Drogenprobe wird nach 3.6.11.1.1 extrahiert und [x] µl wie in 3.6.11.1.5 chromatographiert. Die Auflösung und die Peaksymmetrie wurden nach Ph. Eur 7.0/ 2.2.46 [63] bestimmt. Für die Markersubstanz und dem vorherigen und dem darauffolgenden Peak berechnet. Der Test auf Spezifität wird akzeptiert, wenn die Auflösung mindestens 1,0 und die Peaksymmetrie zwischen 0,8 und 1,2 liegt.

3.6.11.2.4 Kalibrierung

3.6.11.2.4.1 Messbereich (Range)

Zur Quantifizierung der Markersubstanz in [x] unbekannten Gehalts muss der Messbereich festgelegt werden. Dazu werden alle vorhandenen Proben wie in den Punkten 3.6.11.1.1 bis

3.6.11.1.5 chromatographiert. Außerdem wird eine Referenzlösung bekannter Konzentration nach 3.6.11.1.2 hergestellt, verdünnt und ebenfalls wie beschrieben chromatographiert. Unter der Annahme, dass die Konzentration der Markersubstanz und des gemessenen Detektorsignal proportional sind, wird der Mittelwert des Signals aller vorhandenen Proben errechnet und als Mittelpunkt der Kalibriergeraden definiert. Als Messbereich werden Mitte \pm 50% (50-150%) festgesetzt. Es werden 5-7 Kalibrierlösungen verschiedener Konzentrationen in äquidistantem Abstand hergestellt. Falls eine Probenlösung nicht im Messbereich liegt muss die Kalibrierung angepasst werden.

3.6.11.2.4.2 Kalibriergerade

Aus den Vorversuchsexperimenten unter Punkt 3.6.11.2.4.1 Vorversuch werden die Konzentrationen für die [x] Konzentrationen der Kalibriergerade berechnet und aus einer Stammlösung die unabhängigen Verdünnungen für die Lösungen der Kalibriergerade jeweils fünfmal hergestellt. Die einzelnen Konzentrationen werden wie unter Punkt 3.6.11.1.4 und 3.6.11.1.5 chromatographiert und ausgewertet.

3.6.11.2.5 Lineare Regression

Für die Erstellung der Kalibriergerade werden die gemessenen Werte in Abhängigkeit der Konzentration der Kalibrierlösung verwendet. Es wird eine Gerade berechnet, bei der die Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung den niedrigsten Wert annimmt. Diese Gerade wird durch folgende Gleichung beschrieben:

Formel 1

$$y = m \cdot x + b$$

y abhängige Größe, Messwert, z.B. Peakfläche o. Peakhöhe

x unabhängige Größe, Konzentration der Referenzsubstanz

m Steigung der Geraden

b Ordinatenabschnitt

Für die Berechnung der Kalibriergerade werden die Parameter m und b mit folgenden Gleichungen berechnet:

Material und Methoden 42

Formel 2

$$m = \frac{\sum (x_i * y_i) - \left[\frac{\sum y_i * \sum x_i}{N} \right]}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}}$$

Der Wert im Zähler wird zusammengefasst als Q_{xy} -Wert:

Formel 3

$$Q_{xy} = \sum (x_i * y_i) - \left[\frac{\sum y_i * \sum x_i}{N} \right]$$

Der Wert im Nenner wird zusammengefasst als Q_{xx} -Wert:

Formel 4

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

Für die Berechnung der Quadratsummen wird der Wert Q_{yy} entsprechend berechnet:

Formel 5

$$Q_{yy} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$$

Gleichung (1.4) wird vereinfacht zu:

Formel 6

$$m = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}}$$

Der Ordinatenabschnitt b berechnet sich mit Gleichung:

Formel 7

$$b = \bar{y} - m \bar{x}$$

Die Mittelwerte \bar{y} und \bar{x} sind die Arbeitsbereichsmitten in Signal- und Konzentrations-/Mengenrichtung.

Formel 8

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{N}$$

Formel 9

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

3.6.11.2.5.1 Reststandardabweichung

Die Reststandardabweichung s_y gibt die Anpassungspräzision der Ausgleichsgerade an.
Berechnet wird die Reststandardabweichung s_y mit der Gleichung:

Formel 10

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum [y_i - (m * x_i + b)]^2}{N - 2}} = \sqrt{\frac{Q_{yy} - \frac{Q_{xy}^2}{Q_{xx}}}{N - 2}}$$

y_i = Signalwert (Absorption)

x_i = Konzentrations-/Mengenwert

m = Steigung der Ausgleichsgeraden

3.6.11.2.5.2 Verfahrensstandardabweichung

Die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} ergibt sich aus Reststandardabweichung s_y und der Steigung m der Kalibriergeraden (Empfindlichkeit E).

Formel 11

$$s_{x0} = \frac{s_y}{m}$$

3.6.11.2.5.3 Relative Verfahrensstandardabweichung

Die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} bezieht sich ausgehend von der Verfahrensstandardabweichung auf die Mitte des Konzentrationsbereichs \bar{x} .

Formel 12

$$V_{x0} = \frac{s_{x0} * 100\%}{x}$$

3.6.11.2.6 Quadratische Regression

Für die Berechnung der Kalibrierkurve werden die gemessenen Werte in Abhängigkeit der Konzentration/Menge der Kalibrierlösung verwendet. Es wird eine polynomische Funktion ermittelt, in dem der niedrigste Wert der Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung bestimmt wird. Diese Funktion wird durch folgende Gleichung beschrieben:

Formel 13

$$y = n * x^2 + m * x + b$$

Formel 14

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

Formel 15

$$Q_{xy} = \sum (x_i * y_i) - \frac{(\sum x_i * \sum y_i)}{N}$$

Formel 16

$$Q_{x^3} = \sum x_i^3 - \left(\frac{\sum x_i * \sum x_i^2}{N} \right)$$

Formel 17

$$Q_{x^4} = \sum x_i^4 - \left(\frac{(\sum x_i^2)^2}{N} \right)$$

Formel 18

$$Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 * y_i) - \left(\frac{\sum y_i * \sum x_i^2}{N} \right)$$

Die Berechnung des Wertes n:

Formel 19

$$n = \frac{Q_{xy} * Q_{x^3} - Q_{x^2y} * Q_{xx}}{(Q_{x^3})^2 - Q_{xx} * Q_{x^4}}$$

Die Berechnung des Wertes m :

Formel 20

$$m = \frac{Q_{xy} - n * Q_{x^3}}{Q_{xx}}$$

Die Berechnung von b:

Formel 21

$$b = \frac{\left(\sum y_i - m * \sum x_i - n * \sum x_i^2 \right)}{N}$$

3.6.11.2.6.1 Reststandardabweichung

Die Reststandardabweichung s_y gibt die Anpassungspräzision der Funktion an. Berechnet wird die Reststandardabweichung s_y mit der Gleichung:

Formel 22

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - b * \sum y_i - m * \sum (x_i * y_i) - n * \sum (x_i^2 * y_i)}{N - 3}}$$

3.6.11.2.6.2 Verfahrensstandardabweichung

Die Empfindlichkeit berechnet sich aus Tangentensteigung an die quadratische Funktion:

Formel 23

$$E = m + 2 * n * \bar{x}$$

Die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} wird mit Hilfe folgender Gleichung errechnet:

Formel 24

$$s_{x0} = \frac{s_y}{E}$$

Material und Methoden 46

3.6.11.2.6.3 relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0}

Die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} wird durch nach Formel 12 berechnet.

3.6.11.2.6.4 Anpassungstest nach Mandel

Falls sich bei der Verfahrensstandardabweichung für die quadratische Regression ein kleinerer Wert als bei der linearen Regression ergibt, so ist ein Anpassungstest nach Mandel durchzuführen.

Nullhypothese H_0 : Es zeigt sich keine Varianzhomogenität beim Vergleich der Reststandardabweichungen von quadratischer und linearer Regression. Der Unterschied der Varianzen ist also zufälliger Natur ($P = 99\%$). Es liegt ein linearer Zusammenhang vor.

Alternativhypothese H_1 : Es liegt ein quadratischer Zusammenhang vor.

Die Restvarianzdifferenz Δs_y^2 für den Anpassungstest nach Mandel errechnet sich wie folgt:

Formel 25

$$\Delta s_y^2 = [(N_L - 2) * s_{yL}^2] - [(N_Q - 3) * s_{yQ}^2]$$

N Anzahl der Punkte der Kalibrierung

L Reststandardabweichung der linearen Regression

Q Reststandardabweichung der quadratischen Regression

Die berechnete Restvarianzdifferenz Δs_y^2 mit der quadratischen Restvarianz s_{yQ}^2 zu der Prüfgröße PG für einen F-Test zusammengefasst:

Formel 26

$$PG = \frac{\Delta s_y^2}{s_{yQ}^2}$$

Für die Berechnung der Freiheitsgrade (f_1/f_2 für die F-Tabelle) stehen folgende Gleichungen zur Verfügung:

Formel 27

$$\Delta f = (N_L - 2) - (N_Q - 3)$$

für Δf ergibt sich immer der Wert 1

Formel 28

$$f_1 = \Delta f$$

Formel 29

$$f_2 = N_Q - 3$$

Die Prüfgröße (PG) muss für die Annahme der Nullhypothese H_0 kleiner sein als der tabellierte Wert aus der F -Tabelle sein.

Ist die Nullhypothese H_0 abzulehnen, muss eine erneute Kalibrierung erfolgen! Die Konzentrationen (Levels) der Standards werden halbiert, eine entsprechende Anpassung der Probenkonzentrationen ist ebenfalls vorzunehmen. Die entsprechenden Prüfungen sind ab Punkt 3.6.11.2.4.1 Meßbereich (Range) sind mit verringerten Mengen/Konzentrationen durchzuführen.

3.6.11.2.7 Kalibrierfunktion

Erstellen der Kalibrierfunktion und den berechneten Parametern b und m

3.6.11.2.8 Bestimmtheitsmaß r^2

Das Bestimmtheitsmaß r^2 beschreibt die Gesamtstreuung der Regressionsgerade.

Formel 30

$$r^2 = \left(\frac{\sum (x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 * \sum (y_i - \bar{y})^2}} \right)^2$$

r Korrelationskoeffizient

x_i Konzentrationswert

y_i Signalwert

\bar{y} Mittelwert der Messpunkte

\bar{x} Mittelwert der Konzentrationswerte

Material und Methoden 48

3.6.11.2.9 Wiederholpräzision

Beschreibung des Experiments:

Die Testlösung wird wie unter Punkt 3.6.11.1.1 an einem Tag fünfmal unabhängig voneinander hergestellt und wie unter Punkt 3.6.11.1.4 und 3.6.11.1.5 beschrieben chromatographiert. Die Auswertung erfolgt nach Punkt 3.6.11.1.8. Der Test auf Wiederholpräzision wird akzeptiert, wenn der Variationskoeffizient V_K unter 5% liegt.

Formel 31

$$V_K = \frac{s}{\bar{x}}$$

s Standardabweichung

\bar{x} relativer Mittelwert der Konzentrationswerte

V_K Variationskoeffizient

3.6.11.2.10 Laborpräzision

Die Testlösung wird an vier weiteren Tagen hintereinander wie unter Punkt 3.6.11.1.1 hergestellt und wie unter Punkt 3.6.11.1.4 und 3.6.11.1.5 beschrieben chromatographiert. Die Auswertung erfolgt nach Punkt 3.6.11.1.8. Der Test auf Laborpräzision wird akzeptiert, wenn der Variationskoeffizient V_K unter 5% liegt.

3.6.11.2.11 Probenauswertung

Mit den Kalibrierfunktionen wird die Konzentration der Markersubstanz in den unbekannten Proben berechnet. Die Kalibrierfunktion unter Punkt 3.6.11.2.4.2 wird nach x umgestellt und die Konzentration wird berechnet.

Formel 32

$$\hat{x} = \frac{\hat{y} - b}{m}$$

\hat{x} berechnete Konzentration der Markersubstanz

\hat{y} gemessenes Signal der Markersubstanz

Der prozentuale Gehalt der Proben wird wie folgt berechnet:

Formel 33

$$G [\%] = \hat{x} * KF$$

G [%] Gehalt der Markersubstanz in der Probe

KF Korrekturfaktor

Berechnung von KF

Formel 34

$$KF = \frac{\hat{x}[mg / ml] * [Extraktionsvolumen][ml] * 100}{1000 * Einwaage[g]}$$

3.6.11.2.12 Prognoseintervall

Der Gesamtfehler aus Kalibrierung und Messung der Proben wird statistisch bewertet. Der „wahre“ Wert der Probe kann durch die Messung nur abgeschätzt werden, da die Kalibrierung und die Messung mit Fehlern behaftet sind. Aus dem Fortpflanzungsgesetz ergibt sich, dass die „wahre“ unbekannte Gerade zwischen zwei Hyperbelästen liegt, die wie folgt berechnet wird:

Formel 35

$$y_{u,o} = (m * x + b) \pm s_y * t * \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{(x - \bar{x})^2}{Q_{xx}}}$$

s_y Reststandardabweichung

t t -Faktor der zweiseitigen Tabelle mit $f=N-2$ und $P=95\%$

N Anzahl der Kalibrierlösungen

\hat{N} Anzahl der Parallelbestimmungen

\hat{x} Arbeitsbereichsmitte

Q_{xx} Quadratsumme x (Formel 4)

Material und Methoden 50

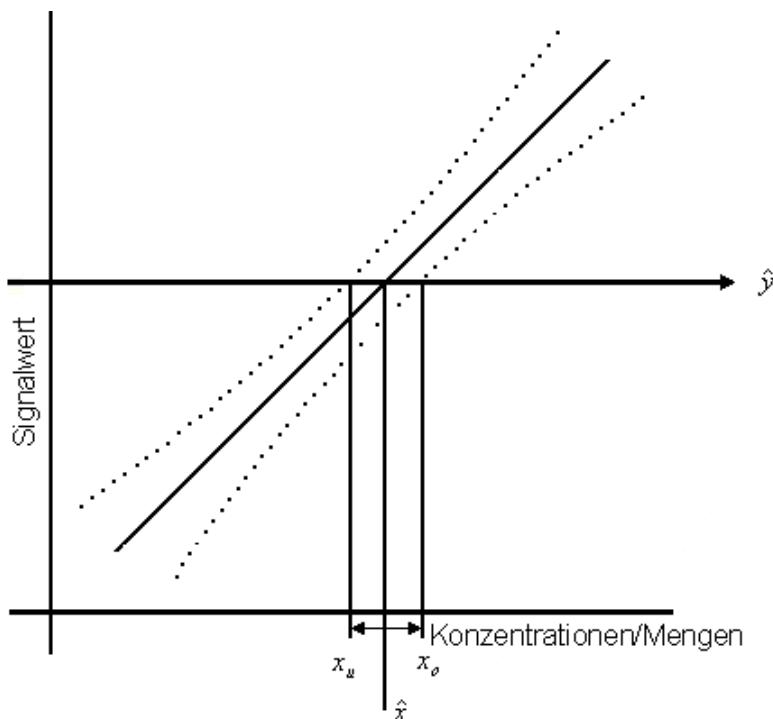


Abbildung 1: Graphen für die Bestimmung des Prognoseintervalls

x_o oberer Grenzwert durch den Schnittpunkt mit dem unteren Prognoseband

x_u unterer Grenzwert durch den Schnittpunkt mit dem oberen Prognoseband

\hat{x} Konzentration/Menge der Probe

Aus der Abbildung 1 erschließt sich der Vertrauensbereich/Prognoseintervall (VB) einer Probe:

Formel 36

$$VB = x_o - \hat{x} = \hat{x} - x_u$$

Intervall in der sich der Analysenwert „wirklich“ befindet ist somit:

Formel 37

$$\hat{x} \pm VB$$

Die oberen und unteren Werte für die Prognoseintervalle berechnen sich mit folgender Formel:

Formel 38

$$\hat{x}_{u,o} = \frac{\hat{y} - b}{m} + \frac{s_y * t}{m} * \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{(\hat{y} - \bar{y})^2}{m^2 * Q_{xx}}}$$

3.6.11.2.13 Robustheit

Es wird ein Extrakt hergestellt wie in 3.6.11.1.1 beschrieben. Die Methode wird wie unter Punkt 3.6.11.1.4 und 3.6.11.1.5 beschrieben jedoch mit veränderter Säulenofentemperatur chromatographiert. Die Temperatur wird auf [x] °C erhöht bzw. auf [x] °C erniedrigt. Die Fläche der Probe aus diesem Versuch und die Fläche einer Probe, die nach 3.5 chromatographiert wird, werden verglichen. Der Test wird akzeptiert, wenn der Variationskoeffizient V_K unter 5% liegt.

3.6.11.2.14 Wiederfindungsrate

Zu einer definierten Menge an pulverisierter Droge wird ca. 10% der Markersubstanz hinzugegeben. Die Droge wird dann wie unter Punkt 3.6.11.1.1 hergestellt und wie unter Punkt 3.6.11.1.4 und 3.6.11.1.5 chromatographiert erhalten. Die Wiederfindung berechnet sich aus den berechneten Wert (B) und den gemessenen Wert (G)

Formel 39

$$\text{Wiederfindungsrate} = \frac{G}{B} * 100\%$$

Der Test wird akzeptiert, wenn die Wiederfindungsrate bei 90-110% liegt.

3.6.11.2.15 Nachweisgrenze:

Die Berechnung der Nachweisgrenze erfolgt mit folgender Formel

Formel 40

$$LOD = \frac{3,3 * s_y}{m}$$

LOD Nachweisgrenze (Limit of Detection)

s_y Reststandardabweichung der Kalibriergeraden

m Steigung der Kalibriergeraden

Material und Methoden 52

3.6.11.2.16 Quantifizierungsgrenze:

Die Berechnung der Quantifizierungsgrenze erfolgt mit folgender Formel

Formel 41

$$LOQ = \frac{10 * s_y}{m}$$

LOQ Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantification)

s_y Reststandardabweichung der Kalibriergeraden

m Steigung der Kalibriergeraden

3.6.12 Validierung der Gehaltsbestimmung mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie/Densitometrie

Das Protokoll zur Validierung der Gehaltsbestimmung mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie/Densitometrie wurde nach [62], [44] erstellt.

3.6.12.1 Methodenbeschreibung

3.6.12.1.1 Herstellen der Testlösung

Herstellung der zu verwendenden Testlösungen mit Angabe der Menge an Droge, der Extraktionsart und der Extraktionsdauer

3.6.12.1.2 Herstellen der Referenzlösungen

Herstellung der verwendeten Referenzlösungen mit Angabe der Einwaage und des Lösungsmittels

3.6.12.1.3 Herstellen der Derivatisierungsreagenzien

Herstellung der verwendeten Derivatisierungsreagenzien

3.6.12.1.4 Stationäre Phase

Verwendete Stationäre Phase und Größe der DC/HPTLC-Platten

3.6.12.1.5 Probenauftragung

Beschreibung des Auftragevolumens, Bandenbreite und Entfernung vom unteren Rand und von den Seitenrändern der DC/HPTLC-Platte

3.6.12.1.6 Temperatur und Luftfeuchtigkeit

Beleg für die Temperatur und die Luftfeuchte im Labor.

3.6.12.1.7 Chromatographie

Beschreibung des verwendeten Kammertyps (Doppeltrogkammer oder Flachbodenkammer), der Sättigung (mit/ohne Filterpapier, Zeit), des Fließmittels mit Angabe der einzelnen Komponenten in Volumenanteilen, der Entwicklungsstrecke ab der Auftragungszone und der Trocknungszeit (Kalt- oder Warmluft)

3.6.12.1.8 Derivatisierung

Verwendung der Derivatisierungsreagenzien

3.6.12.1.9 Dokumentation

Angabe der zu dokumentierenden Chromatogramme (vor/nach der Derivatisierung: bei 254 nm, 366 nm oder Tageslicht)

3.6.12.1.10 Bilder des Chromatogramms und des Densitogramms

Bilder des Chromatogramms bei der in 3.6.12.1.9 beschriebenen Wellenlängen mit zugehöriger Bahnzuordnung und Densitogramm

3.6.12.1.11 Auswertung der Ergebnisse

R_F-Werte der zu quantifizierenden Substanz

3.6.12.1.12 Methodeneignungstest

Trennung der Bande der Markersubstanz vom restlichen Fingerprint

3.6.12.1.13 Materialien

3.6.12.1.13.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Verwendete Chemikalien

3.6.12.1.13.2 Pflanzenproben und Referenzsubstanzen

Verwendete Pflanzenproben mit Stammpflanze und falls vorhanden, Referenzsubstanzen mit Angabe des Anbieters

3.6.12.1.13.3 Platten

Verwendete Platten

Material und Methoden 54

3.6.12.1.13.4 *Geräte*

Verwendete Geräte

3.6.12.1.13.5 *Software*

Verwendete Software mit Version

3.6.12.1.13.6 *Geräteeinstellung*

Parameter für die Auftragung (Linomat 5) und den Scanner (TLC Scanner 3)

3.6.12.2 *Validierung*

3.6.12.2.1 *Stabilität*

3.6.12.2.1.1 *Stabilität der Analyten während der Chromatographie*

Eine authentische Probe wird wie unter Punkt 3.6.12.1.1 beschrieben extrahiert und [x] µl werden punktförmig an dem unteren Plattenende einer 10 x 10 cm Platte (10 mm von jedem Ende) appliziert. Die Platte wird entwickelt und getrocknet wie unter Punkt 3.6.12.1.7 beschrieben. Nach der ersten Entwicklung wird die Platte um 90° nach gedreht und nochmals wie unter Punkt 3.6.12.1.7 beschrieben mit frischem Fließmittel entwickelt. Die Platte wird derivatisiert (wenn notwendig) und dokumentiert wie unter Punkt 3.6.12.1.8 und 3.6.12.1.9 beschrieben. Wenn alle sichtbaren Zonen auf der Diagonale, die den Auftragepunkt und die zwei Fließmittelfronten verbindet, liegen, ist die Probe während der Chromatographie stabil.

3.6.12.2.1.2 *Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte*

Eine authentische Probe wird wie unter Punkt 3.6.12.1.1 beschrieben extrahiert. Wie unter Punkt 3.6.12.1.5 beschrieben, werden [x] µl dieser Lösung auf eine 10 x 10 cm Platte aufgetragen. Die Platte mit der aufgetragenen Lösung wird mit Alufolie umwickelt und die Lösung wird an einem kühlen Ort aufbewahrt. Nach 3 h wird eine weitere Probe der authentischen Drogenprobe extrahiert (wie unter Punkt 3.6.12.1.1 beschrieben). 2 weitere Banden je [x] µl von der frisch hergestellten Lösung werden auf die beiseite gestellte Platte aufgetragen und eine vierte Bande mit [x] µl der vor 3 h hergestellten Lösung aufgetragen. Die Platte wird wie unter den Punkten 3.6.12.1.7 bis 3.6.12.1.9 beschrieben behandelt.

Auftrageschema:

- (A) Probe, aufgetragen 3 h vor der Chromatographie
- (B) frische Probe
- (C) frische Probe
- (D) Probe, 3 h (in Lösung) vor der Chromatographie extrahiert

Die Banden werden optisch und mit Hilfe der Densitogramme verglichen. Der Test auf Stabilität in Lösung und auf der Platte wird akzeptiert, wenn sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Bandenintensität, Farbe und der R_F -Werte ergeben. Des Weiteren dürfen sich die Flächen der gemessenen Markersubstanzen weniger als 5% unterscheiden.

3.6.12.2.1.3 Stabilität der Derivatisierung/ Ergebnisse

Eine authentische Probe wird wie unter Punkt 3.6.12.1.1 beschrieben extrahiert und wie unter den Punkten 3.6.12.1.5 bis 3.6.12.1.8 beschrieben chromatographiert. Nach der Dokumentation nach Punkt 3.6.12.1.9 wird die Platte eine Stunde beobachtet und jeweils nach 1, 5, 10, 15, 30, 60 min ein Bild der Platte dokumentiert. Die Bilder werden optisch und mit Hilfe der Densitogramme verglichen. Der Test auf Stabilität der Ergebnisse wird akzeptiert, wenn sich keine signifikanten Änderungen in Lage, Intensität und Farbe der Banden ergeben und sich die Flächen der gemessenen Markersubstanzen innerhalb von 30 min weniger als 5% unterscheiden.

3.6.12.2.2 Spezifität

3.6.12.2.2.1 Identifizierung von [x] Proben durch vergleichen von authentischen Drogenproben mit Referenzsubstanzen

Eine Testlösung wird wie unter Punkt 3.6.12.1.1 beschrieben und die Referenzlösungen wie unter 3.6.12.1.2 dargelegt hergestellt. Alle Lösungen werden auf eine Platte aufgetragen, chromatographiert und dokumentiert wie in den Punkten 3.6.12.1.5 bis 3.6.12.1.9 beschrieben. Die Ergebnisse der Chromatographie werden mit denen aus Punkt 3.6.12.1.10 verglichen. Der Test auf Identifizierung von [x] Proben durch Vergleich von authentischen Drogenproben mit Referenzsubstanzen wird akzeptiert, wenn die Banden der

Material und Methoden 56

Referenzsubstanzen mit denen im Fingerprint der Testlösung in Lage, Intensität und Farbe übereinstimmen.

3.6.12.2.3 Detektion von Verfälschungen

Zur Ermittlung von Verfälschungen/Verwechslungen wird das Drogenmaterial wie unter Punkt 3.6.12.1.1 beschrieben extrahiert. Die Lösungen der authentischen Drogenproben und die Referenzlösung werden wie unter Punkt 3.6.12.1.2 beschrieben hergestellt. Alle Lösungen werden wie unter Punkt 3.6.12.1.5 beschrieben auf eine Platte aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt wie unter Punkt 3.6.12.1.7 beschrieben, die Derivatisierung erfolgt wie unter Punkt 3.6.12.1.8 beschrieben, die Dokumentation erfolgt nach Punkt 3.6.12.1.9. Die Ergebnisse der Chromatographie werden mit denen aus Punkt 3.6.12.1.10 verglichen. Der Test auf Verfälschung wird akzeptiert, wenn der Fingerprint der Verfälschung/Verwechslung signifikant unterschiedlich zum Fingerprint bezüglich Lage, Intensität und Farbe der authentischen Droge ist.

3.6.12.2.4 Kalibrierung

3.6.12.2.4.1 Messbereich (Range)

Zur Quantifizierung der Markersubstanz in [x] unbekannten Gehalts muss der Messbereich festgelegt werden. Dazu werden alle vorhandenen Proben nach Punkt 3.6.12.1.1 extrahiert, eine Referenzlösung bekannter Konzentration nach 3.6.12.1.2 hergestellt und verdünnt. Die Testlösung wird mit den verschiedenen Verdünnungen auf eine HPTLC-Platte aufgetragen (3.6.12.1.5) und chromatographiert nach Punkt 3.6.12.1.7. Nach Annahme, dass die Konzentration der Markersubstanz und das gemessenen Detektorsignal proportional sind, wird der Mittelwert des Signals aller vorhandenen Proben errechnet und als Mittelpunkt der Kalibriergeraden definiert. Als Messbereich werden Mitte \pm 50% (50-150%) festgesetzt. Es werden 5-10 Kalibrierlösungen verschiedener Konzentrationen in äquidistantem Abstand hergestellt. Falls eine Probenlösung nicht im Messbereich liegt, muss die Kalibrierung angepasst werden.

3.6.12.2.5 Lineare Regression

Für die Erstellung der Kalibriergerade werden die gemessenen Werte in Abhängigkeit der Konzentration der Kalibrierlösung verwendet. Es wird eine Gerade berechnet, bei der die Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung den niedrigsten Wert annimmt. Diese Gerade wird durch die Formel 1 bis Formel 9 beschrieben.

3.6.12.2.5.1 Reststandardabweichung s_y

Die Reststandardabweichung s_y wird mit Formel 10 beschrieben

3.6.12.2.5.2 Verfahrensstandardabweichung s_{x0}

Die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} wird mit Formel 11 berechnet

3.6.12.2.5.3 relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0}

Die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} errechnet sich nach Formel 12

3.6.12.2.6 Quadratische Regression

Für die Berechnung der Kalibrierkurve werden die gemessenen Werte in Abhängigkeit der Konzentration/Menge der Kalibrierlösung verwendet. Es wird eine polynomische Funktion ermittelt, in dem der niedrigste Wert der Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung bestimmt wird. Diese Funktion wird durch Formel 13 bis Formel 21 beschrieben.

3.6.12.2.6.1 Reststandardabweichung s_y

Die Berechnung der Reststandardabweichung s_y erfolgt mit Formel 22.

3.6.12.2.6.2 Verfahrensstandardabweichung s_{x0}

Die Empfindlichkeit und die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} werden mit Formel 23 und Formel 24 berechnet.

3.6.12.2.6.3 Relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0}

Die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} errechnet sich nach Formel 12

3.6.12.2.7 Kalibrierfunktion

Erstellen der Kalibrierfunktion und den berechneten Parametern n, m und x

$$y = n * x^2 + m * x + b$$

3.6.12.2.8 Bestimmtheitsmaß r^2

Das Bestimmtheitsmaß r^2 beschreibt die Gesamtstreuung der Regressionsgerade. Die Berechnung wird mit Gleichung (Formel 30) vorgenommen:

3.6.12.2.9 Wiederholpräzision

Fünf Testlösungen einer Probe werden nach 3.6.12.1.1 unabhängig voneinander hergestellt. Auf fünf 20 x 10 cm Platten werden jeweils eine Testlösung und die Kalibrierungsstandards

Material und Methoden 58

(5-10 Levels) aufgetragen (3.6.12.1.5). Die Platten werden wie unter Punkt 3.6.12.1.7 beschrieben chromatographiert, falls nötig derivatisiert nach 3.6.12.1.8 und mit denselben Geräteeinstellungen wie unter Punkt 3.6.12.1.13.6 vermessen. Es wird dieselbe Kammer verwendet, aber mit frischem Fließmittel und frischem Filterpapier. Die Platten werden dokumentiert wie unter Punkt 3.6.12.1.9 und 3.6.12.1.11 beschrieben. Für jede Platte wird der Gehalt der Markersubstanz durch die Kalibrierlösungen auf derselben Platte berechnet. Die Ergebnisse von Platte zu Platte werden ausgewertet und der Test auf Wiederholpräzision wird akzeptiert, wenn der Variationskoeffizient V_K (Formel 31) unter 10% liegt.

3.6.12.2.10 Laborpräzision

Das unter Punkt 3.6.12.2.9 beschriebene Experiment wird jeweils einmal an vier weiteren Tagen wiederholt. Für jede Platte wird der Gehalt der Markersubstanz durch die Kalibrierlösungen auf derselben Platte berechnet. Die Ergebnisse von Platte zu Platte werden ausgewertet und der Test auf Wiederholpräzision wird akzeptiert, wenn der Variationskoeffizient V_K (Formel 31) unter 10% liegt.

3.6.12.2.11 Probenauswertung

Mit den Kalibrierfunktionen wird die Konzentration der Markersubstanz in den unbekannten Proben berechnet. Die Kalibrierfunktion unter Punkt 3.6.12.2.7 wird nach x umgestellt und die Konzentration wird berechnet.

Formel 42

$$\hat{x} = \frac{-m \pm \sqrt{m^2 - 4n(b - \hat{y})}}{2n}$$

\hat{x} berechnete Menge/Konzentration der Substanz X

\hat{y} gemessenes Signal der Substanz X

Der prozentuale Gehalt der Proben wird nach Formel 33 und Formel 34 berechnet.

3.6.12.2.12 Prognoseintervall

Der Gesamtfehler aus Kalibrierung und Messung der Proben wird statistisch bewertet. Der „wahre“ Wert der Probe kann durch die Messung nur abgeschätzt werden, da die Kalibrierung und die Messung mit Fehlern behaftet sind. Aus dem Fortpflanzungsgesetz

ergibt sich, dass die „wahre“ unbekannte Gerade zwischen zwei Hyperbelästen liegt, die wie folgt berechnet wird:

Formel 43

$$y_{u,o} = x \pm s_y * t * \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{(x - \bar{x})^2}{Q_{xx}}}$$

s_y Reststandardabweichung

t t -Faktor der zweiseitigen Tabelle mit $f=N-2$ und $P=95\%$

N Anzahl der Kalibrierlösungen

\hat{N} Anzahl der Parallelbestimmungen

\bar{x} Arbeitsbereichsmitte

Q_{xx} Quadratsumme x (Formel 14)

Die Berechnung des Prognoseintervalls erfolgt mit Formel 35 bis Formel 38.

3.6.12.2.13 Robustheit- Entwicklungsdistanz

Das unter Punkt 3.6.12.2.9 beschriebene Experiment wird mit Änderung der Entwicklungsdistanz wiederholt. Die Entwicklungsstrecke wird um 5 mm erniedrigt und um 5 mm erhöht. Der Test auf Robustheit wird akzeptiert, wenn der Variationskoeffizient V_K (Formel 31) unter 10% liegt.

3.6.12.2.14 Wiederfindungsrate

Zu einer definierten Menge an pulverisierter Droge wird ca. 10% der Markersubstanz zugegeben. Die Droge wird wie unter Punkt 3.6.12.1.1 hergestellt und wie unter Punkt 3.6.12.1.5 und 3.6.12.1.7 chromatographiert. Die Wiederfindung berechnet sich mit Formel 39. Der Test wird akzeptiert, wenn die Wiederfindungsrate bei 90-110% liegt.

3.6.12.2.15 Nachweisgrenze:

Die Berechnung der Nachweisgrenze erfolgt mit Formel 40

3.6.12.2.16 Quantifizierungsgrenze:

Die Berechnung der Nachweisgrenze erfolgt mit Formel 41

Material und Methoden 60

4 Haariges Besenbeifußkraut

4.1 Einleitung

Artemisia L. ist die größte und am weitesten verbreitete Gattung des Tribus Anthemideae sowie der Familie der Asteraceae und umfasst mehr als 400 Spezies [64], die hohen ökonomischen Wert sowohl als Nahrungsmittel, Futtermittel, Arzneipflanzen und Zierpflanzen haben [65]. Aufgrund genetischer und morphologischer Unterschiede kann die Gattung *Artemisia* in 5 verschiedenen Sectionen oder Untergattungen eingeteilt werden: *Absinthium* DC., *Artemisia* L. (=*Abrotanum* BESSER), *Dracunculus* BESSER, *Seriphidium* BESSER und *Tridentatae* (RYDB) MCARTHUR [65]. Viele Spezies der Gattung *Artemisia* sind reich an ätherischem Öl und werden z.T. wegen ihrer antibakteriellen und antioxidativen Eigenschaften pharmazeutisch verwendet [66]. Das Inhaltsstoffspektrum reicht von Flavonoiden, Cumarienen, Mono- und Sesquiterpene, Caffeoylchinasäuren bis zu Acetylenen und Sterolen [67]. Im aktuellen Chinesischen Arzneibuch werden *Artemisa annua* L., *Artemisa argyi* LÉVL. ET VANT., *Artemisa capillaris* THUNB. und *Artemisa scoparia* WALDST. ET KIT. als Arnzeidrogen gelistet [68], jedoch wurde bislang nur *Artemisiae scopariae herba* zur Implementierung in das Deutsche bzw. Europäische Arzneibuch ausgewählt [69]. Sowohl *Artemisa capillaris* THUNB. als auch *Artemisa scoparia* WALDST. ET KIT. können als Stammpflanzen für *Artemisiae scopariae herba* verwendet werden, sind botanisch jedoch schwierig zu unterscheiden. Laut Bestimmungsschlüssel der Flora of China [70] ist *Artemisia scoparia* 1-, 2- oder mehrjährig, besitzt eine deutliche Hauptwurzel und lineal-fadenförmige oder lineal-lanzettliche Blätter. *Artemisia capillaris* hingegen ist ein mehrjähriges Kraut oder Halbstrauch mit mehreren Hauptwurzel und linealischen Blättern (Abbildung 2). Bei Vorliegen der Krautdroge scheint eine Unterscheidung zwischen den beiden Stammpflanzen demnach kaum möglich zu sein.

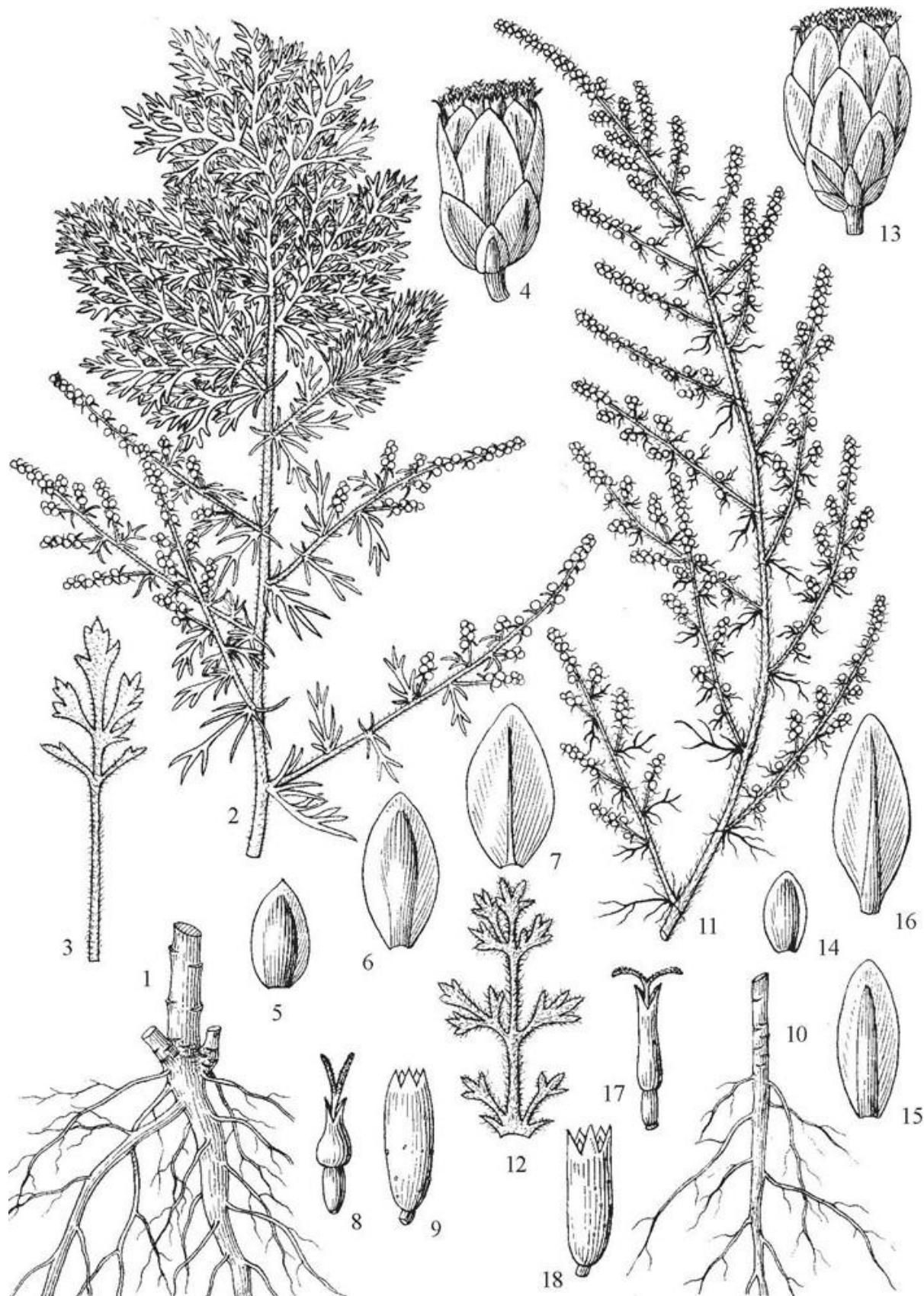


Abbildung 2: Illustration der beiden Stammpflanzen von *Artemisia scopariae herba*; 1-9: *Artemisia capillaris* THUNB. 1: Unterirdischer Teil, 2: Oberirdischer Teil, 3: Blatt, 4: Köpfchen, 5-7: Hüllblätter, 8: Weibliche Einzelblüte, 9: Zwitterige Einzelblüte, 10-18: *Artemisia scoparia* WALDST ET KIR. 10: Unterirdischer Teil, 11: Oberirdischer Teil, 12: Blatt, 13: Köpfchen, 14-16: Hüllblätter, 17: Weibliche Einzelblüte, 18: Zwitterige Einzelblüte [71]

Sowohl *Artemisia capillaris* also auch *Artemisia scoparia* gehören zur Section *Dracunculus* und zeichnen sich durch das Fehlen von den für *Artemisia* typischen [72] Sesquiterpenlactonen aus [64]. Ferner finden sich verschiedene Cumarine wie Scoparon und Scopoletin [73], Mono- und Dicaffeoylchinasäuren (Chlorogensäure) [74], Flavonoidglykoside (Rutin) [75] und methoxylierte Flavonoide (Arcapillin) [76]. Im ätherischen Öl beider Pflanzen finden sich darüber hinaus Mono-und Sesquiterpene sowie Acetylene (Capillen) [77].

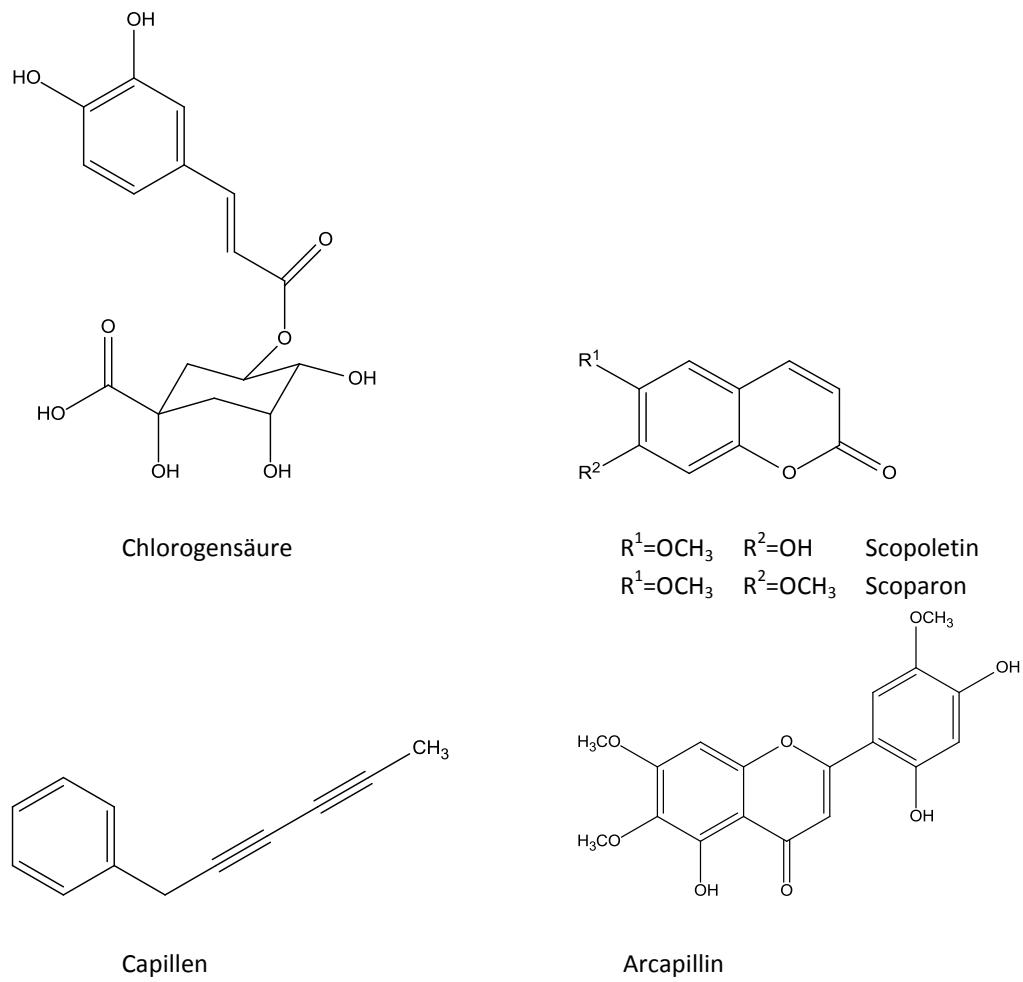


Abbildung 3: Inhaltsstoffe von *Artemisiae scopariae herba*

In der TCM-Praxis wird *Artemisiae scopariae herba* bei Gelbsucht und Leberentzündungen [78] verwendet, wobei keine toxischen Inhaltsstoffe bekannt sind. Außerdem zeigte die einmalige und wiederholte Gabe von PAI-N002, einer chinesischen Rezeptur die *Artemisia capillaris* beinhaltet, keine akuten Nebenwirkungen in Ratten [79].

Pharmakologische Untersuchungen des Drogenextraktes legen nah, dass einerseits choleretische [80], aber andererseits auch antiinflammatorische Wirkungen vorhanden sind [81], was die traditionelle Anwendung unterstreicht.

Haariges Besenbeifußkraut 64

Die klinische Wirksamkeit von Artemisiae scoparia herba Dekokten konnte bei infektiöser Hepatitis und Hypercholesterolemie belegt werden. Darüber hinaus konnte die Wirkung des ätherischen Öls bei äußerlichen Pilzerkrankungen nachgewiesen werden [16].

Des Weiteren sind auch andere Anwendungsgebiete denkbar, da antidiabetische [82], antinociceptive und antipyretische [83], sowie thrombozytenaggregationshemmende Eigenschaften und Aktivität gegen HIV Replikation in Lymphozyten [84] untersucht wurden. Die Suche nach pharmakologisch wirksamen Verbindungen in Artemisiae scopariae herba führte zu vielen interessanten Sekundärstoffen. Liu und Ye identifizierten *p*-Hydroxyacetophenon als choleretisch wirksame Substanz [85]. Aus diesem Grund wird sie neben Chlorogensäure als analytischer Marker im Monographieentwurf des HKCMMS verwendet. Die antiinflammatorische [86], [87], antiarteriosklerotische [88] und antihepatotoxische Wirkung [89] des Cumarins Scoparon wird mehrfach in der Literatur beschrieben. Auch Caffeoylchinasäuren scheinen pharmakologisch aktiv zu sein, da sie in der Lage sind, die Lipidperoxidase in Ratten- und Mäuse-Mikrosomen zu hemmen und somit Schädigungen in Lebergefäßen verhindern können [74].

4.2 Methoden

4.2.1 Dünnschichtchromatographie

Tabelle 12: Methoden zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung von *Artemisiae scopariae herba*

Methode	Herstellung Testlösung	Herstellung Referenzlösung	Fließmittel	Entwicklungs-strecke	Applikations-volumen
Flavonoidglykoside	1,0 g gepulverte Droge (500) wurde mit 10 ml MeOH versetzt, 30 min im Ultraschallbad extrahiert, zentrifugiert oder gefiltert. Der Überstand wurde als Testlösung verwendet.	-	Ethylacetat, Ameisensäure, Essigsäure, H ₂ O (30:2:2:4)	6 cm	10 µl
Sesquiterpenlactone DAB 9	1,0 g pulverisierte Droge (500) werden 2-3 min mit Dichlormethan geschüttelt, filtriert und das Filtrat auf die Hälfte eingeengt	2 mg Phloroglucin, Resorcin, Methylrot und 50 ml Thujon wurden in 10 ml MeOH gelöst.	Dichlormethan, Aceton (90:10)	8 cm	2,5 bzw 5 µl

Haariges Besenbeifußkraut 66

Sesquiterpenlactone Ph. Eur 7.1	2,0 g pulverisiert Droge (500) wurden mit 50 ml siedendem H ₂ O übergossen, geschüttelt und abkühlen lassen. Danach wurde die Lösung mit 5 ml Pb(OAc) ₂ (100 g/l) versetzt, filtriert und Kolben und Rückstand mit 20 ml H ₂ O gewaschen. Das Filtrat wurde mit 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt .Die organische Phase wurde mit Na ₂ SO ₄ getrocknet, filtriert und eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Ethanol (96%) aufgenommen.	2 mg Resorcin und Methylrot wurden in 10 ml MeOH gelöst.	Aceton, Essigsäure, Toluol, Dichlormethan (10:10:30:50)	6 cm	5 bzw. 10 µl
Ätherisches Öl	Destilliertes ätherisches Öl	-	CHCl ₃	6 cm	5 µl
Mianyinchén ChP 2010	0,5 g gepulverte Droge (500) wurde mit 20 ml MeOH 50% versetzt, 30 min im Ultraschallbad extrahiert und anschließend zentrifugiert oder gefiltert. Der Überstand wurde als Testlösung verwendet.	1 mg Chlorogensäure wurden in 10 ml MeOH gelöst	Ethylacetat, Ameisensäure, H ₂ O (7:2,5:2,5), obere Phase	6 cm	2 bzw. 5 µl

Huayinchen ChP 2010	0,4 g gepulverte Droge (500) wurde mit 10 ml MeOH versetzt, 30 min im Ultraschallbad extrahiert, anschließend das Lösemittel abrotiert und in 2 ml MeOH aufgenommen.	4 mg Scoparon wurden in 10 ml MeOH gelöst	Petrolether(60-90°C), Ethylacetat, Aceton (6:3:0,5)	6 cm	5 µl
Chlorogensäure Ph. Eur-Arnicae flos	2,0 g pulverisierte Droge (500) wurden mit 10 ml MeOH für 5 min auf dem Wasserbad von 60 °C erhitzt und nach dem Abkühlen filtriert.	1 mg Chlorogensäure wurde in 10 ml MeOH gelöst.	Ameisensäure, H ₂ O, Ethylmethylketon, Ethylacetat (10:10:30:50)	6 cm	4 µl
Chlorogensäure Ph. Eur-Cynarae folium	2,0 g pulverisierte Droge (500) wurden mit 20 ml Ethanol 60% versetzt, 2 h unter gelegentlichem Schütteln stehen gelassen und filtriert	1 mg Chlorogensäure wurde in 10 ml MeOH gelöst	Ameisensäure, Eisessig, H ₂ O, Ethylacetat (11:11:27:100)	6 cm	4 µl
Chlorogensäure Ph. Eur-Urticae folium	1,0 g gepulverte (500) Probe wurden mit 10 ml MeOH versetzt, im Ultraschallbad für 15 min extrahiert filtriert, eingedampft und in 2 ml MeOH aufgenommen.	1 mg Chlorogensäure wurde in 10 ml MeOH I gelöst	Ameisensäure, MeOH, H ₂ O, Ethylacetat (2,5:4:4:50)	6 cm	4 µl

Haariges Besenbeifußkraut 68

Neu entwickelte Methode	0,1 g gepulverte (500) Probe wurden mit 10 ml MeOH 50% versetzt, im Ultraschallbad für 30 min extrahiert und anschließend zentrifugiert oder gefiltert. Der Überstand wurde als Testlösung verwendet.	1 mg Chlorogensäure und 2,5 mg Rutin wurden in jeweils 10 ml MeOH gelöst.	Ameisensäure Eisessig, H ₂ O, Ethylacetat (11:11:27:100)	6 cm	4 µl
HKCMMS-Monographieentwurf	1,0 g gepulverte (500) Probe wurden mit 25 ml MeOH versetzt, im Ultraschallbad für 30 min extrahiert und anschließend gefiltert.	1,0 mg Chlorogensäure wurden in 1 ml MeOH gelöst.	Butylacetat, Ameisensäure, H ₂ O (28:13:10), obere Phase	6 cm	1 bzw. 2 µl

4.2.2 Flüssigkeitschromatographie

Tabelle 13: Methoden zur flüssigkeitschromatographischen Untersuchung von Artemisiae scopariae herba

Methode	Herstellung Testlösung	Fließmittel, Flussrate	Säule, Temperatur	Detektion	Injektions- volumen
Methode nach ChP 2010	1,0 g pulverisierte (500) Droge wurden mit 50 ml MeOH 50% im Ultraschallbad 30 min extrahiert, filtriert und auf 50 ml mit MeOH 50% aufgefüllt. 5 ml der Lösung wurden entnommen und mit MeOH 50% auf 25 ml aufgefüllt	A: ACN, H ₃ PO ₄ 0,05% (10:90) B :ACN, H ₂ O (95:5), 0-30 min: 100% A, 30-40 min 100-80% , 40- 45 min 80-0%, 45-50 min 0%, 50- 60 min 0-100% A, 1,0 ml/min	RP-18, 250 x 4,6 5 µm, 25 °C	327 nm	10 µl
Methode nach Ph. Eur 7.3-Cynarae folium	0,5 g pulverisierte (500) Droge wurden mit 50 ml MeOH 50% 1 h unter Rückfluss bei 70 °C extrahiert, filtriert und auf 100 ml mit H ₂ O aufgefüllt.	A: H ₃ PO ₄ 85%, H ₂ O (0,5:99,5) B: H ₃ PO ₄ 85%, ACN (0,5:99,5), 0- 1 min: 92% A, 1-20 min 92-75% , 20-33 min 75%, 33-35 min 75- 0%, 35-40 min 0% A, 40-50 min 0-92% A, 1,2 ml/min	RP-18, 250 x 4,6 5 µm, 40 °C	330 nm	25 µl

Haariges Besenbeifußkraut 70

HKCMMS-Monographieentwurf	0,1 g pulverisierte (500) Droge wurden mit 25 ml MeOH 50% 30 min im Ultraschallbad extrahiert, filtriert und auf 25 ml mit MeOH 50% aufgefüllt.	A: H ₃ PO ₄ 85%, H ₂ O 0,1% B: MeOH, 0-10 min: 75% A, 10-30 min 75-55%, 30-50 min 55% A 1,0 ml/min	RP-18, 250 x 4,0 5 µm, 25 °C	275 nm	10 µl
---------------------------	---	---	---------------------------------	--------	-------

4.3 Makroskopische Beschreibung

Die Ph. Eur Prüfung auf Identität A erschien schwierig, da von den meisten Importeuren keine Angabe hinsichtlich der Stammpflanze des Drogenmaterials respektive des Erntezeitpunktes gemacht wurde.

Die Krautdroge war grün bis grau-grün mit kurzen, dünnen ca. 1,5-3,0 cm langem, längsgefurchten, Stängel. Die aus China importierte Droge war verknäult mit weiß behaarten Blättern und Stängelanteilen (Abbildung 5 und 6). Manche Proben waren sehr klein geschnitten (Abbildung 4), es fanden sich auch Stängel mit Wurzelanteilen (Abbildung 7), was auf eine im Herbst geerntete Droge hinweist. Die Blätter waren eiförmig, 1-3 cm lang und einfach oder dreizählig gefiedert.

Die in Bayern angebaute Droge zeigte eine deutlichere Grünfärbung als alle importierten Muster und besaß eine wesentlich geringere Behaarung (Abbildung 8). Zudem unterschieden sich die Drogen in der Blattform. Während die chinesische Droge eiförmige Blätter aufwies, zeigte die Droge bayerischer Herkunft eher eine lanzettliche oder lineare Form (Abbildung 9).

Haariges Besenbeifußkraut 72



Abbildung 4: Import aus China (Chengdu), vermutlich Mianyinchen



Abbildung 5: Import aus China (Chengdu), Detail



Abbildung 6: Import aus China (Yong Quan), vermutlich Yinchenhao



Abbildung 7: Import aus China (Yong Quan), Detail



Abbildung 8: Deutsche Anbaudroge



Abbildung 9: Deutsche Anbaudroge, Detail

4.4 Mikroskopische Beschreibung

Die pulverisierte Droge wurde gesiebt (Sieb mit 500 µm Maschenweite, [53]) und mit Chloralhydrat-Lösung R aufgehellt. Im grau-grünen Pulver fanden sich anomocytische Stomata (Abbildung 10, [90]) und Epidermiszellen mit wellig gekrümmten Antiklinalwänden und einen Längsdurchmesser von 30- 100 µm. Gelegentlich waren Asteraceen-Drüsenhaare mit ovalen aus 2 Drüsenzellen aufgebauten Drüsen sichtbar, die mit gelbem Öl gefüllt waren (Abbildung 11). Am häufigsten waren T-Haare, die aus einem Stiel und einem Querbalken bestanden (Abbildung 12). Der Querbalken der T-Haare verlief gerade oder war an der Übergangsstelle zur Basis V-förmig geknickt. Die beiden Äste waren unterschiedlich lang (Gesamtlänge von 600-1000 µm) und saßen meist auf einer, teilweise auch auf zwei Stielzellen.



Abbildung 10: Spaltöffnung, 200-fache Vergrößerung



Abbildung 11: Stiel mit Drüsenhaar, 200fache Vergrößerung



Abbildung 12: T-Haare mit einer Stielzelle, 100-fache Vergrößerung

4.5 Dünnschichtchromatographische Untersuchung

4.5.1 Untersuchung verschiedener Fingerprints der vorhandenen Inhaltsstoffe

Angesichts des Fehlens einer Prüfung auf Identität C mittels Dünnschichtchromatographie aufweist im ChP 2005 [91], wurden anhand der Inhaltstoffspektren von *Artemisia scoparia* und *Artemisia capillaris* verschiedene Fingerprints analysiert. Da es sich um eine Krautdroge handelt und in der Literatur Flavonoide dokumentiert sind [76], [92], wurde das Flavonoidspektrum untersucht. Des Weiteren wurden auf Sesquiterpene, entsprechend der Monographie von *Artemisia absinthium* im DAB 9 und Ph. Eur 7.1, und das ätherische Öl Spektrum getestet.

4.5.1.1 Flavonoidglykoside

Das HPTLC-Fingerprint der Flavonoidglykoside nach Methode Tabelle 12 Flavonoidglykoside und Derivatisierung mit Naturstoff-/ Macrogolreagenz zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen der in China und der in Deutschland angebauten Droge. Im Drogenmaterial aus deutschem Anbau (Abbildung 13, Bahn 4, 6-9) war eine orange fluoreszierende Flavonoidbande bei $R_F = 0,5$ sichtbar, die in den übrigen Drogenmustern nicht zu erkennen war.

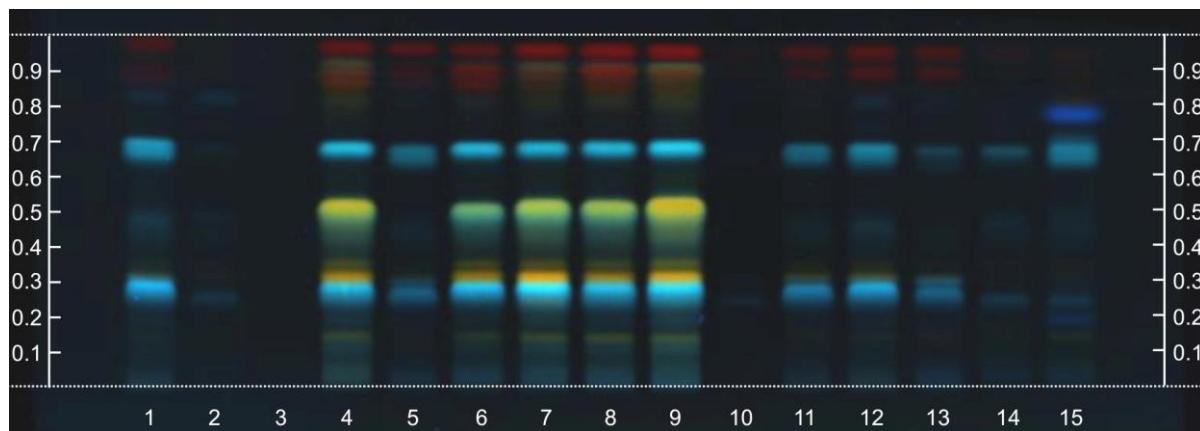


Abbildung 13: Fingerprint Flavonoidglykoside, Bahn 1-3, 5, 10-13: *Artemisiae scopariae herba* Extrakt aus chinesischem Import jeweils 10 µl; Bahn 4, 6-9: *Artemisiae scopariae herba* Extrakt aus deutschem Anbau jeweils 10 µl; Bahn 14, 15: Extrakte der Verwechslung *A. absinthium*, *A. annua*, jeweils 10 µl; FM: Ethylacetat, Ameisensäure, Essigsäure, Wasser (30:2:2:4), Entwicklungsstrecke 6 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/ Macrogol-Reagenz, 366 nm

Die orange Farbe und Lage der Bande lies auf ein Flavonoidmonoglykosid [93] mit 3',4'-Dihydroxystruktur des B-Rings [94] schließen. Um weitere Informationen über die Struktur dieser fraglichen Substanz zu bekommen, wurden die Proben aus deutscher Herkunft erneut chromatographiert, und durch das TLC-MS Interface mittels APCI-MS vermessen. Es ergab

sich eine Masse von $[M+H^+]$ 449,10 m/z . Zur weiteren Untersuchung wurde das Flavonoid isoliert und die Struktur mittels HR-MS und NMR aufgeklärt (4.11).

4.5.1.2 Sesquiterpenlactone

Bisher wurden noch keine Sesquiterpenlactone in der Section *Dracunculus* [64], zu der *Artemisia scoparia* und *Artemisia capillaris* gehören, gefunden, aber da diese Stoffklasse häufig in der Gattung Artemisia zu finden ist [72], [95] wurde der Sesquiterpen-Fingerprint analog der DAB 9 [96] und der Ph. Eur 7.1 [97] Monographie *Artemisiae absinthii* herba getestet.

Die Überprüfung der DAB Monographie (Tabelle 12, Sesquiterpenlactone DAB 9) ergab, dass sich weder Absinthin (Bahn 3, *Artemisia absinthium*, blau-braune Bande bei $R_F = 0,25$) noch Artabsin (Bahn 3, *Artemisia absinthium*, eine blaue Bande direkt unter Methylrot bei $R_F = 0,52$) in *Artemisiae scopariae* herba nach Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz sichtbar waren (Abbildung 14).

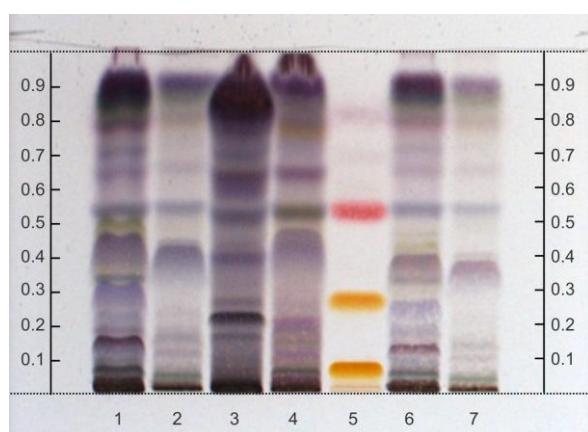


Abbildung 14: Fingerprint Sesquiterpenlactone DAB, Bahn 1, 6: *Artemisiae scopariae* herba Extrakt aus deutschem Anbau 5 bzw. 2,5 µl; Bahn 2, 7: *Artemisiae scopariae* herba Extrakt aus chinesischem Import 5 bzw. 2,5 µl; Bahn 3, 4: Extrakte der Verwechslung *A. absinthium*, *A. annua*, jeweils 5 µl; Bahn 5: Referenzlösung Phloroglucin, Resorcin, Methylrot, Thujon 10 µl; FM: Dichlormethan, Aceton (90:10), Entwicklungsstrecke 8 cm, Derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, Weißlicht

Durch die Aufarbeitung des Extraktes (Tabelle 12, Sesquiterpenlactone Ph. Eur7.1) nach der *Artemisiae absinthii* herba Monographie im Ph. Eur 7.1 verringerte sich die Bandenanzahl im HPTLC-Chromatogramm (Abbildung 15), da Begleitstoffe durch $Pb(OAc)_2$ ausgefällt wurden. Dennoch zeigte sich im Fingerprint von *Artemisiae scopariae* herba beider Herkünfte nach Derivatisierung mit Acetanhydrid-Schwefelsäurerereagenz, weder eine blaue Artabsinbande oberhalb des Methylrots (Bahn 3, *Artemisia absinthium*, $R_F = 0,62$) noch die bräunliche Zone des Absinthins oberhalb der Resorcinbande (Bahn 3, *Artemisia absinthium*, $R_F = 0,48$).

Haariges Besenbeifußkraut 76

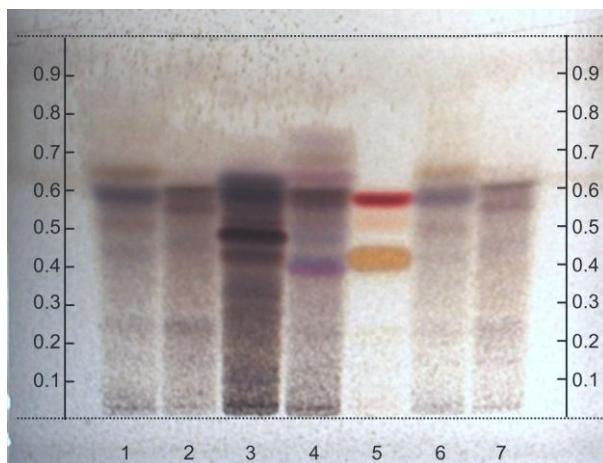


Abbildung 15: Fingerprint Sesquiterpenolactone Ph. Eur 7.1 , Bahn 1, 6: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus deutschem Anbau 10 bzw. 5 µl; Bahn 2, 7: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import 10 bzw. 5 µl; Bahn 3, 4: Extrakte der Verwechslung *A. absinthium*, *A. annua*, jeweils 10 µl; Bahn 5: Referenzlösung Resorcin, Methylrot 10 µl; FM: Aceton, Essigsäure, Toluol, DCM (10:10:30:50), Entwicklungsstrecke 7 cm, Derivatisiert mit Acetanhydrid-Schwefelsäure-Reagenz, Weißlicht

Keine der beiden Methoden zur Identitätsbestimmung von *Artemisia absinthii* mit Sesquiterpenolactonen als mögliche Markersubstanzen konnte für die DAB Monographie für *Artemisiae scopariae herba* verwendet werden, da keine charakteristischen Zonen im Chromatogramm zu erkennen waren.

4.5.1.3 Ätherisches Öl

Als weitere Inhaltsstoffgruppe in *Artemisiae scopariae herba* wird das ätherische Öl [98] beschrieben. Das ätherische Öl wurde durch Destillation gewonnen, nach Methode Tabelle 12 (Ätherisches Öl) chromatographiert und mit Anisaldehydreagenz derivatisiert. Das Chromatogramm (Abbildung 16) zeigte bei 366 nm und bei Weißlicht deutliche Unterschiede an Bandenanzahl und Intensität. Während das Pflanzenmaterial aus China (Bahn 1-10) eine zusätzliche braune Bande bei $R_F = 0,21$ im Weißlicht zeigte, war bei dem bayerischen Material (Bahn 11-14) eine weiß fluoreszierende Bande bei 366 nm $R_F = 0,58$ sichtbar. Um die Unterschiede zu charakterisieren, wurden die einzelnen Komponenten des ätherischen Öls mittels GC-FID vermessen und GC-MS identifiziert (4.10).

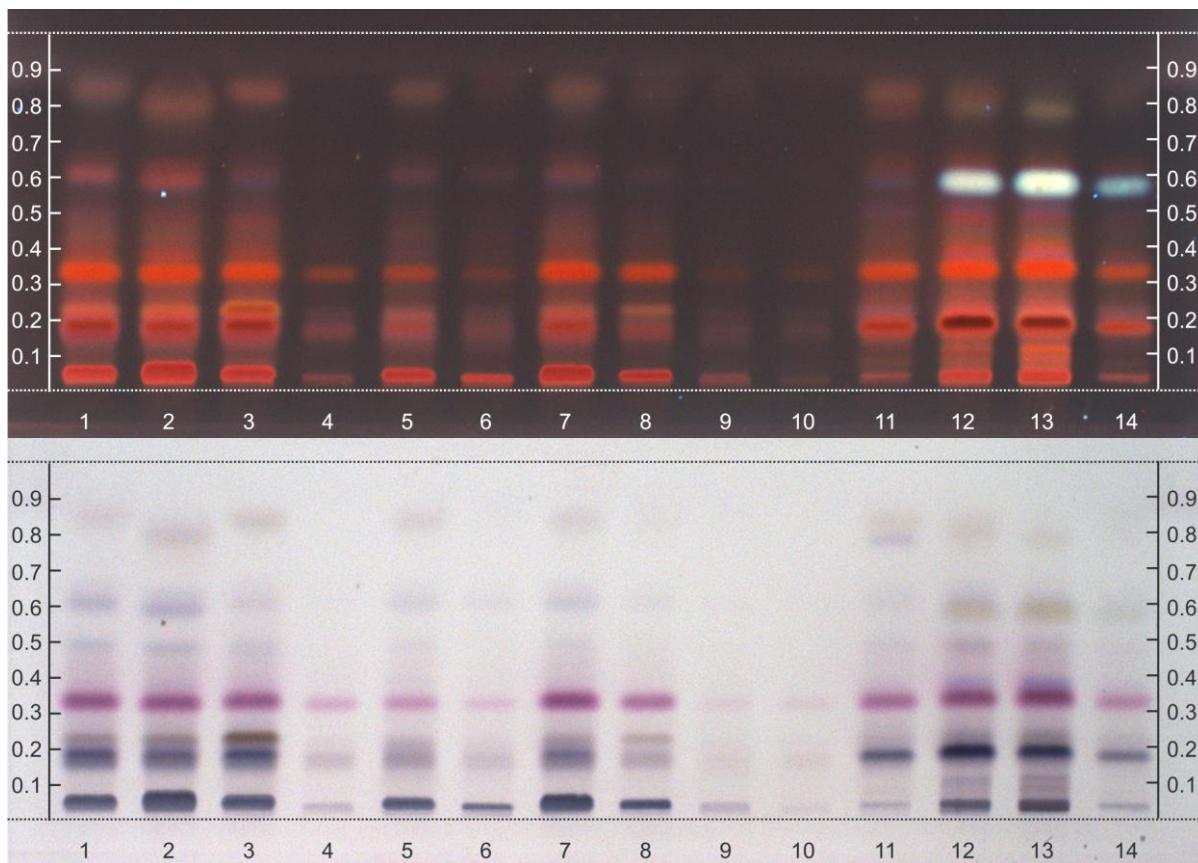


Abbildung 16: Fingerprint ätherisches Öl, Bahn 1-10: Ätherisches Öl von *Artemisiae scopariae herba* aus chinesischem Import jeweils 5 µl; Bahn 11-14: Ätherisches Öl von *Artemisiae scopariae herba* aus deutschem Anbau jeweils 5 µl; FM: Chloroform, Entwicklungsstrecke 6 cm, Derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, 366 nm und Weißlicht

Auf Grund des unterschiedlichen Fingerprints des ätherischen Öls konnte dieses nicht zur Prüfung der Identität für die DAB Monographie von *Artemisiae scopariae herba* verwendet werden.

4.5.2 Evaluation der neuen Monographie ChP 2010

In der 2010 erschienenen Auflage des ChP wird erstmals in der Monographie für *Artemisiae scopariae herba* eine Identifizierung mit Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Zwei verschiedenen Markersubstanzen werden verwendet um einerseits die Identität und den Erntezeitpunkt der Droge zu bestimmen.

4.5.2.1 *Mianyinchen* (Frühjahrsdroge)

Chlorogensäure wird als analytischer Marker benutzt, um die Frühjahrsdroge zu Identifizieren. Bei $R_F = 0,2$ (Tabelle 12, *Mianyinchen* ChP 2010) zeigte sich bei beiden *Artemisiae scopariae herba* Proben aus den verschiedenen Herkünften bei 366 nm nach Derivatisierung mit Naturstoff-/ Macrogolreagenz eine deutlich scharfe, blau fluoreszierende Chlorogensäure-Bande (Abbildung 17).

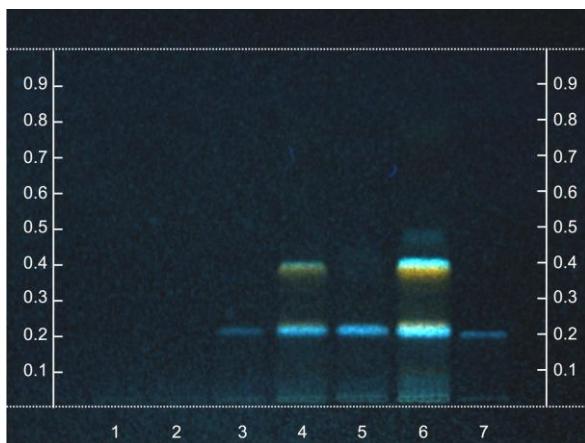


Abbildung 17: ChP 2010- Mianyinchen; Bahn 1, 2: Extrakte der Verwechslungen *A. absinthium* und *A. annua*, jeweils 2 µl; Bahn 3, 5: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 2 bzw. 5 µl; Bahn 4, 6: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 2 bzw. 5 µl; Bahn 7: Referenzsubstanz Chlorogensäure, 2 µl, FM: Ethylacetat, Ameisensäure, Wasser, (7:2.5:2.5), obere Phase, Entwicklungsstrecke 6 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/Macrogol-Reagenz, 366 nm

Das Fließmittelsystem schien nicht für die DAB Monographie geeignet, da die Reproduzierbarkeit bei zweiphasigen Systemen gering ist. Des Weiteren gab es im Ph. Eur 7.0-7.7 verschiedene Monographien, bei denen Chlorogensäure zur Identifizierung als analytischer Marker mit verschiedenen Fließmitteln verwendet wurde. Auf Grund der Harmonisierung der Arzneibücher wurden die Ph. Eur Fließmittelsysteme von Arnicae flos [99], Cynarae folium [100] und Urticae folium [101] zur Identifizierung von Artemisiae scopariae herba evaluiert.

4.5.2.2 Huayinchen- Yinchenhao (Herbstdroge)

Die Identität der blütenreichen Herbstdroge Huayinchen wird mit Hilfe der Markersubstanz Scoparon ermittelt, welche bei $R_F = 0,18$ (Tabelle 12, Huayinchen ChP 2010) unter 366 nm eine scharfe blau fluoreszierende Bande zeigte (Abbildung 18). Jedoch konnte das Cumarinderivat Scoparon in keiner der untersuchten Handelsproben nachgewiesen werden. Dies deutete daraufhin, dass bei den Handelsdrogen die Frühjahrsware vorlag. Eine Unterscheidung der Erntezeitpunkte schien für die DAB Monographie von Artemisiae scopariae herba nicht sinnvoll, weshalb Chlorogensäure als analytischer Marker zu Identifizierung weiterhin verwendet wurde.

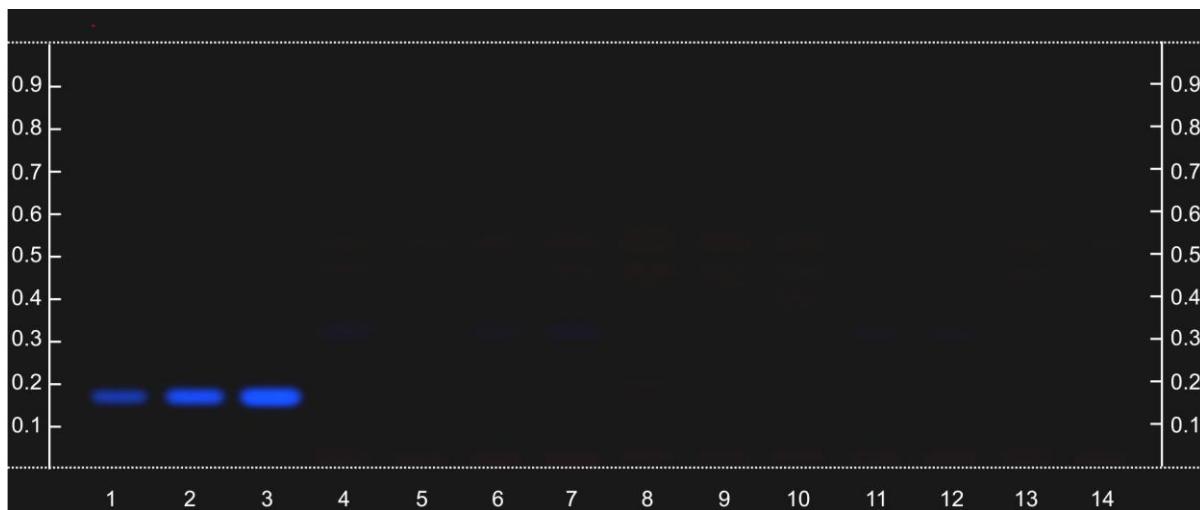


Abbildung 18: ChP 2010-Huayinchen-Yinchenhao; Bahn 1-3: Referenzsubstanz Scoparon 1, 2,5, 5 µl; Bahn 4-7, 11-14: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 5 µl; Bahn 8-10: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 5 µl; FM: Petrolether (60-90 °C), Ethylacetat, Aceton (6:3:0,5), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

4.5.3 Chlorogensäure als analytischer Marker

Die Evaluierung der Monographie im ChP 2010 von Artemisiae scopariae herba ergab, dass Chlorogensäure ein geeigneter analytischer Marker zur dünnenschichtchromatographischen Identitätsbestimmung darstellt. Da bereits Monographien mit Chlorogensäure als Markersubstanz zur Identitätsprüfung im Ph. Eur enthalten sind, wurde ihre Anwendbarkeit für Artemisiae scopariae herba untersucht.

4.5.3.1 Fließmittelsysteme in der Ph. Eur

Dazu wurden die beiden Verwechslungen (*Artemisia absinthium* und *Artemisia annua*) und jeweils eine Handelsprobe beider Herkünften analog den entsprechenden Monographien von Arnicae flos [99], Cynarae folium [100] und Urticae folium [101] extrahiert, chromatographiert und mit Naturstoff-/ Macrogolreagenz derivatisiert. Chlorogensäure ergab mit dem Fließmittelsystem entsprechend Arnicae flos (Abbildung 19 A) und Cynarae folium (Abbildung 19 B) eine blau fluoreszierende Bande bei einem R_F -Wert von ca. 0,5, wobei das Fließmittelsystem bestehend aus Ameisensäure, Essigsäure, H₂O, Ethylacetat (11:11:27:100) schärfere Banden zeigte. Im Gegensatz dazu war die Markersubstanz Chlorogensäure im Chromatogramm (Abbildung 19 C) der Urticae folium Monographie bei einem R_F -Wert von 0,25 sichtbar. Das Fließmittelsystem von Cynarae folium zeigte die beste Trennung von Chlorogensäure zu den restlichen Banden des Fingerprints. Es wurde daher für

Haariges Besenbeifußkraut 80

die DAB Monographie von Artemisiae scopariae herba verwendet. Die Extraktionsmethode wurde jedoch geändert, da mit MeOH 50% intensivere Banden erzielt werden konnten.

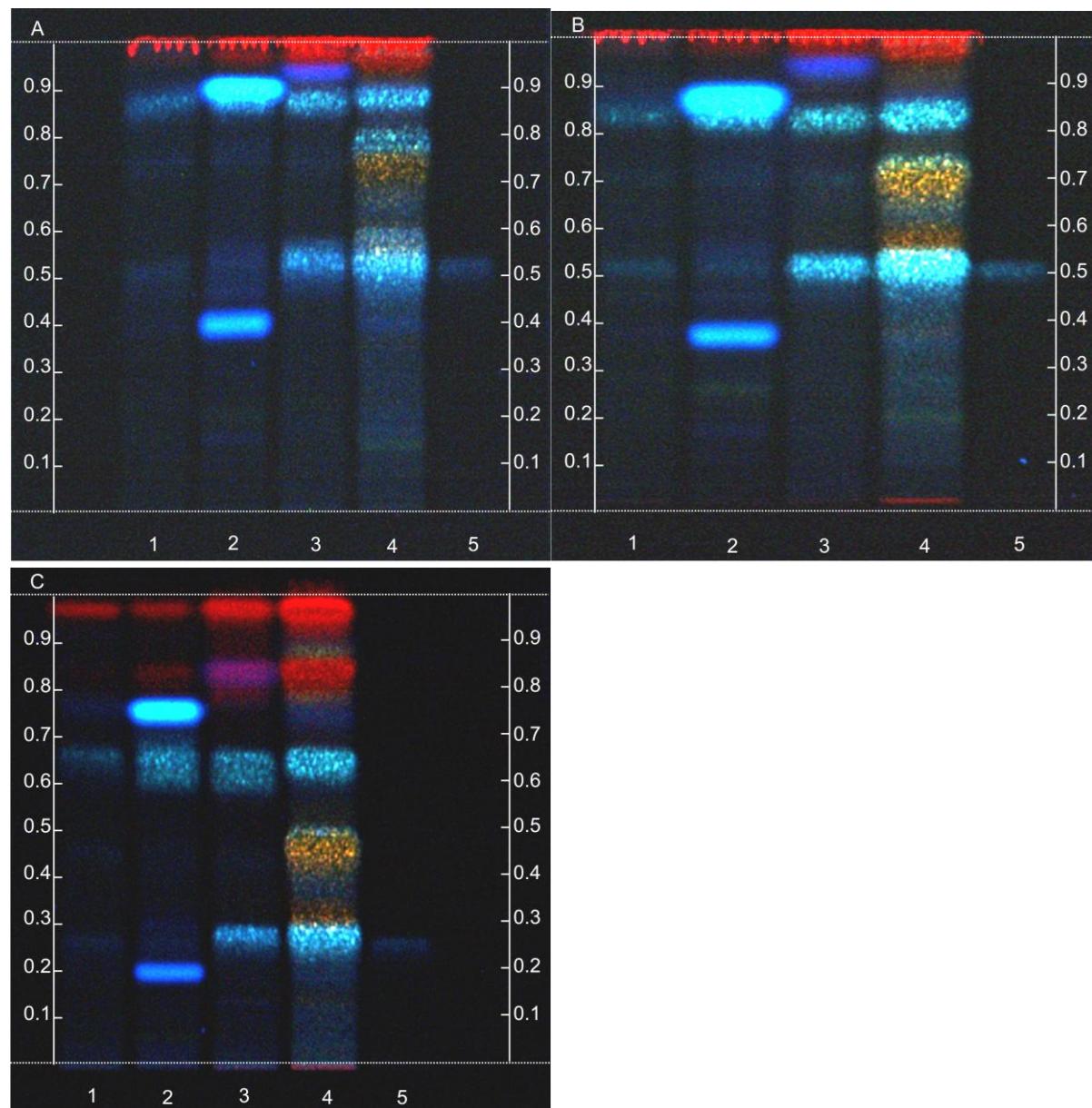


Abbildung 19: Chlorogensäure im Ph. Eur, Bahn 1, 2: Extrakte der Verwechslungen *A. absinthium* und *A. annua*, jeweils 4 µl; Bahn 3: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import 4 µl; Bahn 4: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus deutschem Anbau 4 µl; Bahn 5: Referenzlösung Chlorogensäure 4 µl; FM: A Ameisensäure, Wasser, Ethylmethylketon, Ethylacetat (10:10:30:50), B Ameisensäure, Essigsäure, Wasser, Ethylacetat (11:11:27:100), C Ameisensäure, Wasser, Methanol, Ethylacetat (2,5: 4: 4: 50) Entwicklungsstrecke 8 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/Macrogolreagenz, 366 nm

4.5.3.2 Validierung

Um zu gewährleisten, dass die zur Identifizierung von *Artemisiae scopariae herba* entwickelte Methode (Tabelle 12, Neu entwickelte Methode) reproduzierbare Ergebnisse liefert, wurde sie anhand des Validierungsprotokolls (3.6.10) hinsichtlich Stabilität, Spezifität, Präzision und Robustheit validiert.

4.5.3.2.1 Stabilität der Testlösung während der Chromatographie

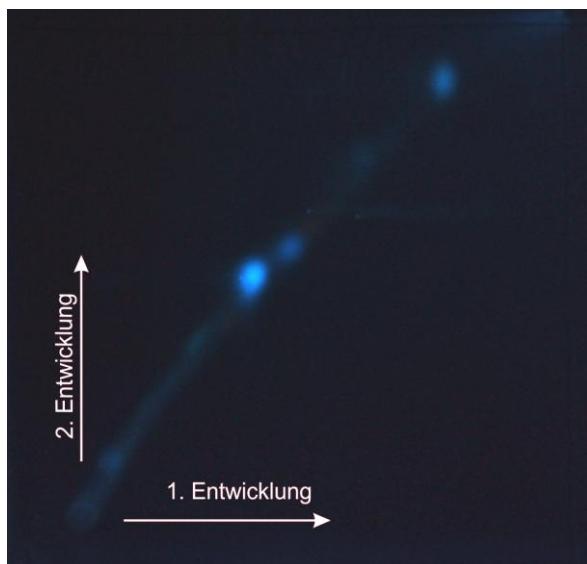


Abbildung 20: 2D-Chromatogramm von *Artemisiae scopariae herba*, 2 µl Testlösung, FM: Ameisensäure, Eisessig, Wasser, Ethylacetat (11:11:27:100), Entwicklungsstrecke 6 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/ Macrogol-Reagenz, 366 nm

Eine authentische Handelsprobe wurde extrahiert und 2 µl der Testlösung punktförmig an dem rechten unteren Plattenende einer 10 x 10 cm Platte (1 cm von jedem Ende) aufgetragen. Die Platte wurde entwickelt und getrocknet. Nach der ersten Entwicklung wurde die Platte um 90° gedreht, nochmals mit frischem Fließmittel entwickelt, danach derivatisiert und dokumentiert. Während der Chromatographie ergaben sich keine Veränderung des Extraktes, da alle Bestandteile auf der Winkelhalbierenden lagen (Abbildung 20). Somit waren die Analyten des Extraktes während der Chromatographie stabil.

4.5.3.2.2 Stabilität der Testlösung in Lösung und auf der Platte

Eine authentische Handelsdroge wurde extrahiert und 4 µl auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Danach wurde die Platte in Alufolie eingewickelt und mit der Testlösung 3 h bei Raumtemperatur gelagert. Dieselbe Droge wurde nochmals extrahiert und ebenfalls auf dieselbe Platte aufgetragen. Nach der Chromatographie und der Derivatisierung zeigten sich keine Veränderungen in Lage und Intensität des Bandenmusters (Abbildung 21).

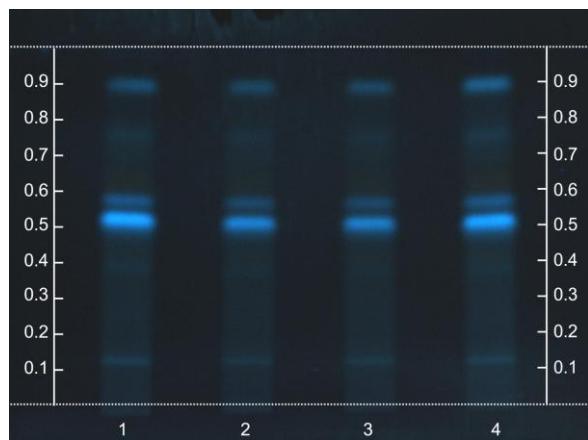


Abbildung 21: Stabilität auf der Platte und in Lösung, Bahn 1: Artemisiae scopariae herba Extrakt 3 h auf der Platte, Bahn 2, 3: frischer Artemisiae scopariae herba Extrakt, Bahn 4: Artemisiae scopariae herba Extrakt 3 h in Lösung jeweils 4 µl, FM: Ameisensäure, Eisessig, Wasser, Ethylacetat (11:11:27:100), Entwicklungsstrecke 6 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/Macrogol-Reagenz, 366 nm

4.5.3.2.3 Stabilität der Derivatisierung

Um die Stabilität der Derivatisierung zu beurteilen, wurde die HPTLC direkt nach der Derivatisierung, nach 5, 10, 15, 30 und 60 min dokumentiert. Die Ergebnisse waren stabil, da sich auch nach 60 min (Abbildung 22) keine Unterschiede bezüglich der Lage und Intensität der Banden zeigten.

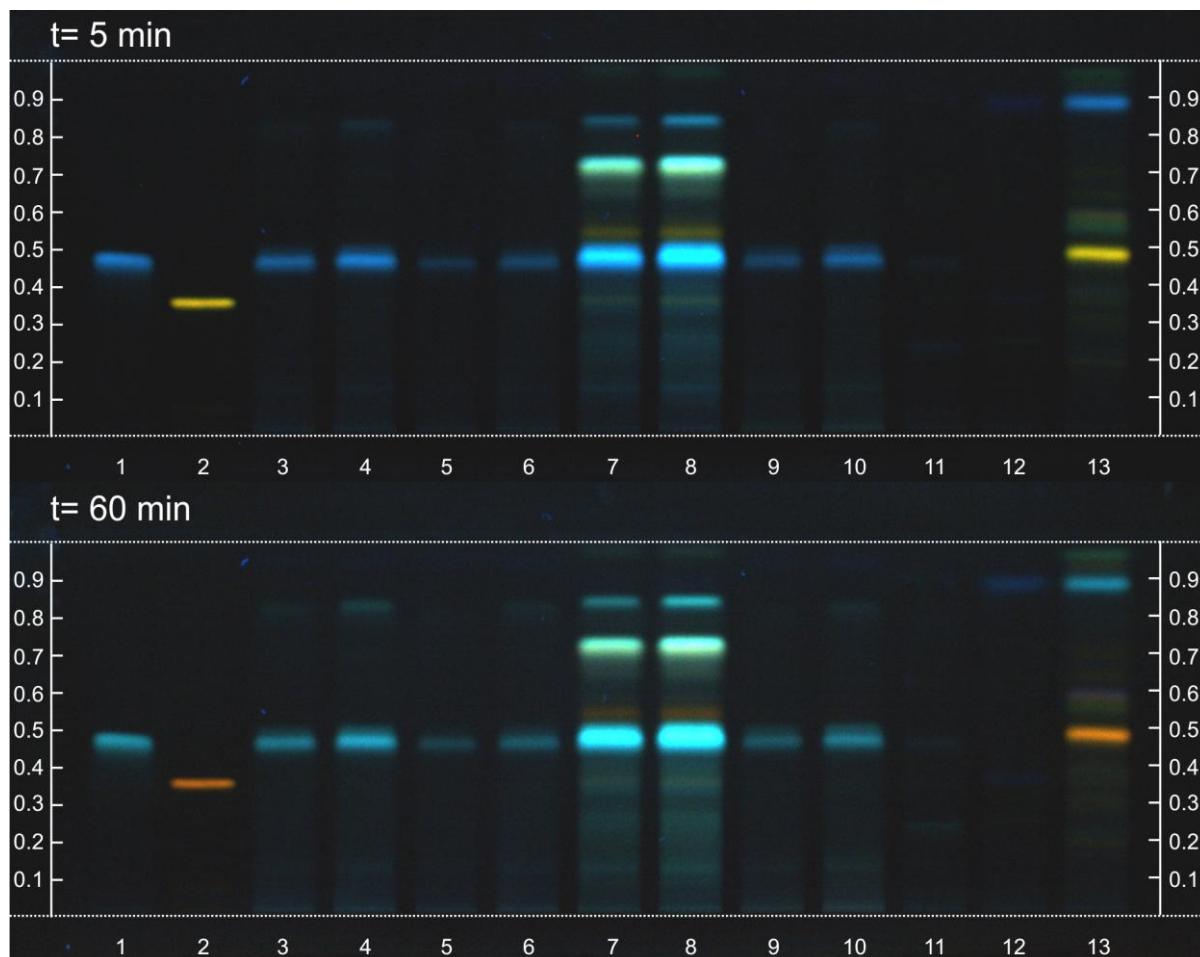


Abbildung 22: Stabilität der Derivatisierung nach $t = 5$ und 60 min ; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen Chlorogensäure, Rutin jeweils $4\text{ }\mu\text{l}$; Bahn 3, 5, 9: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils $3\text{ }\mu\text{l}$; Bahn 4, 6, 10: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils $4\text{ }\mu\text{l}$; Bahn 7, 8: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus deutscher Herkunft 3 bzw $4\text{ }\mu\text{l}$; Bahn 11, 12, 13: Extrakte der Verwechslungen/Verfälschungen *A. absinthium*, *A. annua* und *Origanum vulgare*, jeweils $4\text{ }\mu\text{l}$, FM: Ameisensäure, Eisessig, Wasser, Ethylacetat (11:11:27:100), Entwicklungsstrecke 6 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/ Macrogol-Reagenz, 366 nm

4.5.3.2.4 Spezifität

4.5.3.2.4.1 Identifizierung von *Artemisiae scopariae herba* Proben durch Vergleich mit authentischen Drogenproben und Referenzsubstanzen

Mehrere Muster von *Artemisiae scopariae herba* aus deutschen und chinesischen Herkünften wurden extrahiert und mit den Referenzlösungen chromatographiert. Die entwickelte Methode ergab für alle Proben einen ähnlichen Fingerprint nach Derivatisierung mit Naturstoffreagenz mit guter Auflösung zwischen Chlorogensäure bei $R_F = 0,46$ und den restlichen Substanzen der Testlösung. Lediglich die Proben deutscher Herkunft zeigten eine zusätzliche blau fluoreszierende Bande (Abbildung 23) bei $R_F = 0,72$.

Haariges Besenbeifußkraut 84

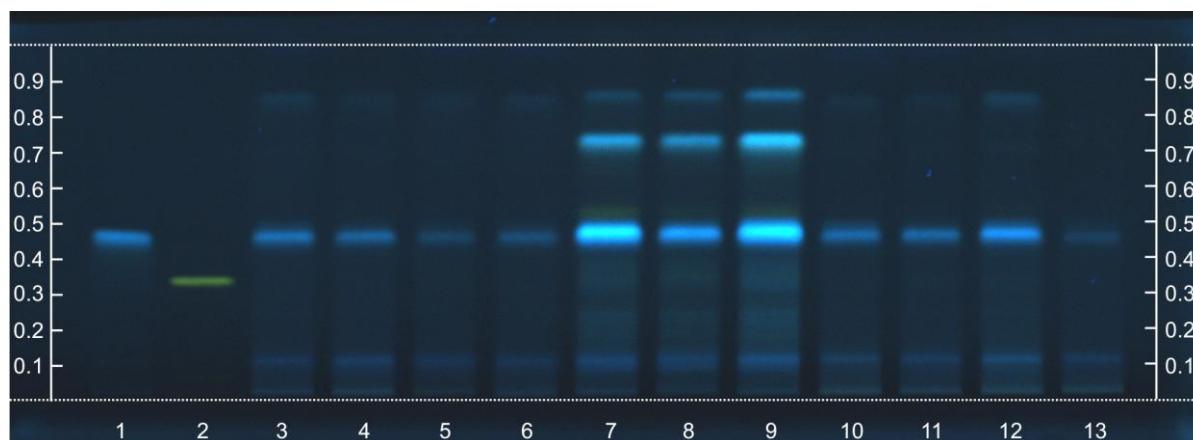


Abbildung 23: Spezifität; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen Chlorogensäure, Rutin jeweils 4 µl; Bahn 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 4 µl; Bahn 7, 8, 9: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus deutscher Herkunft, jeweils 4 µl; FM: Ameisensäure, Eisessig, Wasser, Ethylacetat (11:11:27:100), Entwicklungsstrecke 6 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/ Macrogol-Reagenz, 366 nm

4.5.3.2.4.2 Detektion von Verfälschungen

Die in der Materia Medica für Artemisiae scopariae herba [14] gelistete Verwechslung *Origanum vulgare* sowie die im europäischen Handel vorkommenden *Artemisia*-Arten *Artemisia absinthium* und *Artemisia annua* (mögliche Verfälschung) wurden analog zu den Artemisiae scopariae Proben extrahiert und chromatographiert. Die Methode war spezifisch für Artemisiae scopariae herba, da weder die Verwechslung noch die Verfälschungen eine blau fluoreszierende Bande bei UV 366 nm nach Derivatisierung mit Naturstoff-/ Macrogolreagenz auf Höhe der Chlorogensäure aufwiesen (Abbildung 24). Darüber hinaus war bei der Verwechslung der Droge eine stark gelb leuchtende Bande bei $R_F = 0,46$ sichtbar, die im Fingerprint des Haarigen Besenbeifußkrautes nicht vorhanden war. *Origanum vulgare*, chinesisch Niu Zhi, kann auch als Tu Yin Chen bezeichnet [102] werden und besitzt das größte Verwechslungspotential. Es kann mit der entwickelten Methode eindeutig von Artemisiae scopariae herba unterschieden werden.

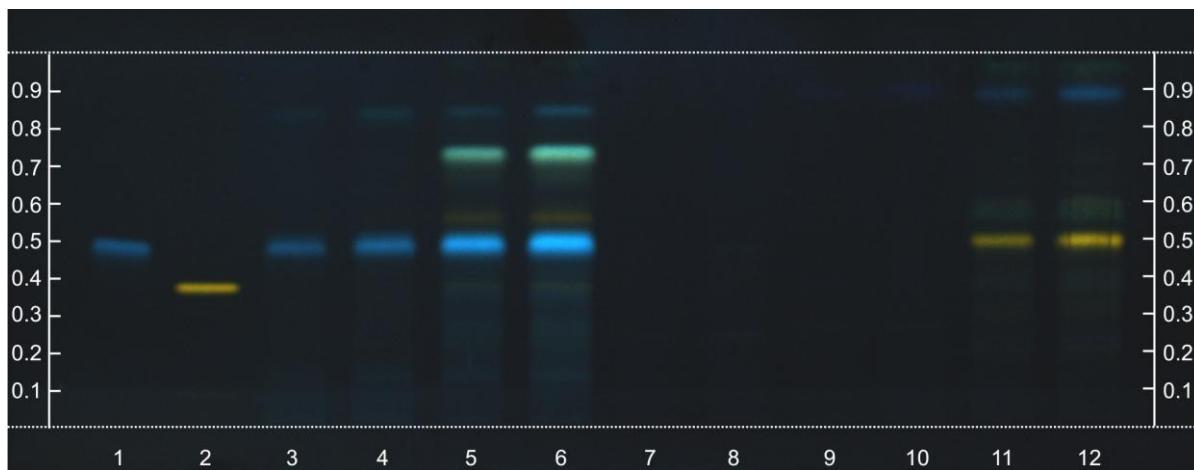


Abbildung 24: Detektion von Verfälschungen; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen Chlorogensäure, Rutin jeweils 4 µl; Bahn 3, 4: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 3 bzw. 4 µl; Bahn 5, 6: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus deutscher Herkunft, jeweils 3 bzw. 4 µl; Bahn 7, 8, 9, 10, 11, 12: Extrakte der Verwechslungen/Verfälschungen *A. absinthium*, *A. annua* und *Origanum vulgare*, jeweils 3 bzw. 4 µl; FM: Ameisensäure, Eisessig, Wasser, Ethylacetat (11:11:27:100), Entwicklungsstrecke 6 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/ Macrogol-Reagenz, 366 nm

4.5.3.2.5 Wiederholpräzision

Die Proben aus den zwei verschiedenen Herkünften wurden dreimal eingewogen, extrahiert und mit jeweils frischem Fließmittel chromatographiert. Nach der Derivatisierung und Dokumentation bei 366 nm (Abbildung 25) wurde der mittlere R_F -Wert des analytischen Markers Chlorogensäure ermittelt. Die neu entwickelte Methode zeigte dreimal an einem Tag (Tabelle 14) homogene Werte, die um weniger als 0,03 R_F -Einheiten schwankten. Die Lage und Intensität aller Banden im Fingerprint waren identisch. Der Test auf Wiederholpräzision wurde akzeptiert.

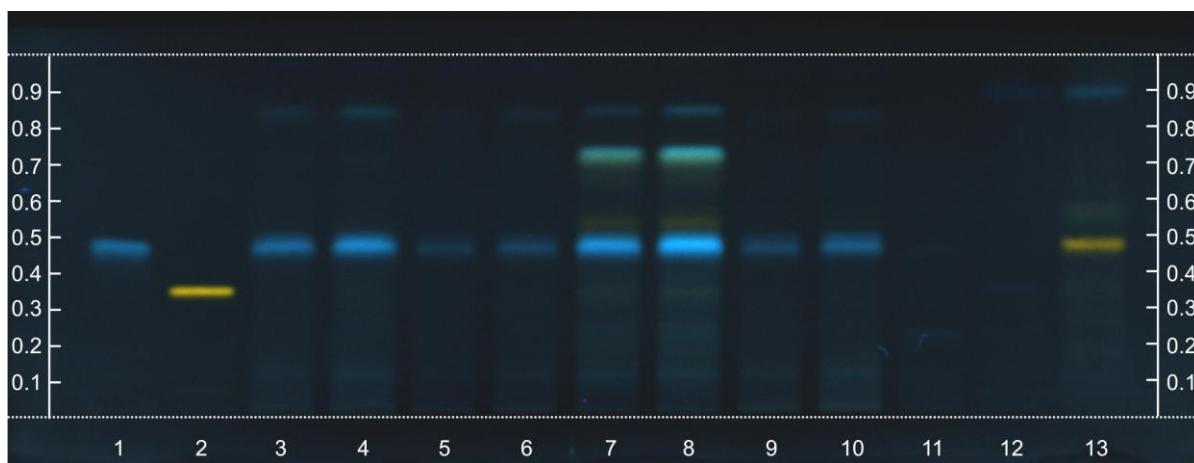


Abbildung 25: Wiederholpräzision Platte Artemisia_20110603_02 ; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen Chlorogensäure, Rutin jeweils 4 µl; Bahn 3, 5, 9: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 3 µl; Bahn 4, 6, 10: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 4 µl; Bahn 7, 8: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus deutscher Herkunft 3 bzw 4 µl; Bahn 11, 12, 13: Extrakte der Verwechslungen/Verfälschungen *A. absinthium*, *A. annua* und *Origanum vulgare*, jeweils 4 µl, FM: Ameisensäure, Eisessig, Wasser, Ethylacetat (11:11:27:100), Entwicklungsstrecke 6 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/ Macrogol-Reagenz, 366 nm

Haariges Besenbeifußkraut 86

Tabelle 14: Ergebnisse der Wiederholpräzision der Prüfung auf Identität von Artemisiae scopariae herba durch HPTLC-Fingerprint

R_F	Artemisia_20110603_01	Artemisia_20110603_02	Artemisia_20110603_03	ΔR_F
Chlorogensäure	0,46	0,45	0,44	0,02
Rutin	0,35	0,33	0,34	0,02

4.5.3.2.6 Laborpräzision

Bei der Überprüfung der Laborpräzision werden die verschiedenen Proben an drei aufeinanderfolgen Tagen unabhängig voneinander eingewogen, extrahiert und mit frischem Fließmittel entwickelt. Der Test auf Laborpräzision wurde akzeptiert, da sich nach Derivatisierung bei 366 nm keine Änderung der Intensität und Lage der Chlorogensäurebande (Abbildung 26) ergab, die mehr als 0,05 R_F -Einheiten (Tabelle 15) betrug.

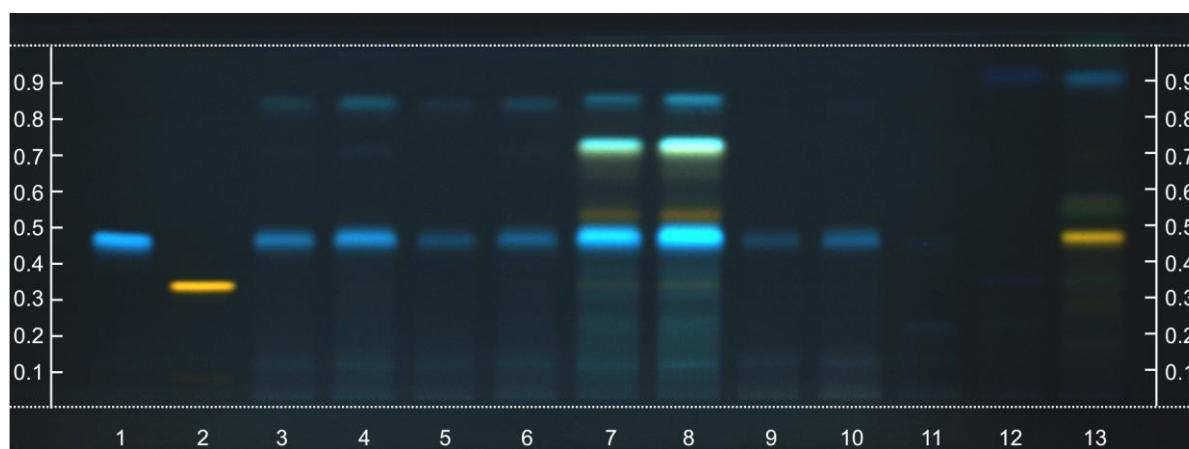


Abbildung 26: Laborpräzision Platte Artemisia_20110607_01 ; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen Chlorogensäure, Rutin jeweils 4 µl; Bahn 3, 5, 9: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 3 µl; Bahn 4, 6, 10: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 4 µl; Bahn 7, 8: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus deutscher Herkunft 3 bzw 4µl; Bahn 11, 12, 13: Extrakte der Verwechslungen/Verfälschungen *A. absinthium*, *A. annua* und *Origanum vulgare*, jeweils 4 µl, FM: Ameisensäure, Eisessig, Wasser, Ethylacetat (11:11:27:100), Entwicklungsstrecke 6 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/ Macrogol-Reagenz, 366 nm

Tabelle 15: Ergebnisse der Laborpräzision der Prüfung auf Identität von Artemisiae scopariae herba durch HPTLC-Fingerprint

R_F	Artemisia_20110603_01	Artemisia_20110606_01	Artemisia_20110607_01	ΔR_F
Chlorogensäure	0,46	0,47	0,46	0,01
Rutin	0,35	0,35	0,33	0,02

4.5.3.2.7 Robustheit

4.5.3.2.7.1 Verschiedener Kammer-/Platten-Typ

Um die Robustheit der Methode zu testen wurde die HPTLC-Platte durch eine DC Platte ersetzt, die in einer Flachbodenkammer analog zur Monographie von *Cynarae folium* [100] bis zu einer Laufstrecke von 13 cm entwickelt (Abbildung 27) und mit Naturstoffreagenz derivatisiert. Die Lage der Banden und die Farbintensität wurden mit der ersten Platte der Wiederholpräzision (*Artemisia_20110603_01*) verglichen (Tabelle 16). Die R_F -Werte der analytischen Marker Chlorogensäure und Rutin zeigten eine Abweichung von weniger als 0,06 R_F -Einheiten. Die Methode kann sowohl mit HPTLC als auch mit DC-Platten in verschiedenen Kammern durchgeführt werden.

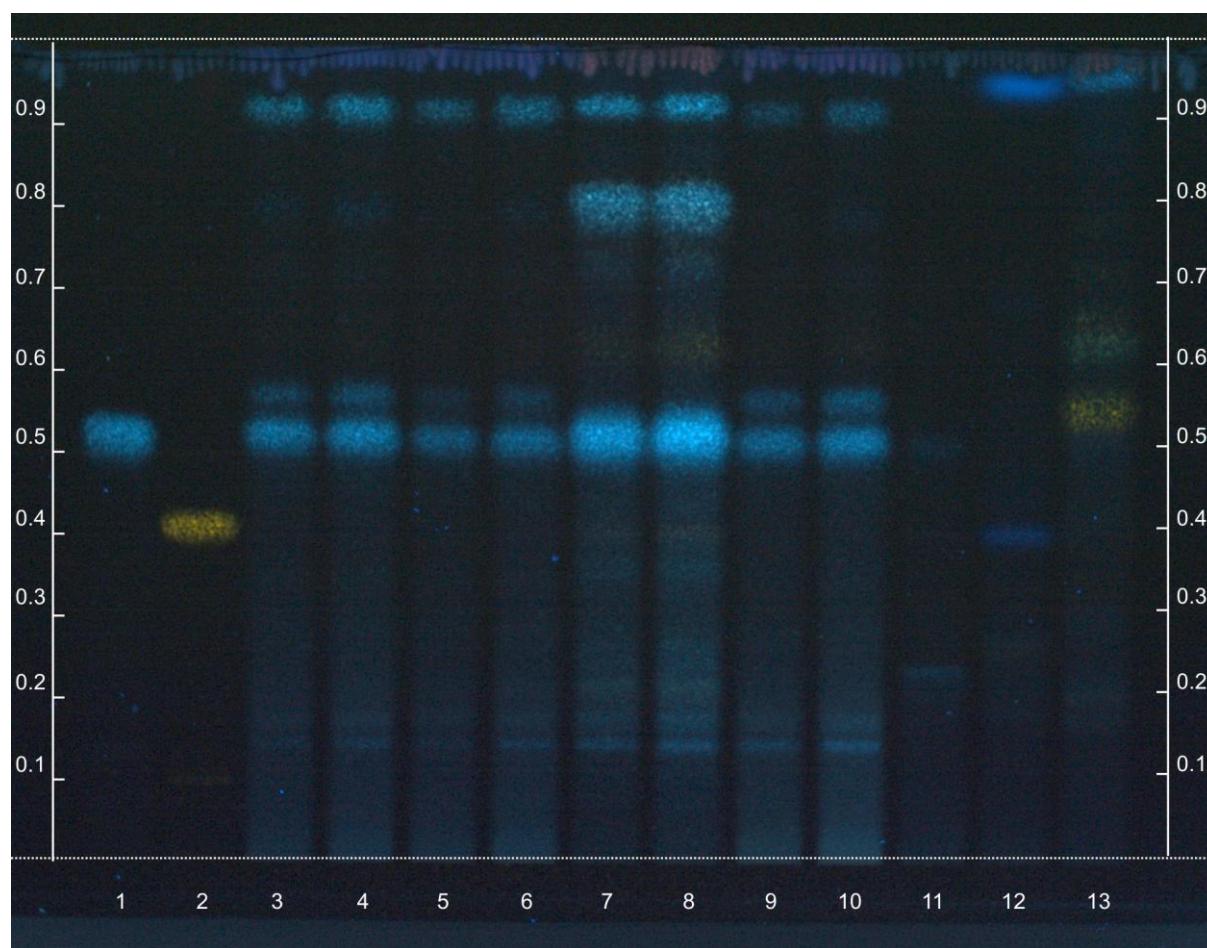


Abbildung 27: Robustheit Kammer/DC-Platte; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen Chlorogensäure, Rutin jeweils 8 µl; Bahn 3, 5, 9: *Artemisiae scopariae herba* Extrakt aus chinesischem Import jeweils 7 µl; Bahn 4, 6, 10: *Artemisiae scopariae herba* Extrakt aus chinesischem Import jeweils 8 µl; Bahn 7, 8: *Artemisiae scopariae herba* Extrakt aus deutscher Herkunft 7 bzw 8 µl; Bahn 11, 12, 13: Extrakte der Verwechslungen/Verfälschungen *A. absinthium*, *A. annua* und *Origanum vulgare*, jeweils 8 µl, FM: Ameisensäure, Eisessig, Wasser, Ethylacetat (11:11:27:100), Entwicklungsstrecke 13 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/ Macrogol-Reagenz, 366 nm

Tabelle 16: Ergebnisse der Robustheitsprüfung mit verschiedenem Kammer- und Plattentyp

R_F	Flachbodenkammer DC-Platte	ADC 2 HPTLC-Platte	ΔR_F
Chlorogensäure	0,51	0,46	0,05
Rutin	0,40	0,35	0,05

4.5.3.2.7.2 Verschiedene Entwicklungsdistanz

Die Entwicklungsdistanz wurde auf 5 cm verringert und auf 7 cm erhöht, um mögliche Fehlerquellen bei der Durchführung zu evaluieren. Beide Chromatogramme (Abbildung 28) wurden mit der ersten Platte der Wiederholpräzision (Artemisia_20110603_01) bezüglich Lage und Intensität des Fingerprints verglichen (Tabelle 17). Die R_F -Werte der analytischen Marker Chlorogensäure und Rutin zeigten eine Abweichung von weniger als 0,06 R_F -Einheiten.

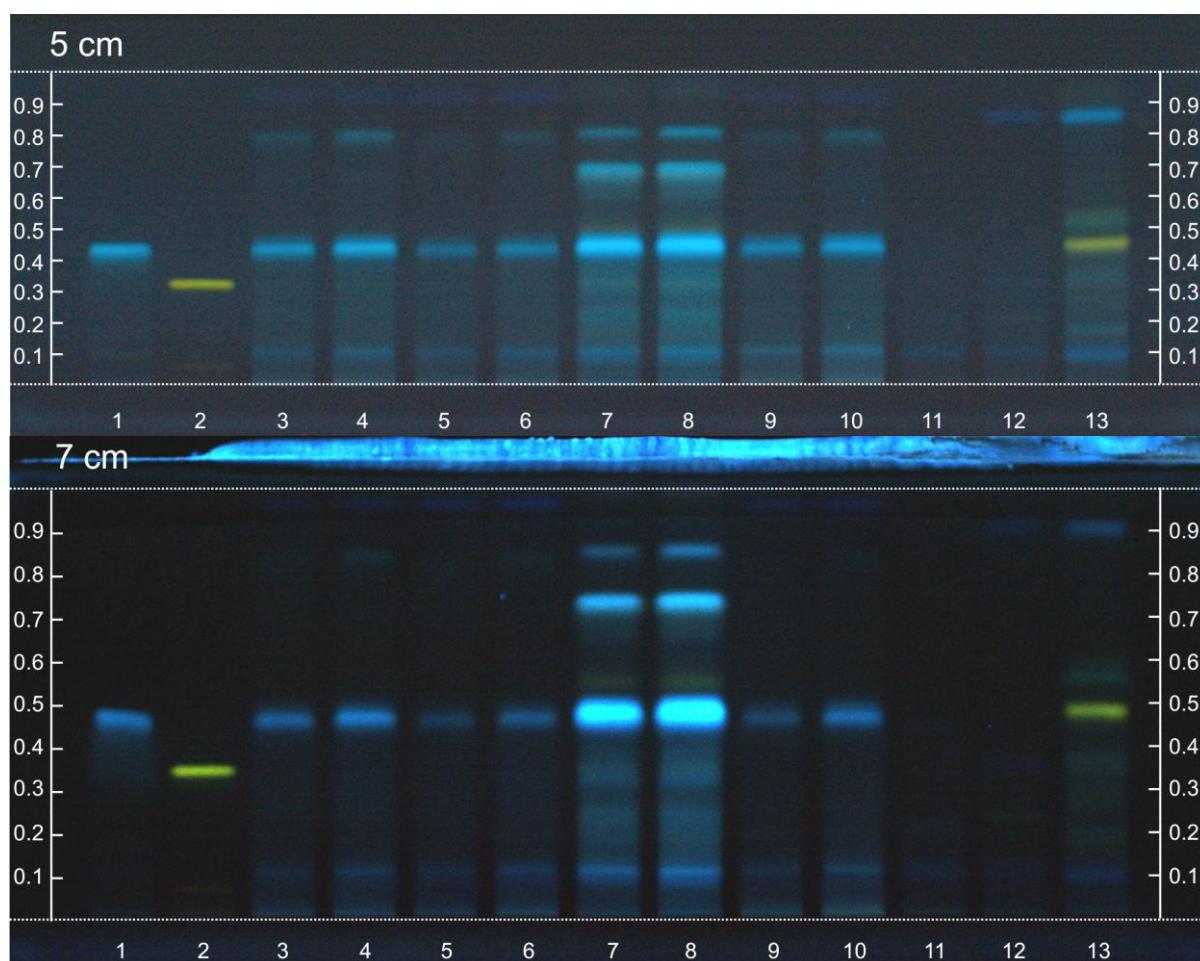


Abbildung 28: Robustheit Entwicklungsdistanz; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen Chlorogensäure, Rutin jeweils 4 µl; Bahn 3, 9: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 3 µl; Bahn 4, 6, 10: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 4 µl; Bahn 7, 8: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus deutscher Herkunft 3 bzw 4 µl; Bahn 11, 12, 13: Extrakte der Verwechslungen/ Verfälschungen *A. absinthium*, *A. annua* und *Origanum vulgare*, jeweils 4 µl, FM: Ameisensäure, Eisessig, Wasser, Ethylacetat (11:11:27:100), Entwicklungsstrecke 5 bzw. 7 cm, Derivatisiert mit Naturstoff-/ Macrogol-Reagenz, 366 nm

Tabelle 17: Ergebnisse der Robustheitsuntersuchung mit verschiedenen Entwicklungsdistanzen

R_F	50 mm	60 mm	70 mm	ΔR_F
Chlorogensäure	0,45	0,46	0,47	0,02
Rutin	0,33	0,35	0,34	0,02

4.5.4 Chromatographische Unterscheidung (Fingerprint) der verschiedenen Erntezeitpunkte von *Artemisiae scopariae herba*

In der Monographie von *Artemisiae scopariae herba* des ChP 2010 [78] werden zwei Erntezeitpunkte der Droge unterschieden. „Mianyinchen“ beschreibt die im Frühjahr geerntete Droge, bei der Chlorogensäure als analytischer Marker verwendet wird. Im Gegensatz dazu dient Scoparon als Marker für die im Herbst gesammelten blütenreiche Krautdroge „Huayinchen oder Yinchenhao“. Der Gehalt an Scoparon kann demnach als Unterscheidungsmerkmal für die verschiedenen Erntezeitpunkte verwendet werden. Wie Abbildung 18 zeigt, handelte es sich bei dem im Handel erhältlichen Pflanzenmaterial wahrscheinlich um die Frühjahrsdroge, da kein Scoparon im Fingerprint erkennbar war. Dies stimmt mit den Zusatzinformation in Materia Medica [98] „In the third month they are capillaris seedling, in the fourth month, an herb. If cut in the fifth month, they are only fit for firework“ überein, welche auf den erhöhten Gebrauch der Frühjahrsdroge hinweist. Um das Vorkommen von Scoparon in der Herbstdroge zu analysieren, wurden von der bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft *Artemisia scoparia* Pflanzen verschiedener genetischer Herkünfte (Tabelle 5) über einen längeren Zeitraum (1.-3. Schnitt bei ca. 60-80 cm Pflanzenhöhe) kultiviert und geerntet. Auffallend war, dass die Probe LfL 125 fast nur aus Blütenmaterial und nicht hauptsächlich aus Blatt und Stängelfragmenten bestand. Das Probenmaterial wurde nach Methode Tabelle 12, Huayinchen ChP 2010 dünnenschichtchromatographisch auf die Markersubstanz Scoparon analysiert (Abbildung 29). Lediglich die Probe LfL 125 (Bahn 8) zeigte eine blau fluoreszierende Scoparon-Bande bei $R_F = 0,21$, was eine höhere Konzentration an Scoparon in der blütenreichen Herbstdroge bestätigte. Die Bestimmung des Scoparongehaltes schien jedoch für die Erstellung einer Monographie von *Artemisiae scopariae herba* für das DAB nicht sinnvoll, da das im Handel befindliche Drogenmaterial hauptsächlich aus im Frühjahr geernteter Droge bestand.

Haariges Besenbeifußkraut 90

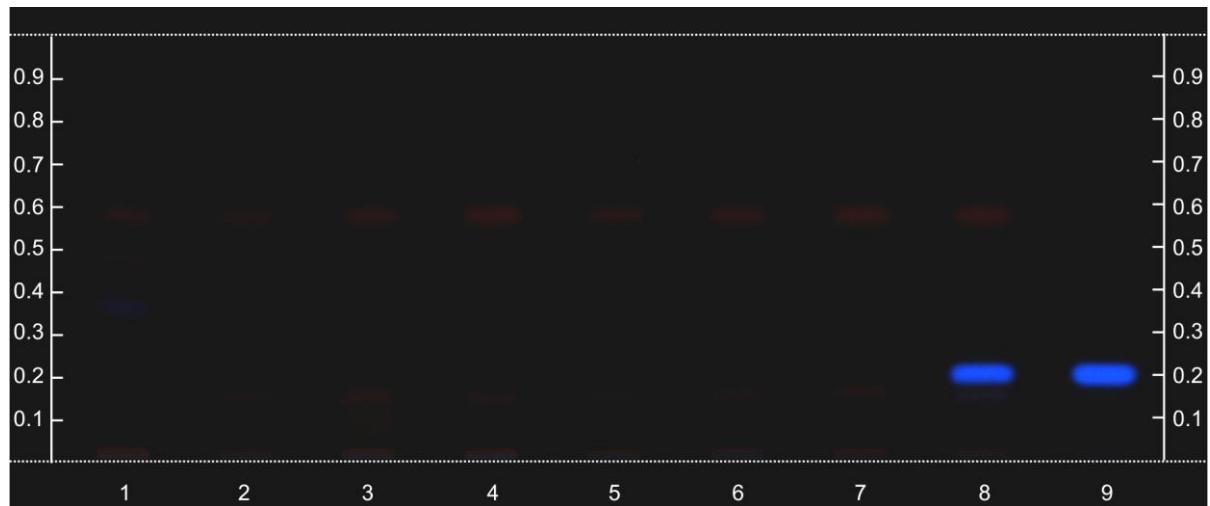


Abbildung 29: Chromatographische Unterscheidung verschiedener Erntezeitpunkte; Bahn 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: Artemisiae scopariae herba Extrakt aus deutschem Anbau LfL 30, 31, 32, 122, 123, 124, 125, jeweils 5 µl; Bahn 9: Referenzsubstanz Scoparon 5 µm; FM: Petrolether (60-90 °C), Ethylacetat, Aceton (6:3:0,5), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

4.6 Reinheitsuntersuchungen

4.6.1 Trocknungsverlust

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes erfolgte entsprechend der Allgemeinen Methoden des Ph Eur. 7.0/2.2.32 [55]. Dazu wurde die pulverisierte Droge (500) 2 h im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet und danach gewogen.

Tabelle 18: Ergebnisse der Trocknungsverluste von Artemisiae scopariae herba Proben

	Arobemed		China-Medica		Herbasinica		LfL 2006	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	61,4981	1,0083	63,5544	1,0055	54,0090	1,0021	31,3282	1,0051
2. Einwaage	62,6320	1,0094	56,0987	1,0057	61,5990	0,9999	63,4047	1,0020
3. Einwaage	56,0127	1,0067	61,5982	1,0033	54,6285	1,0013	63,4023	1,0001
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	62,4050	0,9069	64,4593	0,9049	54,9235	0,9145	32,2163	0,8881
2. Einwaage	63,5460	0,9140	57,0037	0,9050	62,5114	0,9124	64,2899	0,8852
3. Einwaage	56,9249	0,9122	62,5052	0,9070	55,5429	0,9144	64,2899	0,8876
1. Einwaage	Trock.verlust	10,06	Trock.verlust	10,00	Trock.verlust	8,74	Trock.verlust	11,64
2. Einwaage		9,45		10,01		8,75		11,66
3. Einwaage		9,39		9,60		8,68		11,25
	Mittelwert	9,63	Mittelwert	9,87	Mittelwert	8,72	Mittelwert	11,52
	%-STABW	3,84	%-STABW	2,40	%-STABW	0,45	%-STABW	2,01

	LfL 11		LfL 12		LfL 13		Lian	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	55,8046	1,0054	34,2996	1,0048	60,9208	1,0089	57,6103	1,0078
2. Einwaage	34,3004	1,0036	31,3300	1,0043	54,6289	1,0037	60,9208	1,0056
3. Einwaage	56,1614	1,0041	34,3003	1,0040	31,3279	1,0076	56,0972	1,0001
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	56,7128	0,9082	35,2002	0,9006	61,8285	0,9077	58,5189	0,9086
2. Einwaage	35,2047	0,9043	32,2340	0,9040	55,5327	0,9038	61,8303	0,9095
3. Einwaage	57,0691	0,9077	35,2022	0,9019	32,2373	0,9094	57,0070	0,9098
1. Einwaage	Trock.verlust	9,67	Trock.verlust	10,37	Trock.verlust	10,03	Trock.verlust	9,84
2. Einwaage		9,89		9,99		9,95		9,56
3. Einwaage		9,60		10,17		9,75		9,03
	Mittelwert	9,72	Mittelwert	10,18	Mittelwert	9,91	Mittelwert	9,48
	%-STABW	1,58	%-STABW	1,88	%-STABW	1,49	%-STABW	4,36

	Pharmachin		Phytax		Yong	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	56,1650	1,0060	56,0967	1,0026	63,4049	1,0047
2. Einwaage	56,0130	1,0039	57,6043	1,0054	56,1648	1,0034
3. Einwaage	57,6043	1,0075	60,9225	1,0072	62,6327	0,9994
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	57,0871	0,9221	57,0162	0,9195	64,3131	0,9082
2. Einwaage	56,9318	0,9188	58,5260	0,9217	57,0725	0,9077
3. Einwaage	58,5286	0,9243	61,8436	0,9211	63,5385	0,9058
1. Einwaage	Trock.verlust	8,34	Trock.verlust	8,29	Trock.verlust	9,60
2. Einwaage		8,48		8,33		9,54
3. Einwaage		8,26		8,55		9,37
	Mittelwert	8,36	Mittelwert	8,39	Mittelwert	9,50
	%-STABW	1,32	%-STABW	1,68	%-STABW	1,30

Die Ergebnisse des Trocknungsverlustes der einzelnen Drogenmuster verschiedener Anbieter zeigten keine größeren Abweichungen (Tabelle 18). Der prozentuale Massenverlust betrug 8,36-10,18%, wobei die 2006 geerntete Droge (LfL 2006), wegen ihres Alters nicht in die Berechnung einbezogen wurde.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wurde für die zu erstellende Monographie *Artemisiae scopariae herba* DAB ein maximaler Trocknungsverlust von 11% vorgeschlagen.

4.6.2 Asche

Die Bestimmung der Asche erfolgte entsprechend der Allgemeinen Methoden aus Ph. Eur 7.0/2.4.16 [56]. Da das Drogenmaterial wegen der Behaarung sehr voluminös war, wurden nur 0,5 g anstatt 1,0 g der pulverisierten Droge (500) in einen Quarziegel eingewogen.

Tabelle 19: Ergebnisse der Aschebestimmung von Artemisiae scopariae herba Proben

	Arobemed		China-Medica		Herbasinica		LfL 2006	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	28,8427	0,5045	21,5455	0,5063	21,8615	0,5031	22,6949	0,5064
2. Einwaage	21,5477	0,5014	25,3640	0,5034	20,9459	0,5000	25,5884	0,5011
3. Einwaage	20,9583	0,5049	21,0800	0,5046	28,8588	0,5017	21,8809	0,5096
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	28,9030	0,0603	21,5815	0,0360	21,9314	0,0699	22,7387	0,0438
2. Einwaage	21,6077	0,0600	25,4005	0,0365	21,0125	0,0666	25,6316	0,0432
3. Einwaage	21,0190	0,0607	21,1164	0,0364	28,9281	0,0693	21,9265	0,0456
1. Einwaage	%-Asche	11,95	%-Asche	7,11	%-Asche	13,89	%-Asche	8,65
2. Einwaage		11,97		7,25		13,32		8,62
3. Einwaage		12,02		7,21		13,81		8,95
	Mittelwert	11,98	Mittelwert	7,19	Mittelwert	13,68	Mittelwert	8,74
	%-STABW	0,31	%-STABW	1,01	%-STABW	2,27	%-STABW	2,07

	LfL 11		LfL 12		LfL 13		Lian	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	19,6779	0,5015	21,2133	0,5064	25,3634	0,5053	21,3787	0,5088
2. Einwaage	21,5946	0,5034	21,3775	0,5021	21,8724	0,5033	21,0693	0,5014
3. Einwaage	25,5967	0,5028	22,7106	0,4965	21,3876	0,5013	21,6011	0,5020
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	19,7131	0,0352	21,2499	0,0366	25,3942	0,0308	21,4391	0,0604
2. Einwaage	21,6311	0,0365	21,4146	0,0371	21,9030	0,0306	21,1288	0,0595
3. Einwaage	25,6337	0,0370	22,7448	0,0342	21,4185	0,0309	21,6605	0,0594
1. Einwaage	%-Asche	7,02	%-Asche	7,23	%-Asche	6,10	%-Asche	11,87
2. Einwaage		7,25		7,39		6,08		11,87
3. Einwaage		7,36		6,89		6,16		11,83
	Mittelwert	7,21	Mittelwert	7,17	Mittelwert	6,11	Mittelwert	11,86
	%-STABW	2,41	%-STABW	3,57	%-STABW	0,73	%-STABW	0,18

	Pharmachin		Phytax		Yong	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	27,8244	0,4999	21,5898	0,5064	20,9366	0,5008
2. Einwaage	28,8511	0,4961	22,7007	0,5062	22,0789	0,5099
3. Einwaage	21,5562	0,5072	22,0863	0,5001	25,3728	0,4999
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	27,9115	0,0871	21,6420	0,0522	20,9889	0,0523
2. Einwaage	28,9364	0,0853	22,7525	0,0518	22,1299	0,0510
3. Einwaage	21,6460	0,0898	22,1387	0,0524	25,4259	0,0531
1. Einwaage	%-Asche	17,42	%-Asche	10,31	%-Asche	10,44
2. Einwaage		17,19		10,23		10,00
3. Einwaage		17,71		10,48		10,62
	Mittelwert	17,44	Mittelwert	10,34	Mittelwert	10,36
	%-STABW	1,47	%-STABW	1,21	%-STABW	3,08

Die Ergebnisse der Aschebestimmung der verschiedenen Handelsmuster zeigten deutliche Unterschiede. Der niedrigste Wert von 6,11% wurde bei einer Probe aus deutschem Anbau (LfL 13) ermittelt. Zudem zeigte eine Probe aus chinesischem Import (Pharmachin) einen extrem hohen Aschewert von 17,44%, der den durchschnittlichen Aschegehalt nicht wiederspiegelt. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wurde ein Wert von maximal 14% für das DAB vorgeschlagen.

4.6.3 Salzsäureunlösliche Asche

Die Bestimmung der salzsäureunlöslichen Asche erfolgt entsprechend der Allgemeinen Methoden des Ph Eur 7.0/2.8.1 [57].

Tabelle 20:Ergebnisse der salzsäureunlöslichen Aschebestimmungen von Artemisiae scopariae herba Proben

	Arobemed		China-Medica		Herbasinica		LfL 2006	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	20,4199	0,5045	29,8080	0,5063	27,6402	0,5031	20,3148	0,5064
2. Einwaage	20,4338	0,5014	21,3388	0,5034	29,1330	0,5000	20,6593	0,5011
3. Einwaage	19,1635	0,5049	29,8073	0,5046	20,5011	0,5017	20,6591	0,5096
Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	
1. Einwaage	20,4299	0,0100	29,8088	0,0008	27,6511	0,0109	20,3156	0,0008
2. Einwaage	20,4421	0,0083	21,3395	0,0007	29,1432	0,0102	20,6598	0,0005
3. Einwaage	19,1728	0,0093	29,8079	0,0006	20,5111	0,0100	20,6597	0,0006
1. Einwaage	%-Asche	1,98	%-Asche	0,16	%-Asche	2,17	%-Asche	0,16
2. Einwaage		1,66		0,14		2,04		0,10
3. Einwaage		1,84		0,12		1,99		0,12
Mittelwert	1,83	Mittelwert	0,14	Mittelwert	2,07	Mittelwert	0,13	
%-STABW	8,98	%-STABW	14,06	%-STABW	4,34	%-STABW	23,81	

	LfL 11		LfL 12		LfL 13		Lian	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	23,9588	0,5015	20,0626	0,5064	21,2824	0,5053	21,2682	0,5088
2. Einwaage	20,3160	0,5034	21,2214	0,5021	20,5010	0,5033	29,8068	0,5014
3. Einwaage	26,4340	0,5028	21,3389	0,4965	29,1332	0,5013	20,6539	0,5020
Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	
1. Einwaage	23,9591	0,0003	20,0635	0,0009	21,2831	0,0007	21,2706	0,0024
2. Einwaage	20,3164	0,0004	21,2221	0,0007	20,5017	0,0007	29,8091	0,0023
3. Einwaage	26,4344	0,0004	21,3395	0,0006	29,1340	0,0008	20,6559	0,0020
1. Einwaage	%-Asche	0,06	%-Asche	0,18	%-Asche	0,14	%-Asche	0,47
2. Einwaage		0,08		0,14		0,14		0,46
3. Einwaage		0,08		0,12		0,16		0,40
Mittelwert	0,07	Mittelwert	0,15	Mittelwert	0,15	Mittelwert	0,44	
%-STABW	15,58	%-STABW	19,87	%-STABW	8,23	%-STABW	8,83	

	Pharmachin		Phytax		Yong	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	20,0332	0,4999	26,2860	0,5064	19,6800	0,5008
2. Einwaage	20,6533	0,4961	21,5306	0,5062	19,1620	0,5099
3. Einwaage	21,5308	0,5072	21,2217	0,5001	20,3158	0,4999
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	20,0683	0,0351	26,2880	0,0020	19,6951	0,0151
2. Einwaage	20,6910	0,0377	21,5322	0,0016	19,1789	0,0169
3. Einwaage	21,5696	0,0388	21,2234	0,0017	20,3355	0,0197
1. Einwaage	%-Asche	7,02	%-Asche	0,39	%-Asche	3,02
2. Einwaage		7,60		0,32		3,31
3. Einwaage		7,65		0,34		3,94
	Mittelwert	7,42	Mittelwert	0,35	Mittelwert	3,42
	%-STABW	4,70	%-STABW	11,55	%-STABW	13,80

Die Proben aus deutschem Anbau zeigten einen deutlich geringeren Ascherückstand. Da die Proben weniger behaart waren, ist davon auszugehen, dass sich weniger Flugsand in der Droge befand und dies den niedrigen salzsäureunlöslichen Ascherückstand von 0,07-0,15% erklärt. Den höchsten Wert von 7,42% wies erneut die Probe der Firma Pharmachin auf. Auffällig ist auch die große prozentuale Standardabweichung von 4,31-23,81%, welche auf die statische Aufladung des Rückstandes nach dem Glühen zurückzuführen ist. Auf Grund der Ergebnisse wurde ein Wert von maximal 5% salzsäureunlöslicher Asche für das DAB vorgeschlagen.

4.7 Gehaltsbestimmung mittels HPLC

4.7.1 Chlorogensäure: Evaluation von Gehaltsbestimmungen nach ChP und Ph. Eur

Zur Gehaltsbestimmung von Chlorogensäure in Artemisiae scopariae herba wurden die Methoden im ChP 2010 für Mianyinchen [78] und Cynarae folium im Ph. Eur 7.3 [100] getestet. Abbildung 30 A zeigt das Chromatogramm, das nach Methode Tabelle 13 (Methode nach ChP 2010) durchgeführt wurde. Da im ChP 2010 keine Angaben zur Flußrate und Säulentemperatur festgelegt sind, wurde eine Flußrate von 1,0 ml/min und 25 °C Säulentemperatur zur Chromatographie verwendet. Die Markersubstanz Chlorogensäure wurde bei $R_t = 6,9$ min eluiert und zeigte einen unsymmetrischen breiten Peak, der für die Quantifizierung ungeeignet war. Die Methode des Ph. Eur 7.3 ergab hingegen einen scharfen symmetrischen Peak bei $R_t = 9,3$ min (Abbildung 30 B) sowie eine gute Auflösung zwischen Chlorogensäure und dem darauffolgendem Peak und wurde zur Gehaltsbestimmung von Chlorogensäure in Artemisiae scopariae herba verwendet.

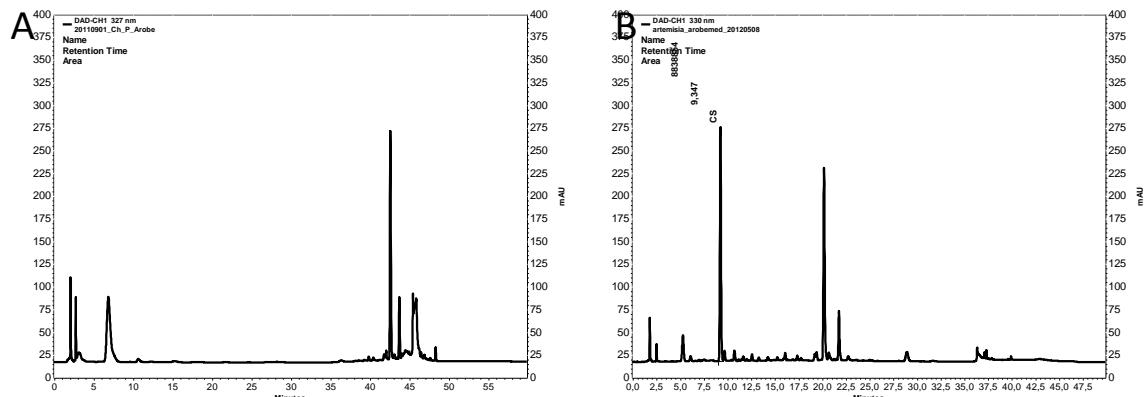


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm eines Artemisiae scopariae herba Extraktes aus chinesischem Import, Chromatogramm A: 10 µl, 327 nm, 1,0 ml/min, 25 °C, A: ACN, H₃PO₄ 0,05% (10:90), B: ACN, H₂O (95:5); 0-30 min: 100% A, 30-40 min 100-80%, 40-45 min 80-0%, 45-50 min 0%, 50-60 min 0-100% A; Chromatogramm B: 25 µl, 330 nm, 1,2 ml/min, 40 °C, A: H₃PO₄ 85%, H₂O (0,5:99,5), B: H₃PO₄ 85%, ACN (0,5:99,5); 0-1 min: 92% A, 1-20 min 92-75%, 20-33 min 75%, 33-35 min 75-0%, 35-40 min 0% A, 40-50 min 0-92% A

4.7.2 Validierung

Die Methode zur Gehaltsbestimmung Cynarae folium Ph. Eur 7.3 (Tabelle 13, Methode nach Cynarae folium Ph. Eur 7.3) wird hinsichtlich Stabilität, Präzision, Robustheit und Richtigkeit mittels des Validierungsprotokolls (3.6.11) auf die Tauglichkeit zur Bestimmung von Chlorogensäure in Artemisiae scopariae herba untersucht.

4.7.2.1 Stabilität des Extraktes

Der Extrakt aus unterschiedlichen Herkünften von China und Bayern wurde achtmal nacheinander in die HPLC injiziert und chromatographiert. Die erhaltenen Flächen der Markersubstanz Chlorogensäure wurden verglichen und ergaben einen Variationskoeffizienten von unter 5%. Der Extrakt war während der Lagerung von 6 h 40 min stabil.

Tabelle 21: Ergebnisse der Stabilität des Extraktes

Zeit [min]	Droge aus chinesischem Anbau:		Droge aus bayerischem Anbau:	
	Messung	Fläche [mAU]	Messung	Fläche [mAU]
0-50	1	4402726	1	22226955
50-100	2	4419436	2	22149569
100-150	3	4408455	3	22248769
150-200	4	4402899	4	22162411
200-250	5	4405667	5	22263040
250-300	6	4418101	6	22229458
300-350	7	4414531	7	22238008
350-400	8	4415217	8	22153883
Σ 6h 40	MW	4410879	MW	222090112
	Stabw	67689	Stabw	46020
	V _K	0,15	V _K	0,21

4.7.2.2 Spezifität

Die Methode war für Bestimmung von Chlorogensäure in Artemisiae scopariae herba spezifisch, da der Peak der Markersubstanz in allen Proben vorhanden (Abbildung 31 A) war und eine Auflösung von über 2,00 zum nachfolgenden Peak zeigte (Abbildung 31 B). Des Weiteren bewies die Reinheit des Chlorogensäurepeaks von 1,0, dass keine Substanzen mit ähnlichem Absorptionsmaximum koeluiert wurden.

Haariges Besenbeifußkraut 98

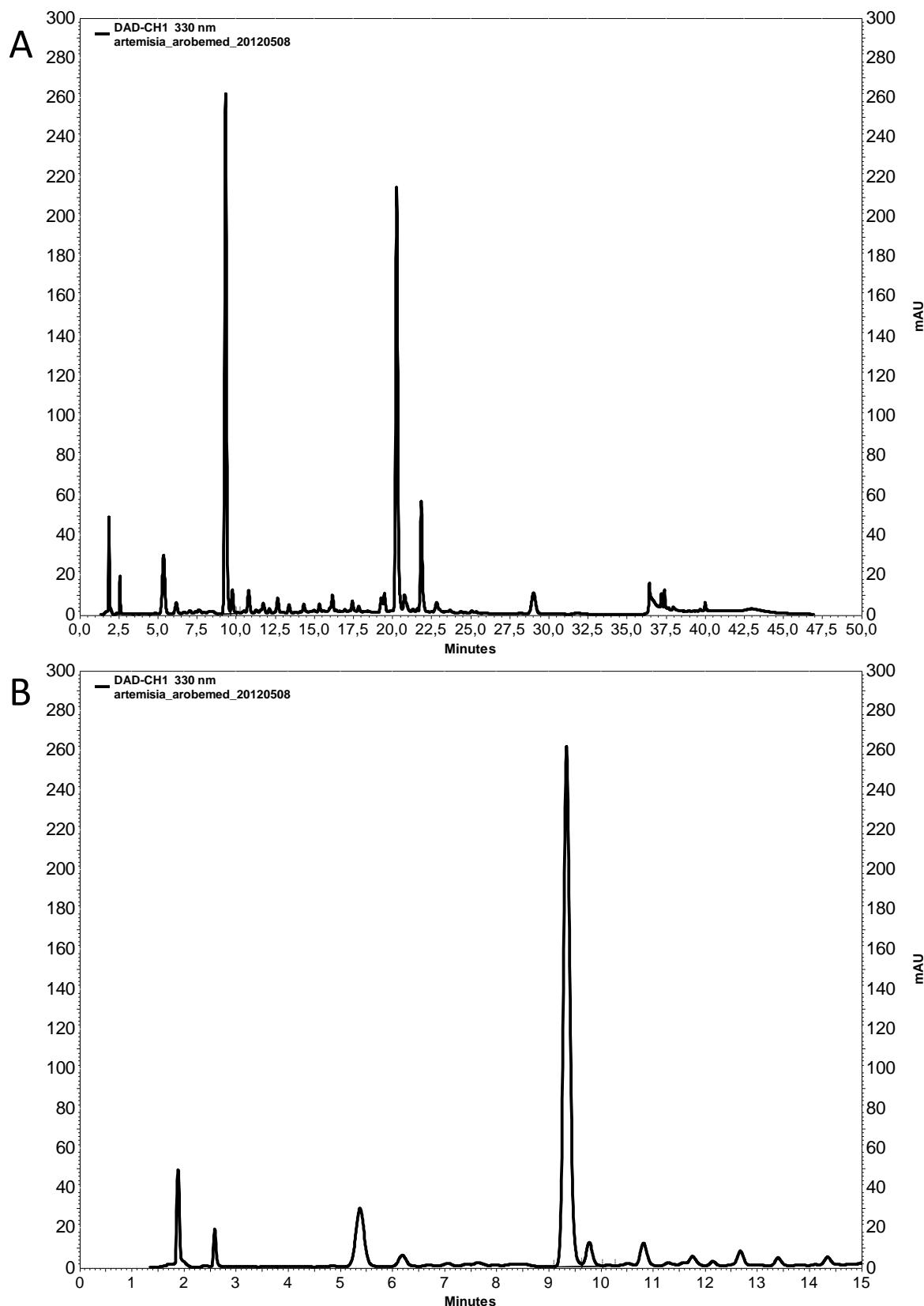


Abbildung 31: HPLC-Spezifität, HPLC-Chromatogramm eines *Artemisiae scopariae* herba Extraktes aus chinesischem Import, 25 µl, 330 nm, 1,2 ml/min, 40°C, A: H₃PO₄ 85%, H₂O (0,5:99,5), B: H₃PO₄ 85%, ACN (0,5:99,5); 0-1 min: 92% A, 1-20 min 92-75%, 20-33 min 75%, 33-35 min 75-0%, 35-40 min 0% A, 40-50 min 0-92% A; Chromatogramm A: Übersicht des Fingerprints; Chromatogramm B: Detail

4.7.2.3 Kalibrierung

4.7.2.3.1 Messbereiches

Um den Gehalt an Chlorogensäure in Artemisiae scopariae herba zu bestimmen, musste der Messbereich der Kalibrierung evaluiert werden. Dazu wurden 6 Proben ausgewählt und jeweils nach Methode Tabelle 13 (Cynarae folium Ph. Eur 7.3) extrahiert, chromatographiert und das erhaltene Detektorsignal dokumentiert (Tabelle 22). Eine Referenzsubstanzlösung wurde verdünnt und ebenfalls chromatographiert (Tabelle 23).

Tabelle 22: Wertetabelle zu den Vorversuchen der verwendeten Proben

Probe	Detektorsignal Chlorogensäure [mAU]
Arobemed	8288729
Herbasinica	4405131
LfL 13	22207066
Pharmachin	6142366
Phytax	7914909
Yong	3211775

Tabelle 23: Wertetabelle zu den Vorversuchen der verschiedenen Chlorogensäurekonzentrationen

Konzentrationen (Chlorogensäure) [mg/ml]:	Detektorsignal [mAU]:
0,00352	843720
0,04400	10229515
0,05867	13973836
0,08800	20924784
0,11000	25777731
0,13538	34610265

Anders als bei den chinesischen Proben, die ein Detektorsignal vergleichbarer Fläche zeigten, war das Signal der Probe aus deutschem Anbau mehr als doppelt so hoch. Um valide Ergebnisse für das Material beider Herkünfte zu gewährleisten, wurde die Validierung mit jeweils einer chinesischen und einer deutschen Probe durchgeführt.

Aus der Regressionsgerade der Vorversuche ließ sich ein linearer Zusammenhang zwischen der vermessenen Konzentration und dem erhaltenen Detektorsignal (Abbildung 32) ableiten. Der Mittelwert der Detektorsignale der Handelsproben wurde als Mitte der Kalibriergerade definiert.

Haariges Besenbeifußkraut 100

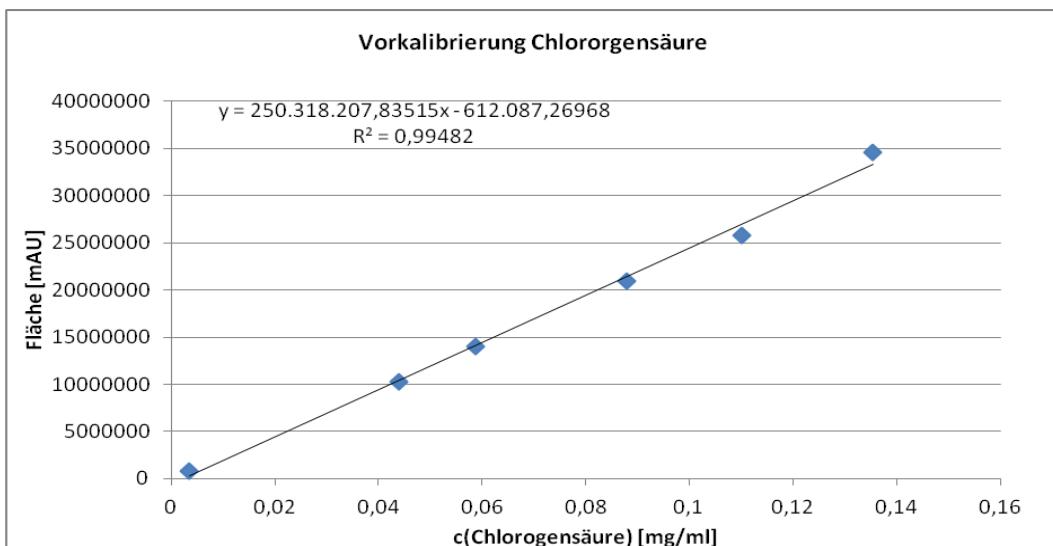


Abbildung 32: Kalibriergerade der Vorversuche zur Festlegung des Messbereichs

Der Messbereich wurde zwischen den Konzentrationen 0,00352 mg/ml und 0,11 mg/ml festgelegt.

Als Konzentrationen der einzelnen Kalibierlösungen (Level 1-6) wurden folgende Konzentrationen festgelegt:

Konzentration 1 (Level 1):	0,00338 mg/ml
Konzentration 2 (Level 2):	0,02816 mg/ml
Konzentration 3 (Level 3):	0,04224 mg/ml
Konzentration 4 (Level 4):	0,05632 mg/ml
Konzentration 5 (Level 5):	0,08448 mg/ml
Konzentration 6 (Level 6):	0,10560 mg/ml

4.7.2.3.2 Kalibrierfunktion

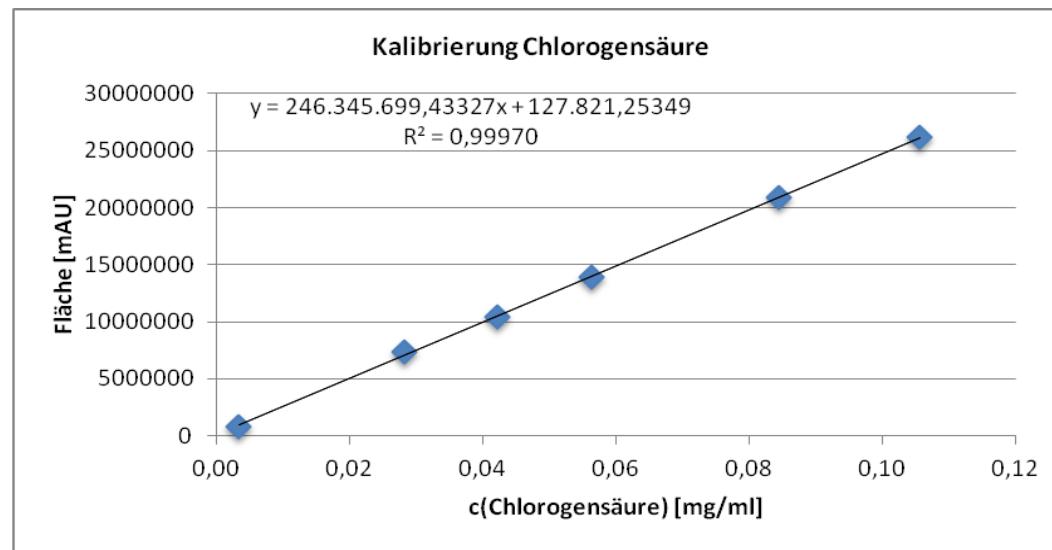
Die Kalibriergerade wurde wie unter 4.7.2.3.1 beschrieben aus jeweils einer frisch hergestellten Stammlösung dreimal hintereinander hergestellt und nach Tabelle 13 (Cynarae folium) chromatographiert.

Tabelle 24: Wertetabelle für die Kalibrierung von Chlorogensäure in Artemisiae scopariae herba

Level	1	2	3	4	5	6
Konzentration [mg/ml]	0,00338	0,02816	0,04224	0,05632	0,08448	0,10560
1. Messung [mAU]	816443	7432429	10157226	14096637	20534848	26372679
2. Messung [mAU]	888719	6978473	10222117	13681218	20675961	25780137
3. Messung [mAU]	822123	7697858	10936407	13938956	21494969	26397889
MW Fläche [mAU]	842428	7369587	10438583	13905604	20901926	26183568
Stabw	40189	363787	432347	209708	518414	349609
V _k	4,77	4,94	4,14	1,51	2,48	1,34

4.7.2.3.2.1 Lineare Regression

Eine Kalibrierfunktion wurde aus den Mittelwerten der Vermessung der Kalibrierlösungen durch lineare Regression erstellt. Dazu wurden die Formeln unter Punkt 3.6.11.2.5 verwendet um die Parameter m (Steigung der Gerade), b (Achsenabschnitt) und das Bestimmtheitsmaß r^2 zu berechnen.

**Abbildung 33: Kalibrierfunktion mit linearer Regression von Chlorogensäure**

Die Reststandardabweichung wurde mit Formel 10 berechnet und betrug 178976,77.

Die Verfahrensstandardabweichung, berechnet nach Formel 11, war 0,0007.

Daraus ergab sich ein relative Verfahrensstandardabweichung von 1,36% (Formel 12)

4.7.2.3.2.2 Quadratische Regression

Eine Kalibrierfunktion wurde aus den Mittelwerten der Vermessung der Kalibrierlösungen durch Quadratische Regression erstellt. Dazu wurden die Formeln unter Punkt 3.6.11.2.6 verwendet, um die Parameter m, n, b und das Bestimmtheitsmaß r^2 zu berechnen.

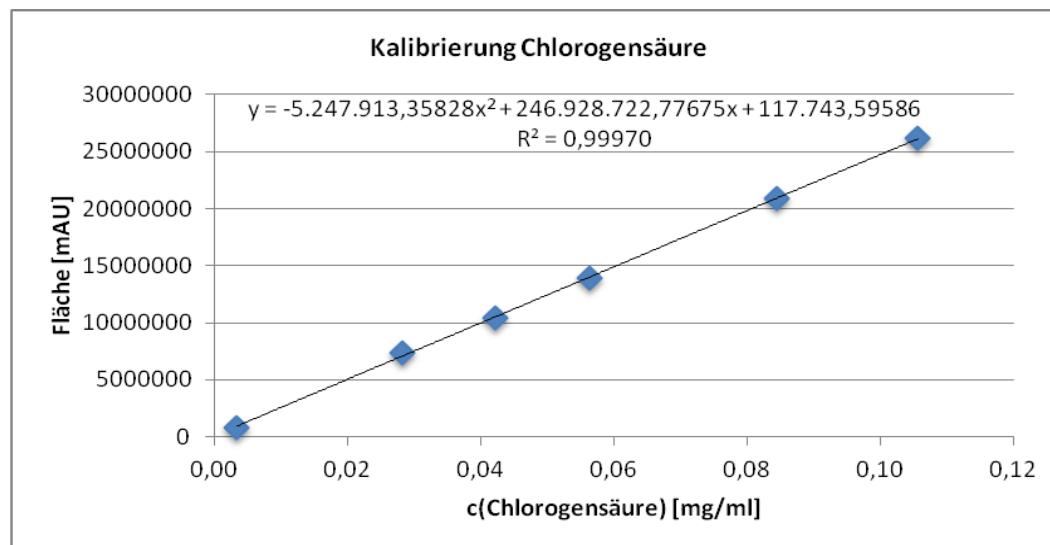


Abbildung 34: Kalibrierfunktion mit quadratischer Regression von Chlorogensäure

Die Reststandardabweichung wurde mit Formel 22 berechnet und betrug 206512,81.

Die Verfahrensstandardabweichung, berechnet nach Formel 23 und Formel 24, war 0,0008.

Daraus ergab sich ein relative Verfahrensstandardabweichung von 1,57% (Formel 12)

4.7.2.3.2.3 Anpassung nach Mandel

Ein Anpassungstest nach Mandel für die Kalibriergerade entfiel, da die relative Verfahrensstandardabweichung der linearen Regression kleiner war als die der quadratischen.

4.7.2.4 Wiederholpräzision

Zur Untersuchung der Wiederholpräzision wurde jeweils eine Probe aus chinesischem und eine aus deutschem Anbau fünfmal an einem Tag unabhängig voneinander eingewogen und nach Tabelle 13 (Cynarae folium) extrahiert und chromatographiert. Die prozentuelle Standardabweichung der Proben lag bei 2,31% bzw. 1,41% (Tabelle 25), somit unter 5% wodurch die Untersuchung der Wiederholpräzision akzeptiert werden konnte.

Tabelle 25: Ergebnisse der Wiederholpräzision

Probe aus chinesischem Import					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,50514	0,49831	0,50192	0,50798	0,49828
Fläche [mAU]	4473543	4459641	4413375	4696274	4515186
Gehalt [%]	0,34922	0,35288	0,34660	0,36507	0,35743
MW Gehalt	0,35424				
Stabw	0,00817				
V _K	2,31				
Probe aus deutschem Anbau					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,5085	0,51462	0,50084	0,49966	0,50415
Fläche [mAU]	22912922	23186544	22300826	21856290	22134194
Gehalt [%]	1,81893	1,81888	1,79713	1,76526	1,77192
MW Gehalt	1,79442				
Stabw	0,02531				
V _K	1,41				

4.7.2.5 Laborpräzision

Eine Probe der beiden Herkunftsländer wurde an vier weiteren Tagen unabhängig voneinander eingewogen, extrahiert und chromatographiert nach Tabelle 13 (Cynarae folium). Da der Variationskoeffizient (Tabelle 26) unter 5% lag, konnte der Test auf Laborpräzision akzeptiert werden.

Tabelle 26: Ergebnisse der Laborpräzision

Probe aus chinesischem Import					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,50441	0,5193	0,50895	0,54775	0,49828
Fläche [mAU]	4497906	4877579	4499795	5306306	4515186
Gehalt [%]	0,35169	0,37129	0,34870	0,38377	0,35743
MW Gehalt	0,36094				
Stabw	0,01582				
V _K	4,38				
Probe aus deutschem Anbau					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,50695	0,49612	0,50112	0,5001	0,5085
Fläche [mAU]	22432775	21801055	21889857	22549263	22912922
Gehalt [%]	1,78604	1,77334	1,76284	1,81996	1,81893
MW Gehalt	1,79222				
Stabw	0,02618				
V _K	1,46				

4.7.2.6 Probenauswertung und Prognoseintervall

Der Gehalt an Chlorogensäure in den sechs verschiedenen Proben konnte durch die Kalibriergerade abgeschätzt werden. Dazu wurden alle Proben dreimal an aufeinanderfolgenden Tagen extrahiert, chromatographiert nach Methode Tabelle 13 (Cynarae folium) und die Konzentration an Chlorogensäure durch Umstellen der Kalibriergerade nach x, berechnet.

Tabelle 27: Ergebnisse der Probenauswertung der Artemisiae scopariae herba Proben

	Arobemed	Herbasinica	LfL 13	Pharmachin	Phytax	Yong
MW Gehalt [%]	0,66205	0,34695	1,79067	0,48800	0,63196	0,25050
Stabw	0,03	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01
V _K	4,90	1,97	1,31	2,73	3,35	4,31

Der „echte“ Wert der Probe liegt jedoch zwischen zwei Hyperbelästen (Abbildung 1) um die Kalibriergerade, da sich Fehler aus der Kalibriergerade und der Messung aufsummieren. Das Intervall (Tabelle 28), in dem sich die Konzentration an Chlorogensäure in Artemisiae scopariae herba befindet, wurde nach Formel 38 berechnet.

Tabelle 28: Prognoseintervall der vermessenen Artemisiae scopariae herba Proben

	Arobemed	Herbasinica	LfL	Pharmachin	Phytax	Yong
Prognoseintervall [mg/ml]	0,03313 ±0,00132	0,01736 ±0,00150	0,08963 ±0,00150	0,02442 ±0,00141	0,03161 ±0,00133	0,01252 ±0,00157

4.7.2.7 Robustheit

Jeweils eine Probe der beiden Herkünfte wurde bei 35 °C, 40 °C und 45 °C Säulenofentemperatur nach Methode Tabelle 13 (Cynarae folium) chromatographiert. Die Temperatur wurde erhöht bzw. erniedrigt um die Robustheit der Methode zu untersuchen. Der Variationskoeffizient der gemessenen Flächen lag unter 5%, die Methode wird als robust angesehen.

Tabelle 29: Ergebnisse der Robustheitsuntersuchung von Artemisiae scopariae herba

	Probe aus chinesischem Import	Probe aus deutschem Anbau
Fläche bei 40 °C [mAU]	4402726	22226955
Fläche bei 45 °C [mAU]	4397370	22135118
Fläche bei 35 °C [mAU]	4406905	22268371
MW [mAU]	44023334	22210148
Stabw	4780	68198
V _K	0,11	0,31

4.7.2.8 Wiederfindung

Zu 0,500 g pulverisierte Droge (500) wurden 1,0 ml einer 1,68960 µg/ml (Droge aus China) bzw. 9,16667 µg/ml (Droge aus Bayern) haltigen Chlorogensäurelösung, was ca. 10% Aufstockung entsprach, pipettiert und wie unter Tabelle 13 (Cynarae folium) extrahiert und chromatographiert. Die Wiederfindung wurde nach Formel 39 berechnet (Tabelle 30) und lag in den vorgegebenen Grenzen von 95-105%.

Tabelle 30: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchung von Chlorogensäure in Artemisiae scopariae herba, C = Probe aus chinesischem Import; D = Probe aus deutschem Anbau

	Einwaage [g]	Zugabe [mg]	Errechnete Konzentration [mg/ml]	Gefundene Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung [%]	Wiederfindung- Mittelwert [%]
1. Messung C	0,50248	0,00169	0,01914	0,01903	99,43	
2. Messung C	0,50132	0,00169	0,01910	0,01872	98,04	97,92
3. Messung C	0,49753	0,00169	0,01896	0,01826	96,30	
1. Messung D	0,50556	0,00917	0,09232	0,09258	100,29	
2. Messung D	0,50021	0,00917	0,09136	0,09024	98,78	98,98
3. Messung D	0,50018	0,00917	0,09135	0,08941	97,87	

4.7.2.9 Nachweisgrenze

Nachweisgrenze für Chlorogensäure (berechnet nach Formel 40): 2,40 µg/ml

4.7.2.10 Quantifizierungsgrenze

Quantifizierungsgrenze für Chlorogensäure (berechnet nach Formel 41): 7,27 µg/ml

4.8 Chromatographische Unterscheidung von *Artemisia capillaris* THUNB. und *Artemisia scoparia* WALDST. ET KIT.

Im Entwurf der Monographie für Artemisia scopariae herba für die Hongkong Chinese Materia Medica Standards (HKCMMS) Vol 6 wird eine DC-Methode vorgeschlagen mit der die Identität der Probe und der Stammpflanze überprüft werden kann. Zusätzlich ist ein HPLC-Fingerprint der beiden Stammpflanzen abgebildet, womit Unterschiede im Naturstoffmuster der beiden Pflanzen erkennbar waren. Um das Pflanzenmaterial mit der Stammpflanze zu vergleichen, wurden 3 Handelsproben, die als *Artemisia scoparia* und 5 Proben die als *Artemisia capillaris* deklariert waren, mit den genannten Fingerprintmethoden analysiert.

Haariges Besenbeifußkraut 106

4.8.1 HPTLC

Alle 8 *Artemisiae scopariae* herba Proben wurden nach Methode Tabelle 12 (HKCMMS-Monographieentwurf) mit HPTLC untersucht. Alle Proben zeigten die blau fluoreszierende Bande der Chlorogensäure (Abbildung 35) bei $R_F = 0,28$.

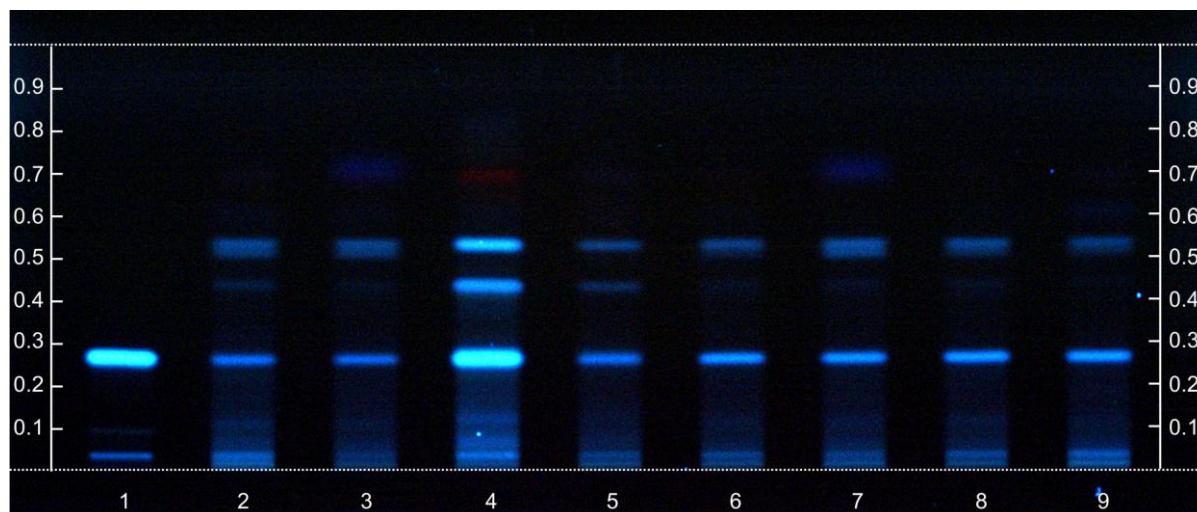


Abbildung 35: HPTLC Unterscheidung *A. capillaris*-*A. scoparia*, Bahn 1: Referenzsubstanz Chlorogensäure 1 µl, Bahn 2-4: *Artemisia scoparia* Extrakte aus China und Deutschland jeweils 2 µl; Bahn 5-9: *Artemisia capillaris* Extrakte aus China jeweils 2 µl; FM: Butylacetat, Ameisensäure, Wasser (28:13:10) obere Phase, Entwicklungsstrecke: 7 cm, 366 nm

Entsprechend dem Monographieentwurf des HKCMMS zeigt sich bei *A. scoparia* folgende Bandenabfolge: Chlorogensäure bei R_F von ca. 0,3, darüber eine blau fluoreszierende Bande bei ca. $R_F = 0,5$. Bei *A. capillaris* ist eine zusätzliche blau fluoreszierende Zone bei ca. $R_F = 0,65$ zu beobachten. Lediglich die Proben *A. scoparia* aus Harbin und *A. capillaris* der Firma Herbasinica zeigten eine schwache blaue Zone bei $R_F=0,71$, die nur nach starker Aufhellung des Chromatogramms zu erkennen waren. Die Aussagekraft des HPTLC-Fingerprints der HKCMMS ist daher zu bezweifeln.

4.8.2 HPLC

Um den Fingerprint mittels HPLC zu analysieren, wurden die 8 Proben nach Methode Tabelle 13 (HKCMMS-Monographieentwurf) aufgearbeitet und chromatographiert. Da im Monographievorschlag der HKCMMS keine Angaben zur Säulentemperatur gemacht werden, wurde bei Raumtemperatur von 25 °C gearbeitet. Im entsprechenden Vergleichschromatogramm nach HKCMMS von *A. capillaris* sind 4 charakteristische Peaks zu erkennen: Chlorogensäure bei $R_t = 18$ min, 4-Hydroxyacetophenon (die zweite Markersubstanz im HKCMMS) bei $R_t = 23$ min, zwei weiterer Peaks bei $R_t = 34$ und 36 min.

A. scoparia ist durch nur 3 Peaks zu unterscheiden: Chlorogensäure, 4-Hydroxyacetophenon und eine unbekannter Peak bei $R_t = 36$ min.

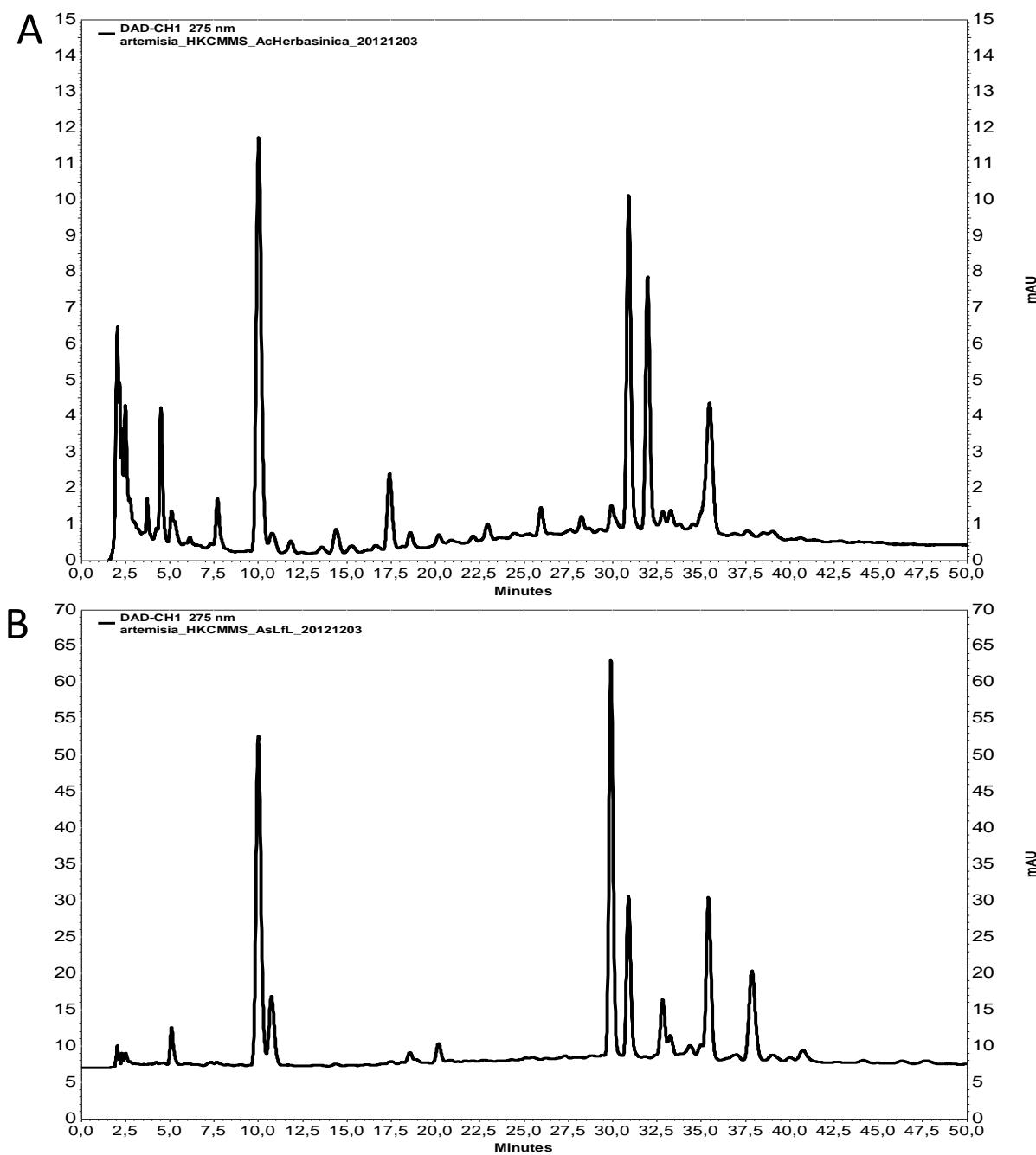


Abbildung 36: HPLC Unterscheidung *A. capillaris*-*A. scoparia*; 10 µl, 275 nm, 1,0 ml/min, 25 °C, A: H₂O, H₃PO₄ 0,1%, B: Methanol; 0-10 min: 75% A, 10-30 min 75-55%, 30-50 min 55% A, Chromatogramm A: *Artemisia capillaris* aus chinesischer Herkunft; Chromatogramm B: *Artemisia scoparia* aus deutscher Herkunft

Die Chromatogramme (Abbildung 36) der 8 Handelsproben zeigten deutlich mehr Peaks im Fingerprint, als in der Monographie beschrieben. Darüber hinaus war die Retentionszeit von Chlorogensäure um ca. 8 min kürzer. Der erstellte Fingerprint ist nicht mit den Abbildungen im HKCMMS Monographievorschlag zu vergleichen und kann nicht zur Unterscheidung der beiden Stammpflanzen verwendet werden.

4.9 Analyse des genetischen Fingerprints von *Artemisiae scopariae herba* verschiedener Herkünfte

Da sich die *Artemisiae scopariae herba* Proben aus verschiedenen geographischen Anbaugebieten in der Morphologie (4.3) und den Inhaltsstoffen (4.5) unterschieden, wurden die Proben anhand ihres genetischen Fingerprints von Frau Annika Orland (BfArM, Bonn) untersucht. Dazu wurde die ITS Sequenz (Internal Transcribed Spacer) aus dem getrockneten Pflanzenmaterial isoliert, vervielfältigt und miteinander und mit verschiedenen ITS Sequenzen der NCBI Datenbank verglichen. Der Abgleich der Proben Arobemed und LfL 11 ergab, dass sich die ITS Sequenzen lediglich in einer Base unterscheiden (Abbildung 37) und höchstwahrscheinlich zur selben Spezies zuzuordnen sind. Um die genaue Gattung und Art der Proben zu ermitteln wurden die gewonnenen Sequenzen mittels NCBI BLAST Suche mit anderen, in der Datenbank vorhandenen Basensequenzen, verglichen. Die höchste Übereinstimmung zeigte sich mit der Sequenz *Artemisia* sp. CD-2009 voucher cdt52 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence (Abbildung 39), die keiner Spezies zugeordnet ist. In der Datenbank fand sich auch eine Sequenz von *Artemisia scoparia* mit einem hohen Max-Ident Werten, deren Vergleich mit *Artemisa* sp. einen Unterschied von lediglich 3 Basen (Abbildung 40) ergab.

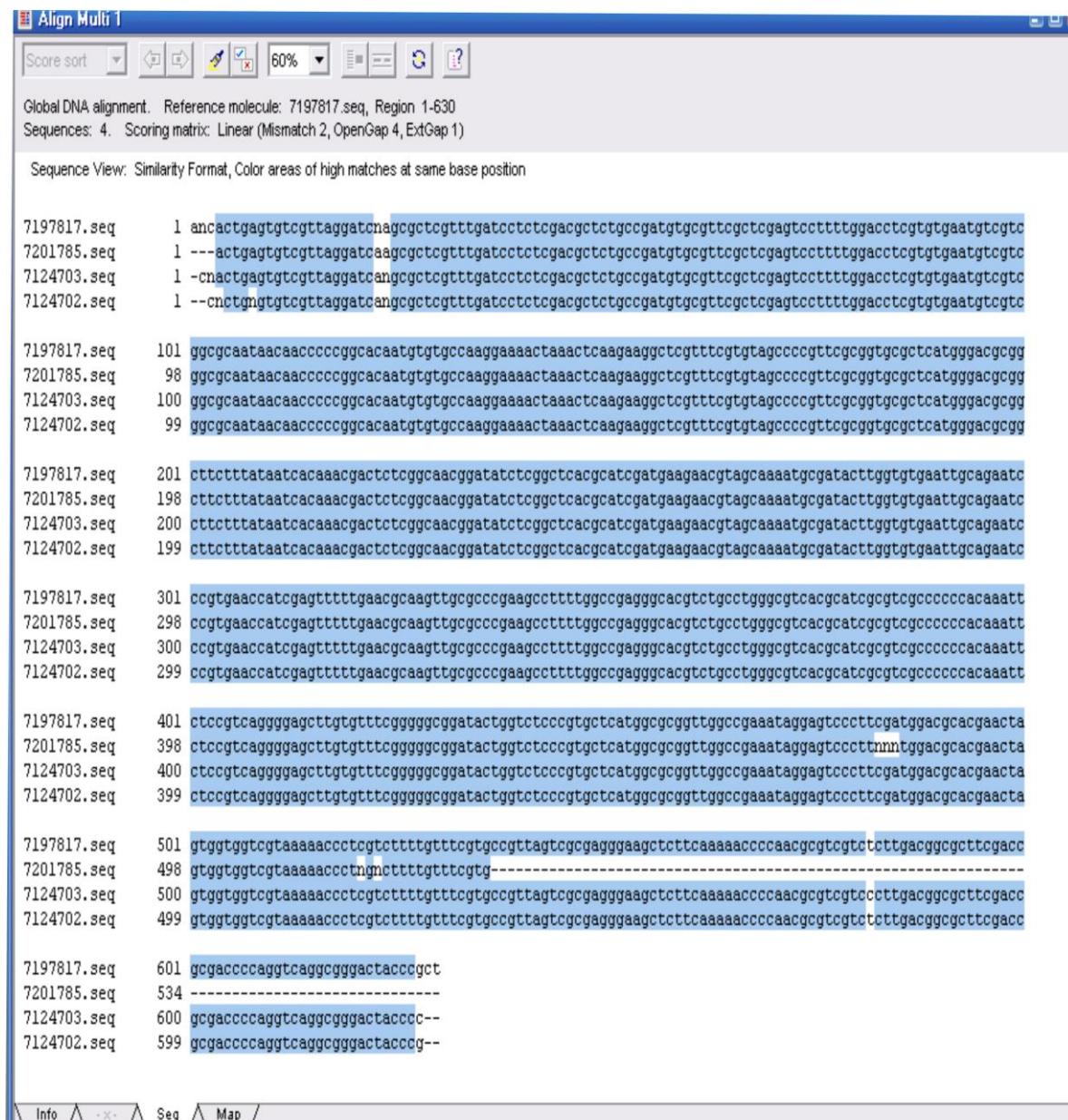


Abbildung 37: Sequenzabgleich der ITS-Region der Proben von Artemisiae scopariae herba der Firma Arobemed (7197817.seq und 7124703.seq) und aus deutschem Anbau (LfL 11) mit dem PC-Programm SECentral, Legende: a: Adenin, c: Cytosin, g: Guanin, t: Thymin, n: any base (konnte durch die Sequenzierung nicht genauer bestimmt werden), - keine Sequenzierung

Haariges Besenbeifußkraut 110

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
18303_1	Artemisia sp. CD-2009 voucher cdTS2 18S ribosomal RNA gene, partial	1144	1144	99%	0.0	99%
198883_1	Artemisia klementzae ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate HAL504	1085	1085	94%	0.0	99%
198860_1	Artemisia commutata ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate M170 (I)	1085	1085	94%	0.0	99%
198896_1	Artemisia monostachya ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate N#13	1085	1085	94%	0.0	99%
198864_1	Artemisia dolosa ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate V63 (HAL)	1079	1079	94%	0.0	99%
198856_1	Artemisia canadensis ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate 7086 (L)	1079	1079	94%	0.0	99%
198918_1	Artemisia sphaerocephala ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate N#	1079	1079	94%	0.0	99%
198863_1	Artemisia depauperata ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate HAL59	1061	1061	92%	0.0	99%
198854_1	Artemisia borealis subsp. richardsoniana ITS1, 5.8S rRNA gene and IT	1046	1046	91%	0.0	99%
48200_1	Artemisia japonica isolate ar3 18S ribosomal RNA gene, partial sequer	1133	1133	99%	0.0	99%
198907_1	Artemisia pubescens ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate 34/3	1079	1079	94%	0.0	99%
198852_1	Artemisia borealis ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate 145/83	1075	1075	94%	0.0	99%

Abbildung 38: Sequenzabgleich der ITS-Sequenz von *Artemisiae scopariae herba* der Firma Arobemed mit Daten von NCBI BLAST

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	—
FJ528303_1	Artemisia sp. CD-2009 voucher cdTS2 18S ribosomal RNA gene, partial	1146	1146	99%	0.0	
AM198864_1	Artemisia dolosa ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate V63 (HAL)	1081	1081	94%	0.0	
AM198856_1	Artemisia canadensis ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate 7086 (L)	1081	1081	94%	0.0	
AM198918_1	Artemisia sphaerocephala ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate N#	1081	1081	94%	0.0	
AM198883_1	Artemisia klementzae ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate HAL504	1085	1085	94%	0.0	
AM198860_1	Artemisia commutata ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate M170 (I)	1085	1085	94%	0.0	
AM198896_1	Artemisia monostachya ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate N#13	1085	1085	94%	0.0	
AM198852_1	Artemisia borealis ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate 145/83	1077	1077	94%	0.0	
AM198850_1	Artemisia bargusinensis ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate N#2	1075	1075	94%	0.0	

Abbildung 39: Sequenzabgleich der ITS-Sequenz von *Artemisiae scopariae herba* aus deutschem Anbau (LfL 11) mit Daten von NCBI BLAST

Abbildung 40: Sequenzabgleich der ITS-Sequenz von *Artemisia scoparia* ITS und *Artemisia* sp. CD2009 (Sequenzen aus NCBI BLAST, Sequenzabgleich mit dem Programm SECentral)

Der PCR Fingerprint mehrere *Artemisiae scoparia* herba Proben ergab Sequenzen mit hoher Homologie, die fast alle *Artemisia scoparia* zugeordnet werden können. Einzig die Probe der Firma Pharmachin besaß eine höhere Übereinstimmung mit der Sequenz zu *Artemisia japonica* (Tabelle 31).

Tabelle 31: Ergebnisse des PCR Fingerprints, 1⁺ PCR-Produkt in der gewünschten Größe, 2⁺ Sequencingergebnisse entsprechen *A. scoparia*

Sample	PCR Resultate ¹	NCBI BLAST Resultate ²
Arobemed	+	+
Chengdu 2009	+	+
Harbin	+	+
Herbasinica	+	+
LfL 14	+	+
LfL 15	+	+
LfL 16	+	+
LfL 17	+	+
LfL 18	+	+
LfL 19	+	+
LfL 20	+	+
LfL 21	+	+
Lian	+	+
Pharmachin	+	(<i>A. japonica</i>)
Phytax	+	+
Shanghai 2001	+	+
Shanghai 2005	+	+
Yong Quan	+	+

4.10 Gaschromatographische Untersuchung des ätherischen Öls von *Artemisiae scopariae herba*

4.10.1 Gehaltsbestimmung des Ätherischen Öls

Aus 50,0 g Drogenmaterial wurden durch Wasserdampfdestillation 0,01 ml (chinesischer Import) und 0,11 ml (bayerischer Anbau) ätherisches Öl gewonnen. Beide Öle waren von intensivem Geruch und gelblicher Farbe. Auffallend war der zehnfach niedrigere Gehalt an Ätherischem Öl im Probenmaterial aus chinesischer Herkunft. Das ChP 2010 schreibt in der Monographie von *Artemisiae scopariae herba* eine Trocknung in der Sonne („dried in the sun“) vor, welche den Gehalt an ätherischem Öl erniedrigen kann.

Tabelle 32: Gehalt an ätherischem Öl in *Artemisiae scopariae herba* verschiedener Herkünfte

Probe	Einwaage [g]	Ätherisches Öl [ml]	Gehalt an ätherischem Öl [ml/kg]
Arobemed	50,0	0,01	0,20
LfL 11	50,0	0,11	2,20

4.10.2 GC-FID Untersuchung

50,0 g wurden erneut mit Wasserdampf destilliert wobei jedoch Hexan als organische Phase verwendet wurde. 1 µl des gewonnenen Öls wurden gaschromatographiert und ausgewertet (Tabelle 33). Ein FID-Korrekturfaktor konnte nicht bestimmt werden, da die genauen Massen der einzelnen Komponenten nicht bekannt waren. Im Vergleich der GC-FID Chromatogramme der beiden Proben (Abbildung 41) zeigten sich Unterschiede in der Zusammensetzung ätherischen Öls. Die Hauptkomponente (46%) des ätherischen Öls bayerischer Herkunft bei $R_t = 38,394$ min zeigte im Öl der importierten Ware nur einen kleinen Peak (2%) bei $R_t = 37,883$. Vermutlich handelt es sich dabei um Capillen, ein aromatisches Acetylen welches in verschiedenen GC-MS Untersuchungen von *Artemisia scoparia* und *Artemisia capillaris* als Hauptkomponente zwischen 33,5 [103] und 53,1% [60] oder als Nebenkomponente zwischen 1,47 [104] und 8,6% [105] gefunden wurde. Zur weiteren Untersuchung des ätherischen Öls von *Artemisia scoparia* aus Bayern und China wurden frisch destillierte Proben mittels GC-MS charakterisiert.

Tabelle 33: Ergebnisse der GC-FID Analyse des ätherischen Öls von *Artemisia scopariae herba*

Retentionszeit [min]	Peakfläche	Prozentanteil
Droge aus chinesischem Import (Arobemed)		
9,594	$1,43973 \times 10^9$	Lösemittelpeak
9,760	540362	16,18
32,144	307705	9,21
35,529	210207	6,29
37,883	67991	2,04
51,204	566430	16,90
	$1,44307 \times 10^9$	Gesamtfläche
Droge aus bayerischem Anbau (LfL 11)		
8,627	$1,06153 \times 10^9$	Lösemittelpeak
8,846	469574	2,24
26,996	823689	3,93
35,664	1590122	7,58
38,394	9662319	46,05
51,221	649118	3,09
	$1,08251 \times 10^9$	Gesamtfläche

Haariges Besenbeifußkraut 114

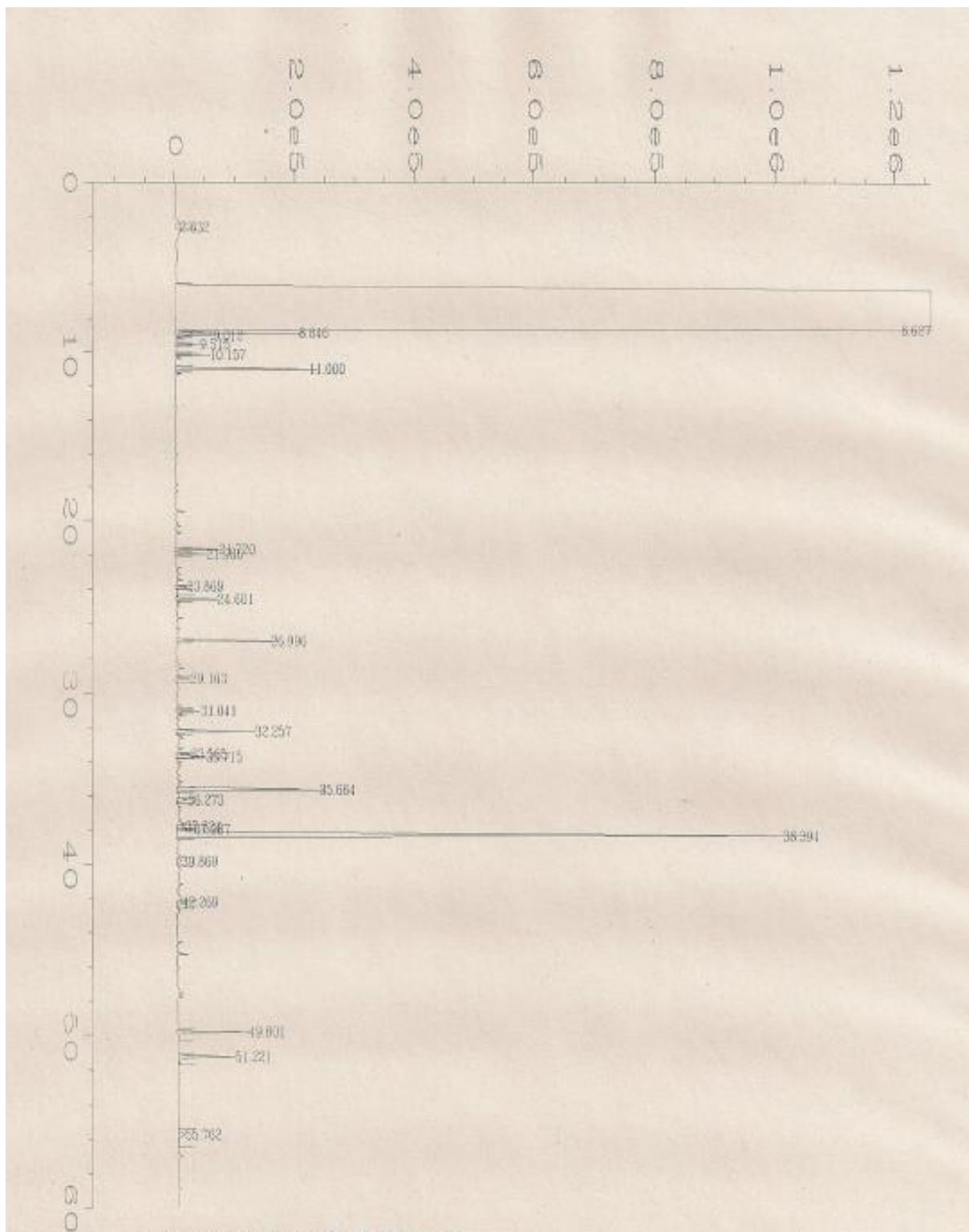


Abbildung 41: GC-FID Chromatogramm der Probe aus bayerischem Anbau (LfL 11)

4.10.3 GC-MS Identifizierung der Bestandteile des Ätherischen Öls

Um die aus den GC-FID Versuch gewonnenen Ergebnisse zu präzisieren, wurden 10 Proben aus chinesischem und 8 Proben aus deutschen Anbau destilliert und mittels GC-FID die relativen Flächen der Peaks ermittelt. Ferner konnten die Inhaltsstoffe des Öls durch GC-MS identifiziert werden. Die Anteile der enthaltenen Komponenten respektive der relative Gehalt variieren einerseits zwischen den beiden Herkünften, aber auch in einem Herkunftsland zwischen den einzelnen Proben (Tabelle 34). Das bayerische Material zeichnet sich unter anderem durch das Vorhandensein von moncyclischen Monoterpenen wie α -Terpinen (China: -, Deutschland: 0,28%) und γ -Terpinen (China: 0,19%, Deutschland: 0,91%) aus, das dort in hohem Maße zu finden ist. Auch bei der Klasse der Sesquiterpene zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den geographischen Herkünften. Während der Bisabolan-Typ vermehrt bei der bayerischen Ware zu finden war (China: 3, Deutschland: 10), sprach ein hoher Cadidnan-Anteil für eine chinesische Probe (China: 15, Deutschland: 6). Im Gegensatz dazu waren manche Verbindungen, wie z. B. (*E*)-Nerolidol (0,6-2,3%) oder Capillen (10,1-46,6%) in allen Proben mit unterschiedlichem Gehalt vorhanden. Auffällig ist auch der Anteil der Fettsäuren und deren Ester im ätherischen Öl. Die chinesischen Drogen beinhalten bis zu 37,6% Palmitinsäure, die bayerischen hingegen nur bis zu 10,7%.

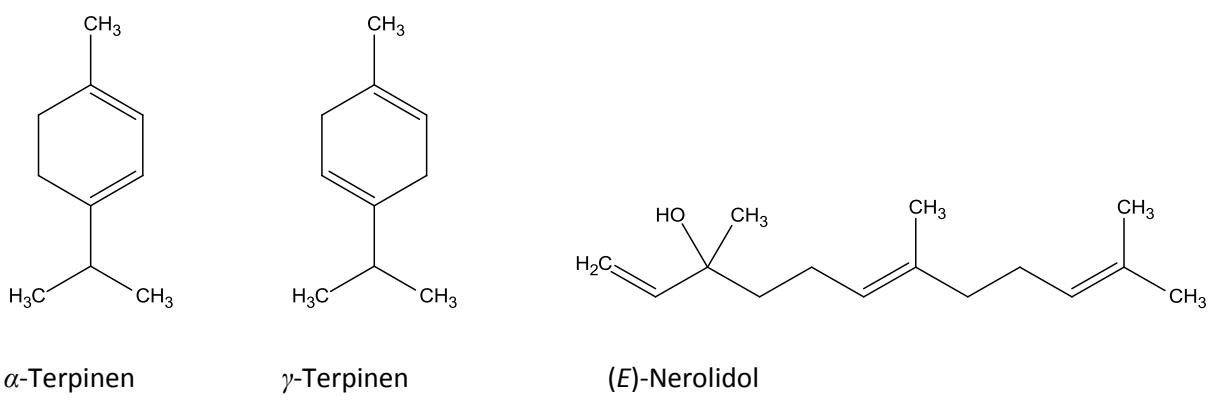


Abbildung 42: Inhaltsstoffe des ätherischen Öls von *Artemisiae scopariae herba*

Die komplexe Zusammensetzung des ätherischen Öls wurde mittels SPSS statistisch untersucht, um Unterschiede zwischen den beiden Herkünften aufzuzeigen (Tabelle 35).

Haariges Besenbeifußkraut 116

Tabelle 34: Bestandteile des ätherischen Öls von Artemisiae scopariae herba nach GC-MS Identifizierung, Angabe der relativen Flächen nach GC-FID Analyse [%], RRI in Bezug auf n-Alkane, 1-10= Proben aus chinesischem Anbau (Arobemed, Chengdu, Harbin, Pharmachin, Shanghai 2005, Lian, Phytax, Yong Quan, Shanghai 2001, Herbasinica), 11-18= Proben aus deutschem Anbau (Lfl 14, Lfl 15, Lfl 16, Lfl 17, Lfl 18, Lfl 19, Lfl 20, Lfl 21)

	Sesquiterpene																		
	acyclisch																		
1668	Z- β -Farnesen	-	1,9	-	-	-	0,4	1,1	0,2	-	0,4	0,6	-	-	-	0,5	-	0,6	-
1695	E- β -Farnesen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	
2050	E-Nerolidol	1,4	0,6	0,9	0,9	0,6	0,8	0,9	0,6	1,0	0,8	1,4	1,5	1,6	1,8	1,7	2,3	1,0	1,5
	monocyclisch																		
	Bisabolan-Typ																		
1669	Sesquisabinen	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
1704	γ -Curcumen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	1,0	0,9	0,6	0,5	-	0,6	-
1726	α -Zingiberen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	
1755	β -Curcumen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-
1786	ar-Curcumen	1,2	3,4	0,9	0,9	1,6	2,3	2,5	1,2	3,0	1,2	5,0	3,1	2,9	2,4	6,1	3,3	7,7	2,9
2170	β -Bisobolol	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	0,8	0,9	1,1	0,8	-	-	-	-
2191	Zingiberenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-
2214	ar-Turmerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	0,5	0,4	0,9	0,7	1,0	1,0
2232	α -Bisobolol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	0,7	-
2247	trans- α -Bergamotol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	0,6	0,4	0,4	-	0,6	-	-
	Germacran-Typ																		
1726	Germacren D	1,2	1,0	1,8	0,9	2,6	1,6	0,6	0,8	-	1,8	-	-	-	-	-	1,0	-	0,5
1755	Bicyclogermacran	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	0,3	-	-
2130	Salviadienol	1,2	0,6	1,0	1,6	0,6	1,0	1,0	0,7	0,8	0,4	-	-	-	-	-	1,4	0,8	1,3
	Eleman-Typ																		
1600	β -Elemen	-	-	-	-	-	0,4	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	0,6	-	0,4
	Humulan-Typ																		
1687	α -Humulen	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,7	-	0,4	0,4	0,4	-	0,4	-
2081	Humulenenepoxid II	1,5	0,8	1,4	1,9	-	1,1	1,4	1,5	0,6	1,4	1,4	1,2	1,4	1,0	2,1	0,9	2,5	1,2

Haariges Besenbeifußkraut 118

	polycyclisch																		
	Caryophyllan-Typ																		
1612	β -Caryophyllen	1,0	1,3	2,0	1,0	1,7	1,3	0,2	1,1	1,4	2,1	3,5	1,2	1,1	0,7	1,2	1,3	1,2	0,7
2001	Isocaryophyllenoxid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	tr	0,7	-	0,4	-
2008	Caryophyllenoxid	14,9	8,7	11,0	18,9	5,6	6,4	13,3	14,1	4,5	13,3	6,3	6,6	7,0	5,8	10,7	10,8	11,0	11,0
2324	Caryophylladienol II	2,2	1,1	-	2,0	-	1,2	1,2	1,1	-	0,9	1,2	-	0,4	0,4	-	0,6	-	-
2389	Caryophyllenol I	-	0,8	-	1,4	-	1,3	1,5	1,4	-	0,6	1,0	-	-	-	-	-	-	-
2392	Caryophyllenol II	3,1	2,0	2,3	3,6	1,4	2,2	2,2	2,5	2,1	3,0	1,3	-	0,8	0,5	1,0	2,1	1,2	-
	Eudesman-Typ																		
1742	β -Selinol	-	-	-	0,5	-	-	-	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1744	α -Selinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
2278	Torilenol	2,0	0,9	1,4	2,7	1,1	2,0	1,5	1,1	-	2,5	-	-	-	-	-	2,0	0,6	1,2
2369	Eudesma-4(15)-7-dien-1- β -ol	2,5	1,1	1,7	2,9	1,4	2,9	1,8	1,5	1,7	3,0	-	-	-	-	0,9	2,2	0,9	1,7
	Cadinan-Typ																		
1639	Cadina-3,5-dien	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
1704	γ -Muurolen	0,6	0,5	-	0,4	0,5	0,6	0,5	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
1740	α -Muurolen	0,4	0,4	-	-	0,9	1,0	0,6	-	-	0,4	-	-	-	-	-	0,6	-	-
1773	δ -Cadinol	1,0	0,4	0,4	0,6	0,7	1,0	0,5	0,4	0,8	0,9	tr	-	-	-	-	0,7	tr	0,5
1776	γ -Cadinol	0,5	0,2	-	0,3	-	0,7	0,3	0,1	0,4	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
1807	α -Cadinol	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
1849	Calamenen	0,3	-	-	tr	-	0,3	tr	-	0,6	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
1900	Epicubebol	-	-	-	-	-	0,4	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
1941	α -Calacoren	0,3	-	-	-	-	0,6	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
1957	Cubebol	0,5	-	-	-	-	0,4	0,3	0,2	-	0,3	-	-	-	-	-	1,2	-	-
2080	Cubenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
2088	1-epi-Cubebol	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-
2187	T- Cadinol	1,2	-	-	0,9	0,4	0,8	0,7	0,6	-	1,0	-	-	-	-	-	0,7	-	-
2209	T-Muurolol	1,5	-	-	-	-	1,1	0,6	0,4	-	1,0	-	-	-	-	-	0,4	-	-
2255	α -Cadinol	2,3	0,8	1,6	2,1	1,9	2,5	1,4	1,1	-	2,6	-	-	-	-	-	0,6	-	tr

Haariges Besenbeifußkraut 120

2361	β -Asaron	-	-	-	-	1,0	-	-	-	3,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2554	<i>E</i> -3-Butyldienphthalat	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Andere cyclische Bestandteile																			
1429	Perillen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5
1958	(<i>E</i>)- β -Ionon	1,2	0,3	1,2	0,2	0,4	0,9	0,7	1,1	1,7	1,1	0,3	0,1	0,2	0,2	1,3	0,2	1,6	2,1
1969	cis-Jasmon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	0,3	0,2	-	-	-	-
2179	3,4-dimethyl-5-pentyliden-2(5H)-Furanon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
Andere aliphatische Bestandteile																			
1222	2-Hexanol	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1225	(<i>Z</i>)-3-Hexenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,6	-	-	-	-	-	-	-	-
1507	(<i>E,E</i>)-2,4-Heptadienal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
1540	Modhephan	-	0,2	-	-	-	0,4	0,3	0,4	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
1868	(<i>E</i>)-Geranylacetone	-	-	-	0,8	-	0,5	0,3	-	tr	0,4	-	-	-	-	-	0,3	-	-
1893	Geranylisovalerat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	0,2	-	-	-	-
1871	Nerylvalerat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
2131	Hexahydrofarnesylacetone	2,4	1,6	1,1	1,6	2,1	4,2	1,8	0,6	4,4	3,4	0,8	-	0,3	0,3	0,6	0,7	1,2	0,9
2242	Methylhexadecanoate	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
2300	Tricosan	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fettsäuren und Methylester																			
2509	Metyllinoleat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
2298	Caprinsäure	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2503	Laurinsäure	1,2	-	-	-	0,9	0,9	0,4	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2670	Myristinsäure	1,3	2,0	1,4	1,3	3,0	2,5	1,6	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2583	Methylinolenat	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
2822	Pentadecansäure	-	1,1	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2931	Palmitinsäure	14,5	37,6	24,4	8,3	29,9	16,1	17,3	8,0	3,1	5,7	1,5	1,6	1,7	1,0	3,0	6,0	3,8	10,7

Tabelle 35: Bestandteile des ätherischen Öls von Artemisiae scopariae herba mit statistisch signifikantem ($p=0,05$) Unterschieden zwischen den beiden Herkunftsländern (*nur in einer Probe enthalten), China: N = 10 Proben aus chinesischem Import; Deutschland: N = 8 Proben aus deutschem Anbau

RRI	Bestandteil	China [%]	Deutschland [%]
1032	α -Pinen	-	$0,28 \pm 0,18$
1118	β -Pinen	$0,19 \pm 0,27$	$0,91 \pm 0,53$
1174	Myrcen	-	$0,85 \pm 0,71$
1188	α -Terpinen	-	$0,18 \pm 0,14$
1203	Limonen	$0,18 \pm 0,29$	$0,75 \pm 0,37$
1255	γ -Terpinen	0,2*	$0,71 \pm 0,33$
1280	p -Cymen	0,3*	$6,21 \pm 3,94$
1497	α -Copaen	$0,14 \pm 0,16$	-
1540	Modhephan	$0,15 \pm 0,17$	-
1550	α -Isocomen	$0,45 \pm 0,26$	-
1687	α -Humulen	$0,05 \pm 0,11$	$0,29 \pm 0,26$
1704	γ -Muurolen	$0,36 \pm 0,25$	-
1704	γ -Curcumen	-	$0,65 \pm 0,53$
1726	Germacrene D	$1,23 \pm 0,74$	$0,19 \pm 0,37$
1773	δ -Cadinen	$0,67 \pm 0,25$	$0,15 \pm 0,28$
1776	γ -Cadinen	$0,29 \pm 0,22$	-
1786	<i>ar</i> -Curcumen	$1,82 \pm 0,91$	$4,18 \pm 1,89$
2037	Salvial-4(14)-en-1-on	$1,58 \pm 0,48$	$0,58 \pm 0,89$
2050	(E)-Nerolidol	$0,85 \pm 0,24$	$1,60 \pm 0,37$
2131	Hexahydrofarnesylacetone	$2,32 \pm 1,28$	$0,60 \pm 0,39$
2144	Spathulenol	$6,38 \pm 2,57$	$12,98 \pm 3,59$
2187	<i>T</i> -Cadinol	$0,56 \pm 0,44$	0,7*
2209	<i>T</i> -Muurolol	$0,46 \pm 0,56$	0,4*
2214	<i>ar</i> -Turmerol	-	$0,65 \pm 0,34$
2255	α -Cadinol	$1,63 \pm 0,82$	0,6*
2264	Capillen	$23,99 \pm 10,22$	$39,04 \pm 8,35$
2278	Torilenol	$1,52 \pm 0,81$	$0,48 \pm 0,76$
2369	Eudesma-4(15)-7-dien-1 β -ol	$2,05 \pm 0,71$	$0,71 \pm 0,87$
2389	Caryophyllenol I	$0,70 \pm 0,66$	1,0*
2392	Caryophyllenol II	$2,44 \pm 0,63$	$0,86 \pm 0,70$
2503	Laurinsäure	$0,38 \pm 0,46$	-
2670	Myristinsäure	$1,45 \pm 0,95$	-
2931	Palmitinsäure	$16,49 \pm 11,19$	$3,66 \pm 3,28$

Als Hauptbestandteile des ätherischen Öls von Artemisiae scopariae herba beider Herkünfte konnten Caryophyllenoxid (8,3-11,1%), Spathulenol (6,4-13,0%), Capillen (24,0-39,0%) sowie Palmitinsäure (3,7-16,5%) identifiziert werden.

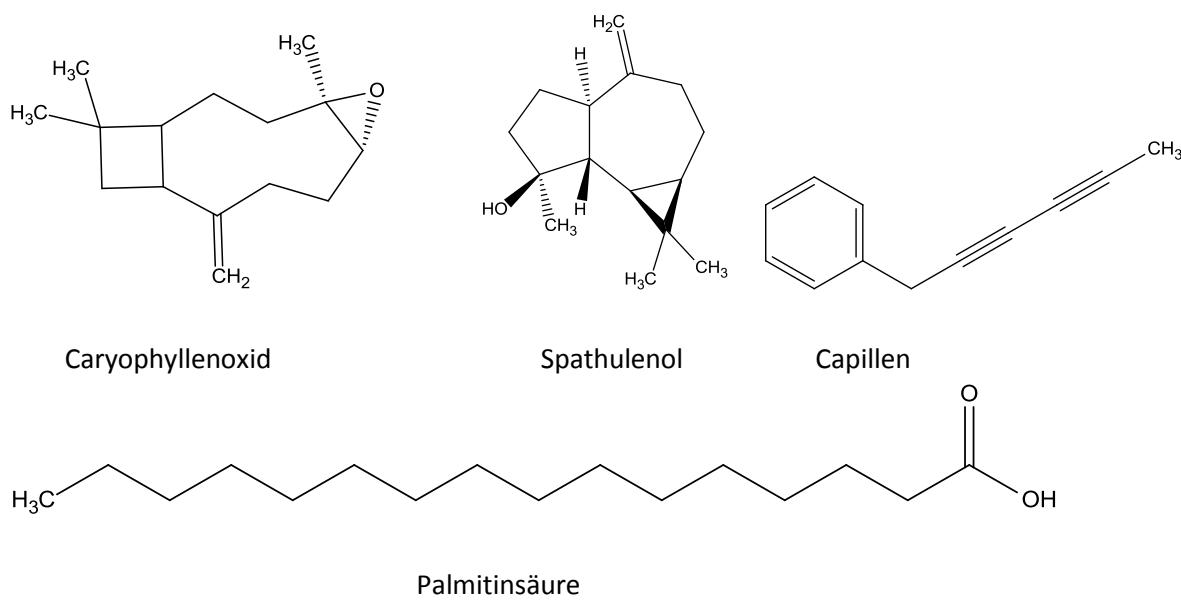


Abbildung 43: Hauptinhaltsstoffe des ätherischen Öls von *Artemisiae scopariae herba*

Die signifikanten Unterschiede zwischen der Krautdroge aus bayerischem und chinesischem Anbau sind in allen Terpenklassen sichtbar, doch bei den beiden Substanzen Capillen und Palmitinsäure am ausgeprägtesten. Capillen ist im ätherischen Öl aus beiden Anbaugebieten der Hauptinhaltsstoff, doch ist der Gehalt im Durchschnitt beim deutschen Pflanzenmaterial 1,6x höher als im chinesischen. Im Gegensatz dazu zeigt die aus China stammende Ware einen 4,5-fach höheren Gehalt an Palmitinsäure. Dies könnte mit der unterschiedlichen Dichte der Behaarung zusammenhängen. Eventuell schützen die weiß flaumigen Haare und ein höhere Anteil an lipophileren Substanzen die chinesische Pflanze vor Austrocknung [106] durch stärkere Windexposition.

4.11 Isolierung und Identifizierung eines charakteristischen Flavonoids aus *Artemisiae scopariae herba* aus bayerischem Anbau

Das isolierte Substanz besaß eine Masse von m/z $[M+H^+]$ 449,1073 g/mol, gemessen im positiv Modus HR-ESI-MS. Um die Struktur aufzuklären, wurde ein ^1H und ^{13}C -NMR gemessen. Die erhaltenen Spektren (Abbildung 44) wurden anhand der Lage der Signale, der Multiplizität und des Kopplungskonstante ausgewertet (Tabelle 36). Das Protonenspektrum zeigte charakteristische Signale eines Flavonolgerüstes und eines Hexoserestes. Der Vergleich mit Literaturdaten [61] ergab eine Übereinstimmung mit 3-O-(α -L-Rhamnosyl)-quercetin (Quercitrin) (Abbildung 45).

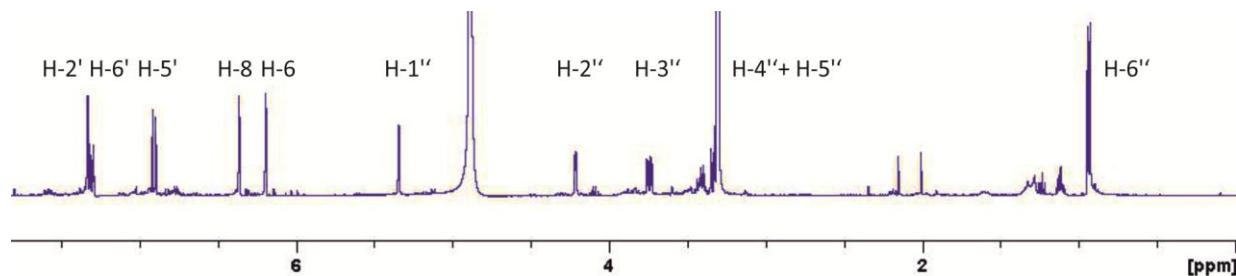


Abbildung 44: Ausschnitt des gemessenen ^1H -NMR-Spektrums (400 MHz, CD_3OD 99,8%, Verschiebung in ppm bezogen auf TMS, 295,3 K)

Tabelle 36: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten (400 MHz, 295,3 K, CD_3OD 99,8%), Chemische Verschiebung in ppm bezogen auf TMS als interner Standard

C	Shift δ_{H} [ppm] (Multiplizität)	Kopplungskonstante J [Hz]	Shift δ_{C} [ppm]
2			159,3
3			136,4
4			179,7
5			163,3
6	6,20 (d)	2,1	99,9
7			165,8
8	6,36 (d)	2,1	94,8
9			158,6
10			105,9
1'			122,9
2'	7,33 (d)	2,0	117,0
3'			146,5
4'			149,9
5'	6,90 (d)	8,2	116,4
6'	7,30 (dd)	2,1 ; 8,2	123,0
1''	5,34 (d)	1,5 (α -Konfiguration)	103,6
2''	4,21 (dd)	1,7 ; 3,3	72,1
3''	3,74 (dd)	3,4 ; 9,2	72,2
4''			73,3
5''	3,4 (m)	-	72,0
6''	0,93 (d)	6,0	17,7

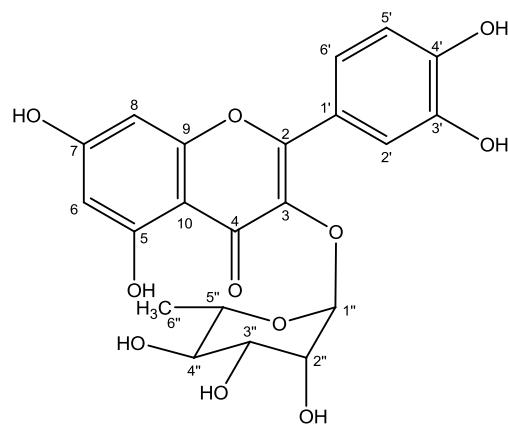


Abbildung 45: Strukturformel von Quercitrin [3-O-(α -L-Rhamnosyl)-quercetin]

Haariges Besenbeifußkraut 124

Um die genaue Verknüpfungsstelle des Zuckers zu bestimmen wurde ein 2D- ^1H , ^1H -NOESY Spektrum gemessen (Abbildung 46). Die Signale des B-Rings ($\text{H}-2'$, $\text{H}-5'$ und $\text{H}-6'$) zeigten eine deutliche Korrelation mit den Protonen des Rhamnosylrests ($\text{H}-2''$, $\text{H}-3''$, $\text{H}-4''$ und $\text{H}-5''$), was auf eine räumliche Nähe der beiden Strukturen und somit auf die Glykosylierung in Position 3 hinweist.

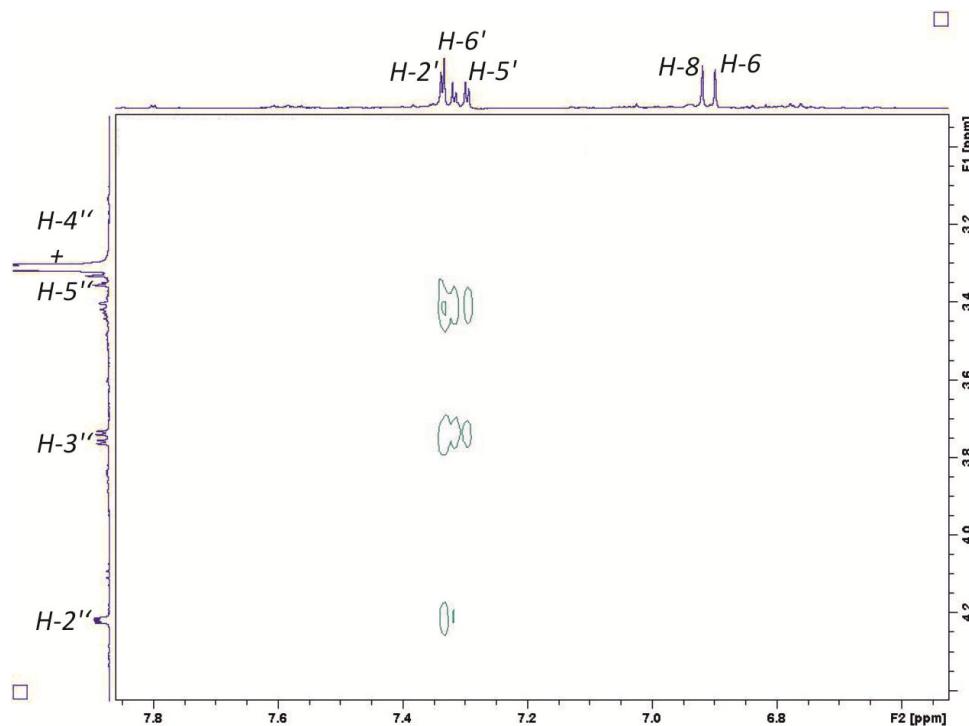


Abbildung 46: Ausschnitt aus dem ^1H , ^1H -NOESY-Spektrum von Quercitrin (400 MHz, 295,3 K, CD_3OD , Verschiebung in ppm bezogen auf TMS), Identifizierung der Verknüpfungsstelle des Zuckerrestes

4.12 Diskussion der Ergebnisse-Haariges Besenbeifußkraut

Die morphologische Untersuchung (4.3) verschiedener Proben von *Artemisiae scopariae herba*, die auf dem Markt erhältlich waren, zeigten wesentliche Unterschiede zwischen der in Bayern kultivierten Krautdroge und der aus China importierten Ware. Das bayerische Pflanzenmaterial besaß eine intensivere Grünfärbung, geringere Behaarung und eine eher linealische Blattform. Im Gegensatz dazu war die chinesische Droge hellgrün, weißlich behaart und wies eiförmig-lanzettliche Blätter auf. Um zu überprüfen, ob alle verwendeten *Artemisiae scopariae herba* Proben den beiden zugelassenen Stammpflanzen (*Artemisia capillaris* THUNB. und *Artemisia scoparia* WALDST ET KIT.) entsprachen, wurden sie auf Vergleichbarkeit genetischer Merkmale untersucht. Dazu wurde der Internal Transcribed Spacer ITS aus verschiedenen chinesischen und deutschen Proben isoliert, amplifiziert und mit Datenbankergebnissen verglichen (4.9). Die ITS Region ist ein Teil der nukleären ribosomalen DNA und wird häufig zur Ermittlung von Verwandtschaftsgraden verschiedener Spezies verwendet. Durch die geringe Anzahl an Basenpaaren bei Angiospermen, die Häufigkeit der Region im Genom und die Verwendung eines universellen Primers kann die ITS Region sehr gut amplifiziert werden und wird deshalb häufig bei taxonomischen Fragestellungen [107] und zur Identifizierung von pflanzlichen Drogenmaterial [108] verwendet.

Bei allen *Artemisiae scopariae herba* Proben konnte ein PCR-Produkt der gewünschten Größe erzielt werden und außer bei Proben der Firma Pharmachin, der Sequenz von *A. scoparia* zugeordnet werden. Die Probe des Lieferanten Pharmachin zeigte eine höhere Übereinstimmung zur Art *Artemisia japonica* THUNB., welche zur Section *Dracunculus* zählt und die am nächsten verwandte Art zu *A. capillaris* und *A. scoparia* darstellt [109]. Das bayerische Drogenmaterial weist demnach trotz gleichem Genotyp einen zum chinesischen Material unterschiedlichen Phänotyp auf, was auf eine phänotypische Plastizität [110] von *A. scoparia* und *A. capillaris* schließen lässt. Unterschiedliche abiotische Umweltfaktoren, das Fehlen oder Vorhandensein von Herbivoren, Parasiten und benachbarter Pflanzen kann Auswirkungen auf die Pflanzengröße, Ausprägung verschiedener Pflanzenorgane und Inhaltsstoffzusammensetzung haben [111]. Für exotische Pflanzen, die neue Lebensräume erschließen, sind diese Phänome beschrieben [112]. Nautiyal [113] publizierte bereits 1992 den Einfluss der Anbauhöhe (550 m bzw. 3600 m) auf die Blattlänge und –breite von

Artemisia scoparia. Zudem zeigten sich in derselben *Artemisia vulgaris* L. Population Kanadas Unterschiede in der Wachstumshöhe, Verzweigung und Blattform [114]. Die Droge aus bayerischen Herkünften kann demnach zur Erstellung der DAB Monographie für *Artemisiae scopariae herba* verwendet werden.

Um die Methode zur Identitätsbestimmung C von *Artemisiae scopariae herba* mittels Dünnschichtchromatographie zu etablieren, wurden verschiedene Fingerprintuntersuchungen der in der Pflanze vorhandenen Inhaltsstoffgruppen durchgeführt. Das Flavonoidglykosidmuster (4.5.1.1) machte einen Unterschied zwischen den beiden Anbauorten deutlich. Die bayerische Probe besaß eine zusätzliche orange fluoreszierende Bande bei $R_F = 0,5$ nach Derivatisierung mit Naturstoffreagenz. Nach Isolierung mit verschiedenen chromatographischen Techniken konnte die Struktur des Flavonoidglykosids als Quercitrin ($3-O-(\alpha-L\text{-Rhamnosyl})\text{-quercetin}$) aufgeklärt werden (4.11). Die $3-O-(\alpha-L\text{-Rhamnosyl})$ -Substitution des Quercetins konnte für *Artemisia scoparia* neu beschrieben werden, da bis jetzt nur eine $7-O-(\alpha-L\text{-Rhamnosyl})$ [76] und eine $3-O-(\beta-D\text{-Glucofuranosid})$ -Struktur [75] bekannt war. Wie erwartet verlief die Überprüfung auf Sesquiterpenlactone in *Artemisiae scopariae herba* ohne Erfolg (4.5.1.2) da sich, wie von Geismann [64] 1970 beschrieben, die Section *Dracunculus* durch das Fehlen von Sesquiterpenlactonen auszeichnet.

Diese Divergenz im Inhaltstoffspektrum zeigte sich auch im ätherischen Öl. Das Bandenmuster im HPTLC-Chromatogramm ergab eine unterschiedliche Zusammensetzung des ätherischen Öls (4.5.1.3). Eine unterschiedliche Zusammensetzung des Öls je nach Anbauort ist in der Literatur bekannt. Der Hautinhaltsstoff des ätherischen Öls von *A. scoparia* aus Indien wurde als γ -Terpinen and β -Myrcen [115], [116], [117], [118a] beschrieben, wohingegen verschiedene Chemotypen mit Campher [119], α -Thujon [120] oder Capillen [121] in Iran gefunden wurden. Im Vergleich zu den japanischen *A. capillaris* Proben, die einen homogenen Gehalt bis zu 80,2% [122], [123] enthielten, konnte in chinesischen *A. capillaris* und *A. scoparia* Proben nur maximal 8,63% an Capillen gefunden werden [124]. In einigen chinesischen Proben war kein Capillen, dafür Fettsäuren wie Palmitinsäure und (Z)- α -Bisaboleneoxid in großen Mengen vorhanden [125], [126], [127]. Der gemessene Gehalt an Capillen im ätherischen Öl könnte möglicherweise auch mit der Extraktionsart zusammenhängen. Demirci et al. konnten zeigen, dass die Verbindung im mit

Wasserdampf destillierten Öl, jedoch nicht mit Headspace-SPME nachweisbar war [60]. Darüber hinaus können der verwendete Pflanzenteil [103] und der Erntezeitpunkt [128] für die gefundene Capillenmenge entscheidend sein.

Um die durch DC-Untersuchungen erlangten Resultate zur Zusammensetzung des ätherischen Öls zu verifizieren, wurden zehn Proben aus chinesischem Import und acht Proben aus bayerischem Anbau destilliert und per GC-FID und GC-MS untersucht sowie die Inhaltsstoffe charakterisiert (4.10.3). Die acht Proben aus Bayern unterschieden sich im Anbauort. LfL 14 wurde in Straubing und das restlichen Material in Ingolstadt 2009 angebaut. Außerdem wurden die Proben aus drei verschiedenen Saatherkünften kultiviert: BLBP 01: LfL 14,17, BLBP 02: 19, 21 und BLBP 03: 18, 20. Zum Anbauort und Saatmaterial der chinesischen Droge konnten keine Informationen von Seiten der Importeure erhalten werden. Der Vergleich der beiden Herkunftsländer zeigte Unterschiede in einer Gruppe, aber auch zwischen den beiden Ländern. Um die komplexen Ergebnisse statistisch auszuwerten, wurden zwei Gruppen gebildet (China vs. Deutschland) und die einzelnen Substanzen miteinander durch *t*-Test für unabhängige Stichproben (*P* = 95%) verglichen. Signifikante Unterschiede ergaben sich einerseits bei den monocyclischen Monoterpenen, wie z. B. α - und γ -Terpinen, Limonen und *p*-Cymen und Sesquiterpenen vom Bisabolantyp (γ -und *ar-Curcumen*), welche vermehrt im deutschen Material auftraten, und andererseits bei Cadinantyp Sesquiterpenen (γ -Muurolen, δ - und γ -Cadinen, *T*- und α -Cadinol, *T*-Muurolol) sowie den Fettsäuren (Laurin-, Myristin und Palmitinsäure), die überwiegend in der chinesischen Droge zu finden waren. Da das deutsche Pflanzenmaterial nachweislich aus verschiedenem Saatgut stammte, können genetische Unterschiede zwischen den beiden Herkunftsländern als Grund für das unterschiedliche Inhaltsstoffmuster ausgeschlossen werden. Ökologische Einflußfaktoren auf den Sekundärstoffwechsel sind jedoch bei der Gattung *Artemisia* bekannt und gut untersucht [129], [130].

Während die Monographie von *Artemisiae scopariae herba* im ChP 2005 noch keine Identitätsbestimmung mittels Dünnschichtchromatographie beinhaltete, war sie in der neusten Version ChP 2010 in Frühjahrs- (Mianyinchen) und Herbstdroge (Huayinchen) mit unterschiedlichen Referenzsubstanzen gegliedert. Die Evaluierung der „Mianyinchen“ Vorschrift ergab, dass Chlorogensäure dazu geeignet war, *Artemisiae scopariae herba* von den Verfälschungen bzw. Verwechslungen *Origanum vulgare*, *Artemisia absinthium* und

Haariges Besenbeifußkraut 128

Artemisia annua zu unterscheiden. Darüber hinaus war die Markersubstanz in allen vorhandenen Proben enthalten, lediglich das Fließmittelsystem musste wegen seiner nicht miteinander mischbaren Komponenten überarbeitet werden (4.5.2.1). Im Vergleich dazu war die Methode zur Identifizierung von „Huayinchen“ nicht geeignet, da die Markersubstanz Scoparon in keiner Handelsprobe enthalten war (4.5.2.2). Von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft konnte eine authentische Herbstdroge erhalten werden. Dazu wurden *Artemisia scoparia* Pflanzen bis zum Herbst des laufenden Jahres kultiviert und dann geerntet. Wie der Name „Huayinchen“ vermuten lässt, (Hua bedeutet auf Chinesisch Blüte), ist der Blütenanteil der Herbstdroge deutlich erhöht. Die Probe LfL 125 zeichnete sich durch den höchsten Anteil an Blüten aus und besaß im DC-Chromatogramm eine deutliche Scoparon-Bande. Obwohl die Probe LfL 124 auch bis zum Herbst kultiviert wurde, lag der Blütenanteil deutlich geringer, und eine blau fluoreszierende Bande des Scoparons konnte ebenfalls nicht detektiert werden (4.5.4). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Chlorogensäure als analytischer Marker zur Identitätsbestimmung von *Artemisiae scopariae herba* gewählt und die Anwendbarkeit der im Ph. Eur 2012 existierenden Monographien mit Chlorogensäure als Marker (*Arnicae flos*, *Cynarae folium*, *Urticae folium*) untersucht (4.5.3.1). Das Fließmittelsystem der Droge *Cynarae folium* (Ph. Eur) zeigte die beste Trennung der Chlorogensäure-Bande zum Rest des Fingerprints, außerdem schien die Übertragung der DC- als auch der HPLC-Methode auf *Artemisiae scopariae herba* aufgrund der ähnlichen Beschaffenheit des Drogenpulvers möglich. Nach Validierung zeigte sich, dass das Fließmittelsystem in der *Cynarae folium* Monographie des Ph. Eur 2012 präzise, robuste und valide Ergebnisse lieferte und die Unterscheidung von *Artemisiae scopariae herba* und dessen Verfälschung und Verwechlungen ermöglichte.

Zur Gehaltsbestimmung von *Artemisiae scopariae herba* wurde analog der ChP 2010 „Mianyinchen“ Monographie [78] und der Ph. Eur 2012 Monographie von *Cynarae folium* [100] Chlorogensäure als analytischer Marker bestimmt (4.7). Die ChP 2010 Methode schien für eine DAB-Monographie nicht geeignet, da der Peak der Referenzsubstanz breit und unsymmetrisch war. Die Ph. Eur 2012 Methode von *Cynarae folium* zeichnete sich hingegen durch eine gute Auflösung und Peaksymmetrie aus. Aufgrund der unterschiedlichen Behaarung und somit Siebbarkeit der Krautdroge wurde die Methode mit einer chinesischen (Herkunft: Herbasinica) und einer bayerischen Probe (LfL 13) validiert. Bei beiden Proben ergab die HPLC Methode reproduzierbare, robuste und valide Ergebnisse. Der prozentuale

Gehalt an Chlorogensäure der vermessenen *Artemisiae scopariae herba* Proben lag zwischen 0,25-1,79%. Der höchste Anteil an Chlorogensäure war bei der deutschen Probe nachweisbar, was wahrscheinlich auf die geringere Behaarung zurückzuführen ist. Nach dem Zerkleinern und Sieben der Droge sind hier prozentual mehr Blatt- und Stängelanteile enthalten.

Für die DAB-Monographie von *Artemisiae scopariae herba* wurde ein Mindestgehalt an Chlorogensäure von 0,2% festgelegt. Park et al. [131] beschrieben eine Schwankung an Chlorogensäure von 0,13-1,19% je nach Anbauort und Erntezeit, weshalb der in der ChP 2010 geforderte Mindestgehalt von 0,5% für die Frühjahrsdroge auf 0,2% reduziert wurde.

Versuche, die Stammpflanze der verwendeten Drogenmuster anhand der DC und HPLC Fingerprintmethode entsprechend dem HKCMMS-Monographieentwurf zu bestimmen (4.8), scheiterten. Weder die blau fluoreszierende Bande im DC-Chromatogramm oberhalb von Chlorogensäure noch der HPLC-Fingerprint waren aufgrund fehlender R_f -Angaben und HPLC-Parameter eindeutig. Die Zuordnung zu einer bestimmten Stammpflanze kann somit nur aufgrund von Angaben des Importeurs erfolgen, was allerdings nicht bei allen Proben gegeben war (Tabelle 5). Ob es sich bei *Artemisia capillaris* und *Artemisia scoparia* um zwei verschiedene Arten, oder Synonyme handelt kann zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt werden. In der Flora of China [70] und der Flora of Pakistan [132] sind beide Arten genannt und Unterscheidungsmerkmale beschrieben mit der die geschnittene Droge jedoch nicht zu unterscheiden sind. Diese taxonomische Einteilung der beiden Arten wird allerdings nicht in allen Florenwerken angewendet. So werden in der Flowering plants of Nepal *A. scoparia* und *A. capillaris* als Synonym verwendet [133]. Da eine genaue taxonomische Einordnung beider Pflanzen zu diesem Zeitpunkt nicht möglich ist, werden beide als Stammpflanze für *Artemisiae scopariae herba* in der DAB Monographie zugelassen.

Haariges Besenbeifußkraut 130

5 Saposhnikoviawurzel

5.1 Einleitung

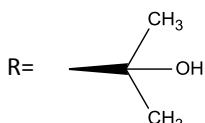
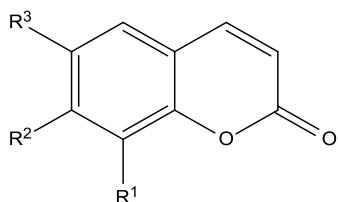
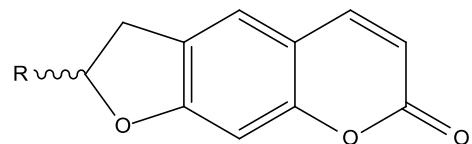
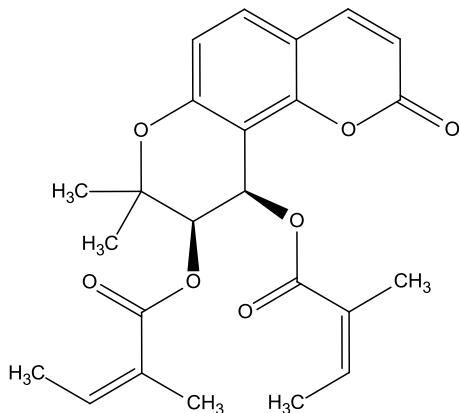
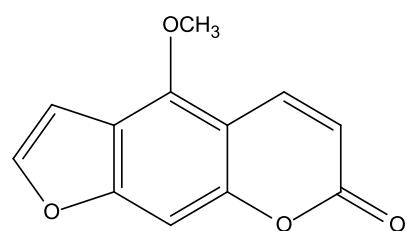
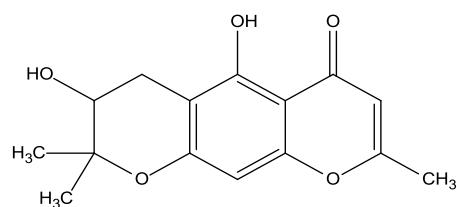
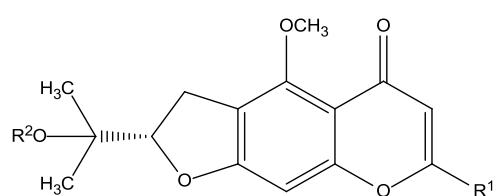
Saposhnikovia divaricata (TURCZ.) SCHISCHK. ist die einzige Art der Gattung *Saposhnikovia* SCHISCHK. und gehört zur Familie der Apiaceen, wobei auch *Ledebouriella divaricata* (TURCZ.) HIROE oder *Ledebouriella seseloides* (TURCZ.) WOLFF. als Synonym verwendet werden. Beheimatet ist *Saposhnikovia* SCHISCHK. im Nordosten Chinas sowie in Korea, der Mongolei und in Sibirien. Laut Besimmungsschlüssel der Flora of China [134] sind die Gattung *Saposhnikovia* SCHISCHK. und *Daucus* L. botanisch nur durch Fehlen bzw. Vorhanden sein von Stacheln am Stängel zu unterscheiden, weshalb *Daucus carota* L. auch als Verfälschung von *Saposhnikoviae radix* in der Materia Medica genannt wird.

Die direkte Übersetzung des chinesischen Namens der Droge *Saposhnikoviae divaricatae radix* „Fang feng“ ins Deutsche bedeutet „Schutz gegen Wind“ oder „Windvorbeugendes Kraut“, was einen direkten Bezug zur Anwendung der Droge aufweist [16]. Als Indikation werden in der Materia Medica [135] und dem ChP 2010 [136] Erkältung, Kopfschmerzen, Schüttelfrost und rheumatoide Arthritis genannt, welche zu den Windsymptomen gezählt werden. Die Wurzeldroge gehört zu den prominentesten Drogen der TCM, da sie ein großes Wirkprofil gegen inflammatorische Erkrankungen besitzt [137].

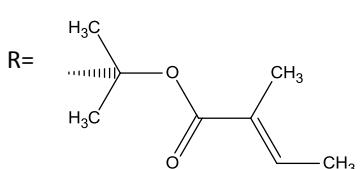
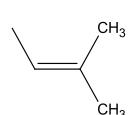
Als Inhaltstoffe finden sich ätherisches Öl mit Polyacetylenen wie Falcarinol, 0,7% Gesamtcumarine, 1,0% Gesamtchromone [138] und Polysaccharide [135]. Die Cumarine gliedern sich in lineare Dihydrofuranocumarine (Deltoin, Nodakenetin), lineare Furanocumarine (Bergapten), Pyranocumarine (Anomalin) und einfachere Cumarine wie Ostenol und Fraxidin. Bei den Chromonen wurden ebenfalls 2 verschiedene Typen isoliert: lineare Dihydrofuranochromone (Cimifugin, *Prim-O-glucosylcimifugin*, 5-O-Methylvisamminol, 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol) und lineare Dihydropyranochromone (Hamaudol) [139], [140].



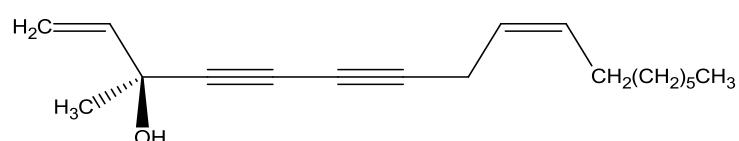
Abbildung 47: Illustration von *Saposhnikovia divaricata* (TURCZ.) SCHISCHK; 1: Seitenansicht des Stängels und der Wurzel, 2: Ast mit Blatt, 3: Seitenansicht der blühenden und fruchtenden oberirdischen Teile, 4: Vorblatt, 5: Blüte, 6: Kronblatt, 7: Frucht-Doppelachäne, 8: Achäne, 9: Querschnitt durch eine Achäne [141]



Nodakenetin

 $\text{R}^1=\text{OH}$ $\text{R}^2=\text{OCH}_3 \quad \text{R}^3=\text{OCH}_3$  $\text{R}^1=$  $\text{R}^2=\text{OH}$ $\text{R}^3=\text{H}$

Ostenol

Abbildung 48: Inhaltsstoffe von *Saposhnikoviae divaricatae radix*

Saposhnikoviawurzel 134

Der analgetische Effekt von *Saposhnikoviae divaricatae radix* wurde im Tiermodell bewiesen. Die Cumarine, Chromone und deren Glucoside wurden als wirksamkeitsbestimmend identifiziert [142]. *Prim-O-glucosylcimifugin* und *4'-O-β-D-Glucosyl-5-O-methylvisamminol* zeigten sowohl analgetische und antipyretische als auch antiinflammatorische Aktivität in verschiedenen Rattenmodellen [143], [144]. Sie werden daher als aktive Substanzen zur Behandlung von Erkältung, Kopfschmerzen und rheumatoide Arthritis postuliert. Der klinische Effekt von *Saposhnikoviae divaricatae radix* konnte jedoch bis jetzt nur als Bestandteil einer Rezeptur gegen Schmerzen im unteren Rückenbereich nachgewiesen werden [16].

Die immunmodulatorische Eigenschaften der sauren Polysaccharide *Saposhnikovan A* und *C* auf das retikuloendotheliale System könnten zur Wirksamkeit bei Erkältungserkrankungen beitragen, wurden jedoch nicht weiter untersucht [145].

Falcarinol, einer der Hauptbestandteile des ätherischen Öls von *Saposhnikoviae divaricatae radix* [146], wurde ebenfalls pharmakologisch untersucht und zeigte eine Hemmung der Thromboxan B₂ Bildung in Blutplättchen [147] sowie von Tumorzellwachstum [148]. Darüber hinaus wurde zudem die Hemmung von induzierbarer NO-Synthase durch Polyacetylenen, darunter auch *Falcarinol* und die strukturverwandten Verbindungen *Falcarinon* und *Falcarindiol*, aus *Saposhnikoviae divaricata* (TURCZ.) SCHISCHK und *Panax quinquefolium* L. beschrieben.

5.2 Methoden

5.2.1 Dünnschichtchromatographie

Tabelle 37: Methoden zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung von *Saposhnikoviae divaricatae radix*

Methode	Herstellung Testlösung	Herstellung Referenzlösung	Fließmittel	Entwicklungsstrecke	Applikationsvolumen
Ätherisches Öl	Destilliertes ätherisches Öl	-	Dichlormethan	6 cm	5 µl
Chromonglycoside: ChP 2010	1,0 g gepulverte Droge (355) wurde mit 20 ml Aceton versetzt, 20 min im Ultraschallbad extrahiert, filtriert und bis zur Trockene eingedampft. Danach wurde der Überstand in 1 ml Ethanol aufgenommen.	1 mg PC und 1 mg MV in jeweils 10 ml MeOH	CHCl ₃ , MeOH (4:1)	6 cm	7 µl
Chromonglycoside: Neu entwickelte Methode- Identität	1,0 g gepulverte Droge (355) wurde mit 10 ml MeOH versetzt, 30 min im Ultraschallbad extrahiert und anschließend zentrifugiert oder gefiltert. Der Überstand wurde als Testlösung verwendet.	1 mg PC und 1 mg MV in jeweils 10 ml MeOH	Dichlormethan, MeOH, ACN (4:2:1)	6 cm	7 µl

Saposhnikoviawurzel 136

Chromonglucoside: Neu entwickelte Methode- Gehaltsbestimmung	0,500 g pulverisierte Droge (355) wurden mit 10,0 ml MeOH versetzt. Die Mischung wurde 30 min lang im Wasserbad von 70 °C unter Rückflusskühlung erhitzt. Die Lösung wurde in einen 10 ml-Messkolben filtriert und mit MeOH zu 10,0 ml aufgefüllt.	PC und MV-siehe Kalibriergerade	Dichlormethan, MeOH, ACN (4:2:1)	6 cm	4 µl
--	--	---------------------------------	----------------------------------	------	------

5.2.2 Flüssigkeitschromatographie

Tabelle 38: Methoden zur flüssigkeitschromatographischen Untersuchung von *Saposhnikoviae divaricatae radix*

Methode	Herstellung Testlösung	Fließmittel, Flussrate	Säule, Temperatur	Detektion	Injektions- volumen
Methode nach ChP 2010	0,25 g pulverisierte (355) Droge wurden mit 10 ml MeOH unter Reflux für 2 h extrahiert, filtriert und auf 10 ml mit MeOH aufgefüllt	A: H ₂ O, B: MeOH 60% A, isokratisch, 1,0 ml/min	RP-18, 250 x 4,0 5 µm, 25 °C	254 nm	2 µl
Methode nach Xin et al. [149]	0,5 g pulverisierte (355) Droge wurden mit 10 ml MeOH für 30 min unter Rückfluss bei 70 °C extrahiert, filtriert und auf 10 ml mit MeOH aufgefüllt.	A: H ₂ O, B: MeOH 0-5 min: 60-65% A, 5- 20 min 45-35% A, 1,0 ml/min	RP-18, 250 x 4,0 5 µm, 35 °C	300 nm	10 µl
Neu entwickelte Methode	0,5 g pulverisierte (355) Droge wurden mit 10 ml MeOH für 30 min unter Rückfluss bei 70 °C extrahiert, filtriert und auf 10 ml mit MeOH aufgefüllt.	A: H ₂ O, B: MeOH 0-5 min: 60-65% A, 5- 20 min 45-35% 1,0 ml/min	RP-18, 250 x 4,0 5 µm, 35 °C	300 nm	10 µl

5.3 Makroskopische Beschreibung

Die geschnittene Wurzel zeigt eine rissige hell- bis dunkelbraun Rinde (Abbildung 49). Der Holzteil ist blassgelb (Abbildung 50). Die raue graubraune Oberfläche weist längsverlaufende Furchen, manche quer gestellt sowie lang gestreckte Poren und erhabene Wurzelnarben auf. Am Wurzelstock sind deutlich ausgeprägte, konzentrische Ringe erkennbar, auf denen häufig haarförmige, dunkelbraune Blattscheidenreste sitzen (Abbildung 50, Abbildung 51). Die chinesische Ware besteht aus dunkelbraunen, quergeschnittenen Wurzelstücken, die zwischen 0,2-3,0 cm lang und 0,5-3,0 cm breit sind. Die in Deutschland angebaute Ware weist eine deutlich hellere Färbung und längere Wurzelstücke von 1,0-10,0 cm auf (Abbildung 52).



Abbildung 49: Chinesischer Import (Arobomed)



Abbildung 50: Chinesischer Import (CaeLo)



Abbildung 51: Chinesischer Import (Herbasinica)



Abbildung 52: Deutscher Anbau

5.4 Mikroskopische Beschreibung

Die pulverisierte Droge wurde gesiebt (Sieb mit 355 µm Maschenweite, [53]) und mit Chloralhydrat-Lösung R aufgehellt. Das hellbraune Pulver weist Korkfragmente (Abbildung 53) und Ölgänge (Abbildung 54) mit Durchmesser von 17-60 µm, gefüllt mit gelbem Öl, auf. Außerdem finden sich Netztracheiden (Abbildung 55) mit einem Durchmesser von 14-85 µm, die häufig von Faserbündeln begleitet sind. Teilweise finden sich gelbe langgestreckte oder rechteckige Sklereiden mit mäßig verdickter Zellwand.

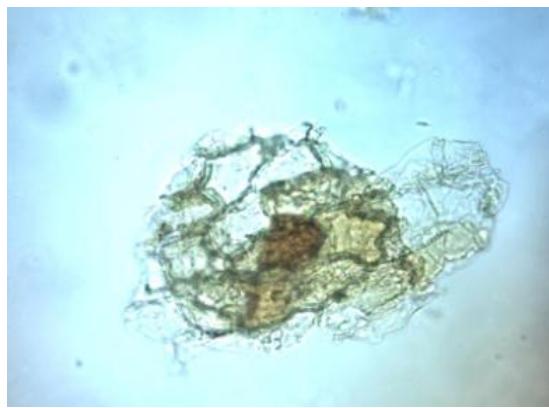


Abbildung 53: Korkfragment, 200-fache Vergrößerung

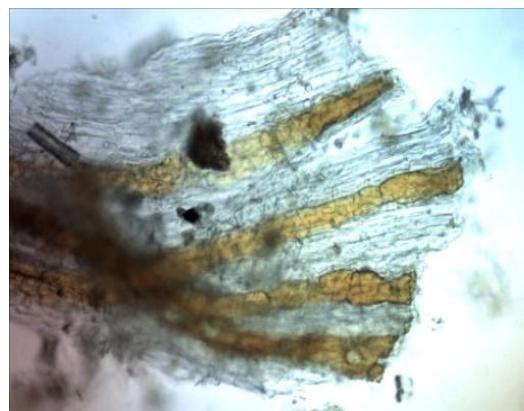


Abbildung 54: Ölgänge mit gelbem Öl, 100-fache Vergrößerung

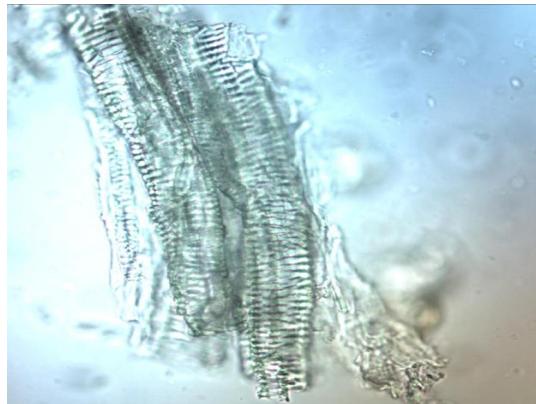


Abbildung 55: Leitgewebe, 200-fache Vergrößerung

5.5 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

5.5.1 Untersuchung verschiedener Fingerprints

Um eine dünnschichtchromatographische Identitätsmethode für Saposhnikoviae divaricatae radix zu etablieren, wurde das Spektrum der Hauptinhaltsstoffe (ätherisches Öl mit Polyacetylenen und Cumarinen [135]) mittels DC-Fingerprinting untersucht.

5.5.1.1 Ätherisches Öl: Nachweis von Panaxynol

Um den Fingerprint des Ätherischen Öls zu untersuchen, wurde das destillierte ätherische Öl nach Methode Tabelle 37 (Ätherisches Öl) chromatographiert und mit Anisaldehydreagenz derivatisiert. Die braune Bande (Abbildung 56) unter 366 nm bei $R_F = 0,35$ schien eine der Hauptkomponente des ätherischen Öls von Saposhnikoviae divaricatae radix zu sein, was auf die Substanz Panaxynol [146] hindeutete. Panaxynol, oder Falcarinol genannt, ist ein Bestandteil des ätherischen Öls vieler Apiaceen [150], so auch der Wurzel der wilden Möhre *Daucus carotae* radix, und konnte somit nicht zur Unterscheidung von Saposhnikoviae divaricatae radix und deren Verfälschungen (*Carum carvi* radix, *Daucus carotae* radix und *Seseli mairei* radix [135]) als Markersubstanz verwendet werden.

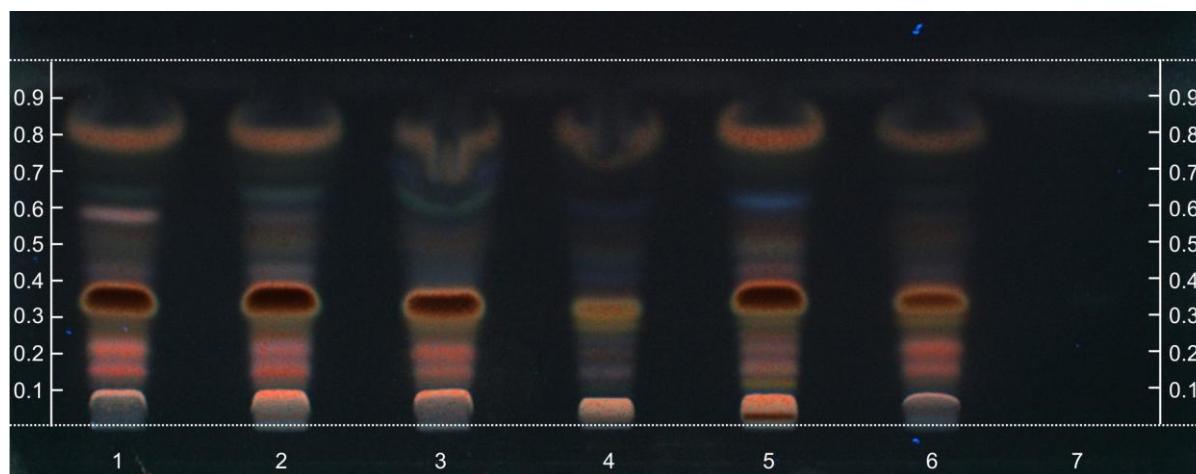


Abbildung 56: Fingerprint-ätherisches Öl; Bahn 1-3, 6, 7: Ätherisches Öl destilliert aus Saposhnikoviae divaricatae radix Proben chinesischer Import, 5 µl; Bahn 4, 5: Ätherisches Öl destilliert aus Saposhnikoviae divaricatae radix Proben bayerischer Anbau 2006 bzw. 2010, 5 µl; FM: Dichlormethan, Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, 366 nm

Um zu evaluieren, ob es sich bei der braunen Bande um Falcarinol handelte, das laut Deng et al. [151] auch zur Qualitätskontrolle und Markersubstanz für den Anbauort Ganshu, Sichuan, Yunnan oder Neimeng verwendet werden kann, wobei Neimeng den höchsten Gehalt aufweist und als beste Droge angesehen wird, wurde die Zone mittels TLC-MS Interface von der Platte abgesaugt und vermessen (5.8.2).

5.5.1.2 ChP 2010: Chromonglucoside als Markersubstanzen

In der Monographie von *Saposhnikovia divaricata* im ChP 2010 [136] werden 2 Chromonglucoside (Prim-O-Glucosylcimifugin PC und 4'- β -D-Glucosyl-5-O-methylvisamminol MV) als Markersubstanz verwendet. Zur Überprüfung wurden 6 Proben aus chinesischem Import, eine Probe aus bayerischer Herkunft als auch die 3 Verfälschungen der Droge nach Methode Tabelle 37 (Chromonglucoside ChP 2010) extrahiert, chromatographiert und bei 366 nm ausgewertet.

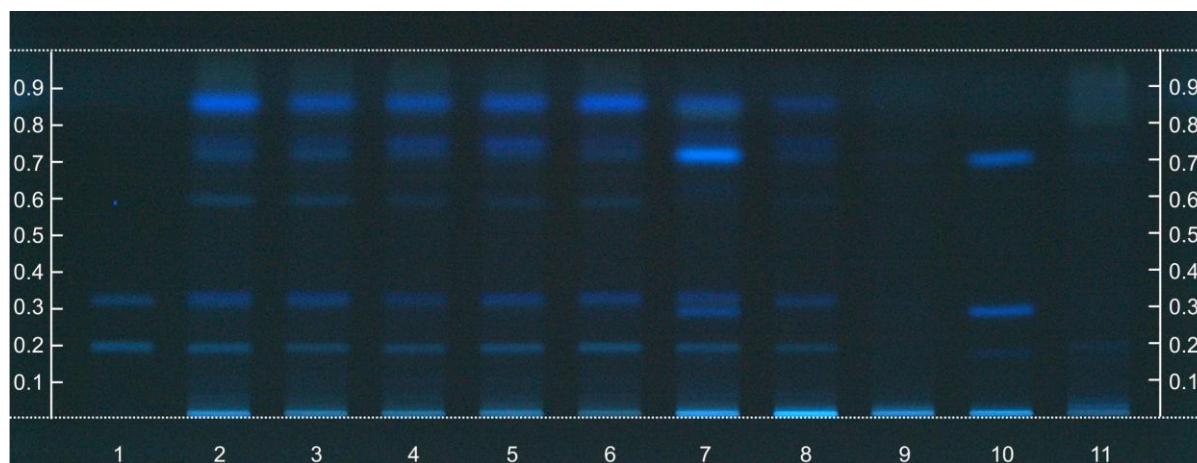


Abbildung 57: Fingerprint-Chromonglucoside ChP 2010; Bahn 1: Referenzsubstanzen: MV, PC, jeweils 7 µl; Bahn 2-6, 8: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt aus chinesischem Import, 7 µl, Bahn 7: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt aus deutschem Anbau, 7 µl, Bahn 9-11: Extrakte der Verfälschungen: Kummelwurzel, Wurzel der wilden Möhre, *Seseli mairei radix*, 7 µl; FM: Chloroform, Methanol (4:1), Entwicklungsstrecke: 6 cm, 366 nm

Die beiden Referenzsubstanzen (Bahn 1) PC ($R_F = 0,20$) und MV ($R_F = 0,32$) ergaben scharfe blau fluoreszierende Banden (Abbildung 57), die gut voneinander getrennt und in allen Handelsproben, aber nicht in den Verfälschungen vorhanden waren. Das Pflanzenmaterial aus China (Bahn 2-6, 8) ergab ein ähnliches Bandenspektrum, lediglich das Material aus Bayern besaß eine zusätzliche blau fluoreszierende Bande bei $R_F = 0,30$ analog der Verfälschung *Daucus carota* (Bahn 10). Um auszuschließen, dass es sich um eine generelle Untermischung der wilden Möhre bei den Proben aus deutschem Anbau handelt, wurden weitere Proben untersucht (5.9.1). Die beiden Chromonglucoside PC und MV sind nach ChP 2010 als Markersubstanz verwendbar, jedoch muss das dort aufgeführte chloroformhaltige Fließmittel auf Grund seiner Toxizität [152] optimiert werden.

5.5.1.3 Fließmittelloptimierung der DC-Trennung

Verschiedene Versuche zum Ersatz von CHCl_3 im Fließmittelsystem des ChP2010 ergaben eine gute Trennung der beiden Markersubstanzen im Rahmen des Fingerprints von *Saposhnikoviae divaricatae radix* und *Daucus carotae radix* bei Verwendung von

Saposhnikoviawurzel 142

Dichlormethan, MeOH, ACN (4:2:1). Außerdem konnte die aufwendige Extraktionsmethode der ChP 2010 Monographie (Ultraschallbad, zur Trockene eindampfen, auflösen) durch einen einzigen Extraktionsschritt (Ultraschallbad) ersetzt werden. PC und MV zeigten mit den neu entwickelten Fließmittelsystem jeweils eine blau fluoreszierende Bande bei RF = 0,41 bzw 0,51 (Abbildung 58).

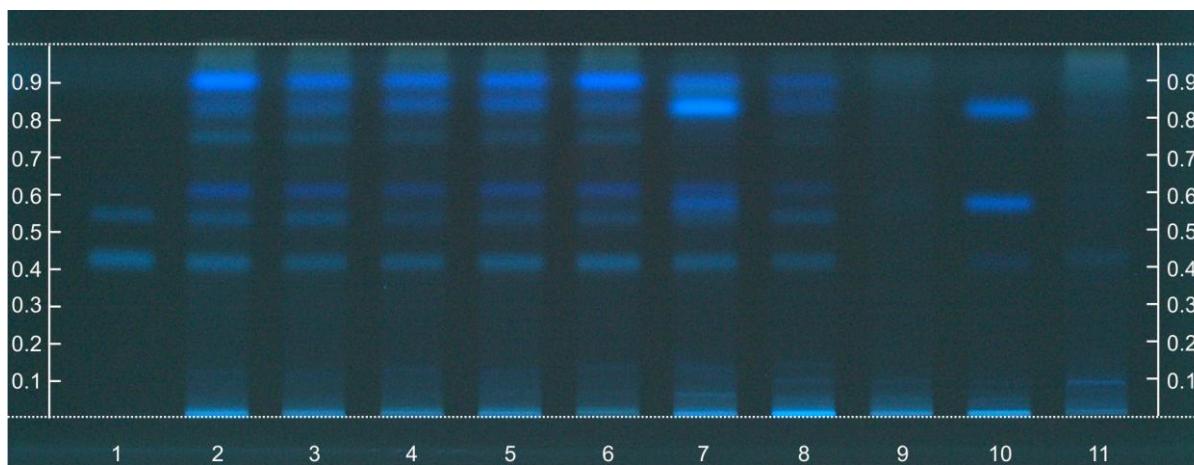


Abbildung 58: Fingerprint-Chromonglucoside Fließmitteloptimierung; Bahn 1: Referenzsubstanzen: MV, PC, jeweils 7 µl; Bahn 2-6, 8: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt aus chinesischem Import, 7 µl, Bahn 7: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt aus deutschem Anbau, 7 µl, Bahn 9-11: Extrakte der Verfälschungen: Kümmelwurzel, Wurzel der wilden Möhre, Seseli mairei radix, 7 µl; FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke: 6 cm, 366 nm

5.5.1.4 Validierung

Um zu sicher zu stellen, dass das neu entwickelte Fließmittelsystem (Tabelle 37 Chromonglucoside: Neu entwickelte Methode-Identität) für *Saposhnikoviae divaricatae radix* valide Ergebnisse lieferte wurde die DC-Identitätsmethode nach dem Validierungsprotokoll 3.6.10 validiert.

5.5.1.4.1 Stabilität der Testlösung während der Chromatographie

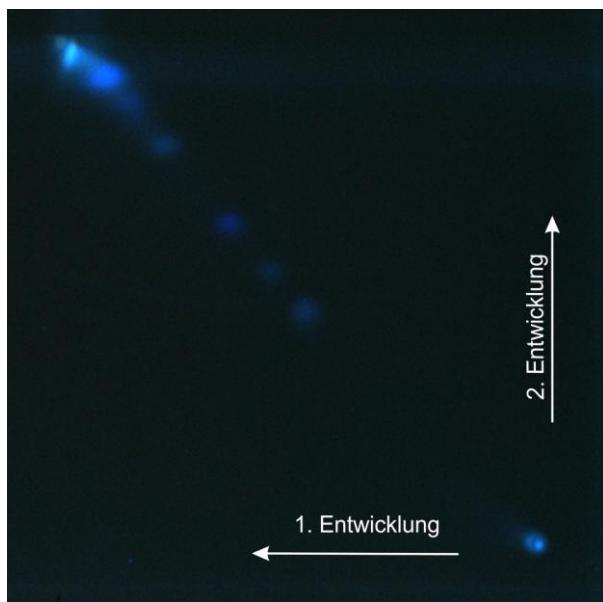


Abbildung 59: 2D-Chromatogramm von *Saposhnikoviae divaricatae radix*, 2 µl Testlösung, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

Eine authentische Handelsprobe aus chinesischer Herkunft wurde extrahiert und 2 µl der Testlösung punktförmig an dem rechten unteren Plattenrand einer 10 x 10 cm Platte (1 cm von jedem Ende) aufgetragen. Die Platte wurde entwickelt und getrocknet. Nach der ersten Entwicklung wurde die Platte um 90° gedreht, nochmals mit frischem Fließmittel entwickelt und bei 366 nm dokumentiert. Alle Banden des Fingerprints waren auf der Diagonale zwischen dem Auftragepunkt und dem Schnittpunkt der beiden Fließmittelfronten zu finden (Abbildung 59). Somit waren die Analyten des Extraktes während der Chromatographie stabil.

5.5.1.4.2 Stabilität der Testlösung in Lösung und auf der Platte

Eine authentische Handelsdroge wurde extrahiert und 7,5 µl auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Danach wurde die Platte in Alufolie eingewickelt und mit der Testlösung 3 h bei Raumtemperatur gelagert. Dieselbe Droge wurde nochmals extrahiert und ebenfalls auf dieselbe Platte aufgetragen. Nach der Chromatographie zeigten sich bei 366 nm keine Veränderungen in Lage und Intensität des Fingerprints (Abbildung 60).

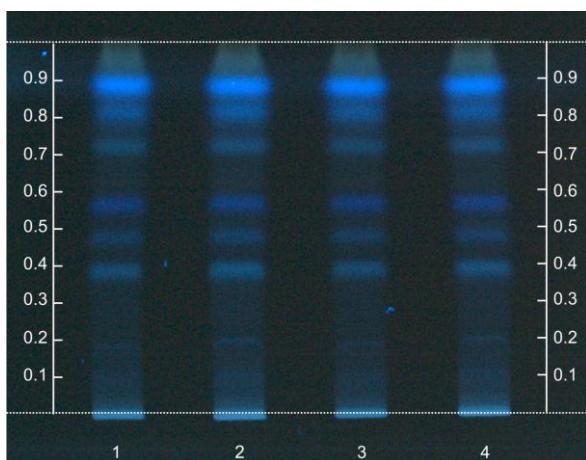


Abbildung 60: Stabilität auf der Platte und in Lösung, Bahn 1: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt 3 h auf der Platte, Bahn 2, 3: frischer *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt, Bahn 4: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt 3 h in Lösung jeweils 7,5 µl, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

5.5.1.4.3 Stabilität der Ergebnisse

Um die Stabilität der Ergebnisse zu beurteilen, wurde die HPTLC direkt nach der Entwicklung, nach 5, 10, 15, 30 und 60 min dokumentiert. Die Ergebnisse waren stabil, da sich auch nach 60 min (Abbildung 61) keine Unterschiede bezüglich der Lage und Intensität der Banden zeigten. Oberhalb der MV Bande (Bahn 1) bei $R_F = 0,6$ war eine zweite blaue fluoreszierende Bande erkennbar. Die Bande entstand nicht durch Artefaktbildung während der Chromatographie, was durch ein 2D-Chromatogramm der Reinsubstanz (Phytolab, PC 1) ausgeschlossen wurde. Eventuell handelt es sich dabei um eine Verunreinigung durch den Extraktionsprozess aus dem Drogenmaterial, da dieselbe Bande auch in den Handelsdrogen (Bahn 1-8) vorhanden ist. Die Rückfrage bei Phytolab ergab, dass die Referenz bei der internen Analyse im Zuge der Qualitätskontrolle weder im HPLC-Chromatogramm noch im ^1H - und ^{13}C -NMR zusätzliche Signale zeigte. Um zu evaluieren, ob die blaue Bande oberhalb der MV Bande im HPTLC-Chromatogramm immer zu finden ist, wurde weitere Probe der Referenz MV bei einem weiteren Anbieter (Cfm Oskar Tropitzsch E.K., PC 2) erworben. Die neue Referenzprobe der Firma Cfm zeigte jedoch eine andere Verunreinigung, eine blaue fluoreszierende Bande mit demselben R_F -Wert wie PC. Zur weiteren Validierung der Identitäts- und Gehaltsbestimmung wurde deshalb die kommerzielle Referenzsubstanz der Firma Phytolab (Reinheit 96%) verwendet.

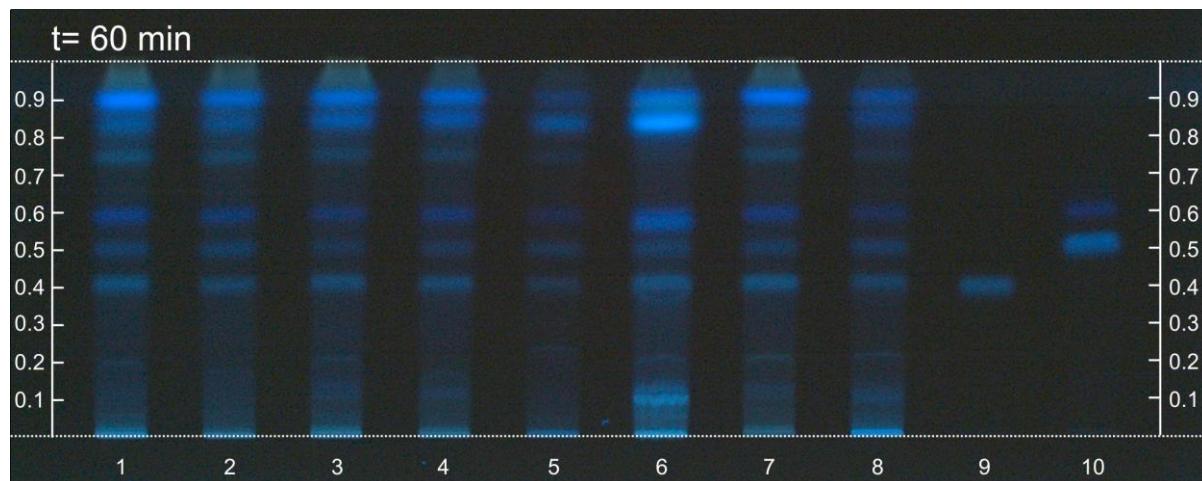


Abbildung 61: Stabilität der Derivatisierung nach $t = 60$ min; Bahn 1-4, 7, 8: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt aus chinesischem Import jeweils 7,5 µl; Bahn 6, 8: *Saposhnikoviae divaricatae radix* aus deutscher Herkunft, Anbau 2006, 2010 7,5 µl; Bahn 9, 10: Referenzsubstanzen: PC und MV, jeweils 7,5 µl, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

5.5.1.4.4 Spezifität

5.5.1.4.4.1 HPTLC-Identifizierung von *Saposhnikoviae divaricatae radix* Proben durch Vergleich mit authentischen Drogenproben und Referenzsubstanzen

Mehrere Muster von *Saposhnikoviae divaricatae radix* aus deutschen und chinesischen Herkünften wurden extrahiert und zusammen mit den Referenzlösungen chromatographiert. Die entwickelte Methode ergab für alle Proben einen ähnlichen Fingerprint bei 366 nm mit guter Auflösung zwischen den beiden Markersubstanzen PC und MV bei $R_F = 0,39$ bzw. $R_F = 0,49$ und den restlichen Substanzen der Testlösung (Abbildung 62).

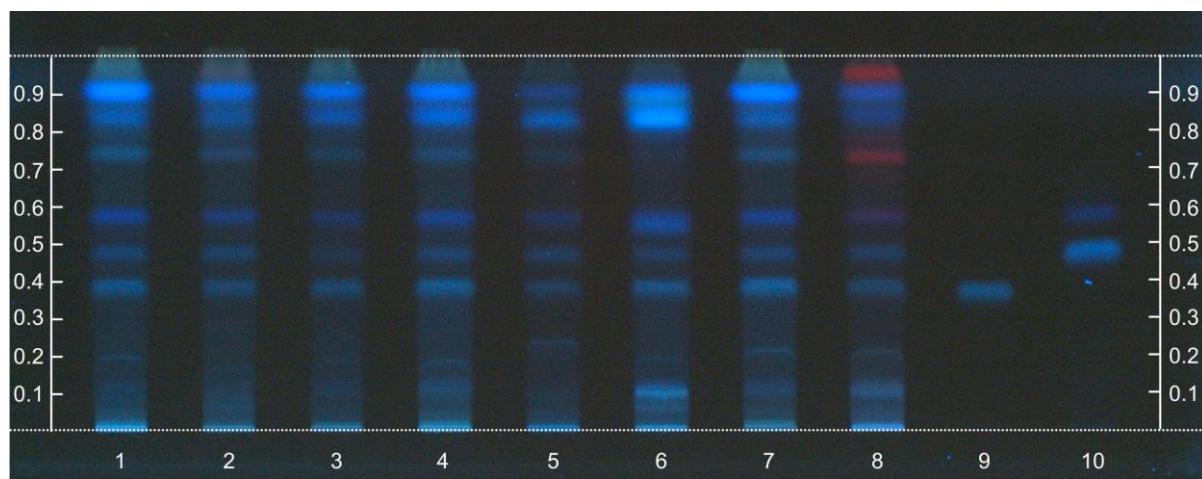


Abbildung 62: Spezifität; Bahn 1-4, 7, 8: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt aus chinesischem Import jeweils 7,5 µl; Bahn 6, 8: *Saposhnikoviae divaricatae radix* aus deutscher Herkunft, Anbau 2006, 2010 7,5 µl; Bahn 9, 10: Referenzsubstanzen: PC und MV, jeweils 7,5 µl, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

5.5.1.4.4.2 Detektion von Verfälschungen

Die Wurzeln von *Carum carvi*, *Daucus carota* (Verfälschungen [135a]) und *Seseli mairei* (lokale Varietät, die in Yunnan alternativ zu *Saposhnikovia divaricata* verwendet wird [135a]) wurden analog zu den Handelsproben extrahiert und chromatographiert. Die Methode war spezifisch für *Saposhnikoviae divaricatae radix*, da weder die Verfälschung noch die lokale Varietät die blau fluoreszierende Bande bei UV 366 nm auf Höhe von PC und MV aufwiesen (Abbildung 63). Darüber hinaus zeigte *Daucus carota radix* eine blau fluoreszierende Bande bei RF = 0,55, die im Fingerprint der *Saposhnikoviae divaricatae radix* Proben nicht vorhanden war. Eine Unterscheidung zwischen *Saposhnikoviae divaricatae radix* und dessen Verfälschungen ist mit dem Fließmittelsystem somit möglich.

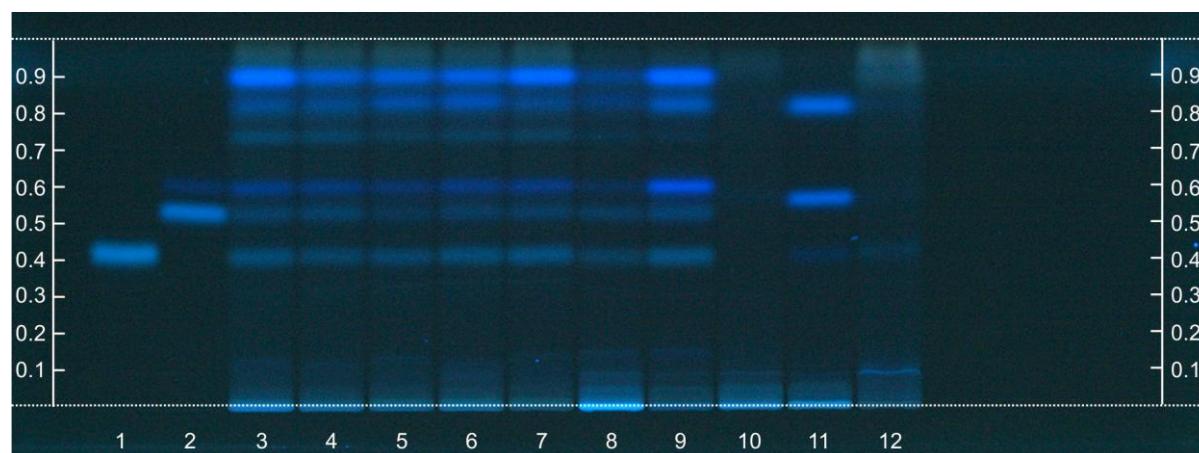


Abbildung 63: Detektion von Verfälschungen; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen PC, MV jeweils 7,5 µl; Bahn 3-7, 9: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt aus chinesischem Import jeweils 7,5 µl; Bahn 8: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt aus deutscher Herkunft, jeweils 7,5 µl; Bahn 10-12: Extrakte der Verwechslung/ Verfälschung *Carum carvi* Wurzel, *Daucus carota* Wurzel, *Seseli mairei* Wurzel, jeweils 7,5 µl; FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

5.5.1.4.5 Wiederholpräzision

Die Proben aus den zwei verschiedenen Herkünften wurden dreimal eingewogen, extrahiert und mit jeweils frischem Fließmittel chromatographiert (Abbildung 64). Der mittlere R_F -Wert der Markersubstanzen PC und MV wurde bei 366 nm ermittelt. Die neu entwickelte Methode zeigte dreimal an einem Tag (Tabelle 39) homogene Werte, die um weniger als 0,03 R_F -Einheiten schwankten. Die Lage und Intensität aller Banden im Fingerprint waren identisch. Der Test auf Wiederholpräzision wurde akzeptiert.

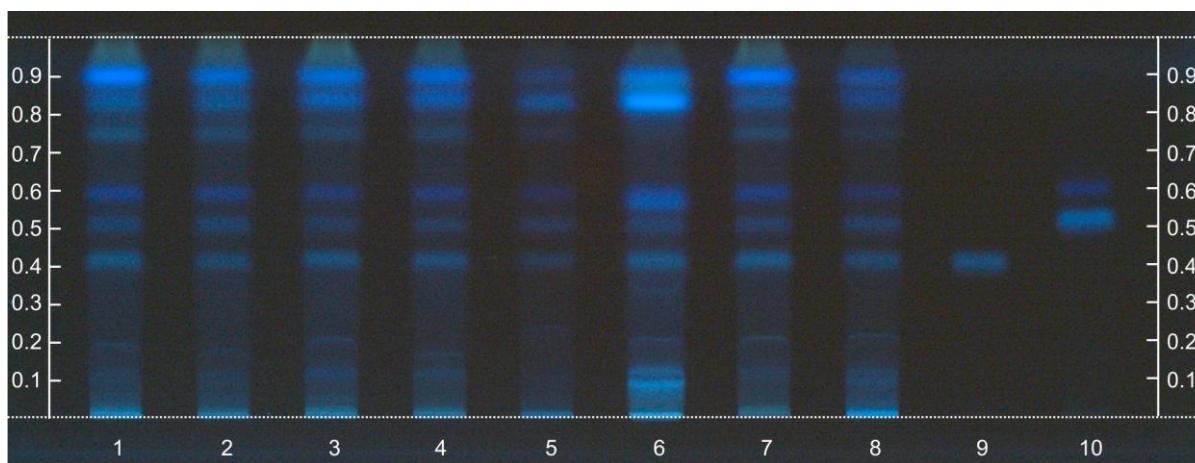


Abbildung 64: Wiederholpräzision Platte Saposhnikovia_20120214_01; Bahn 1-4, 7, 8: Saposhnikoviae divaricatae radix Extrakt aus chinesischem Import jeweils 7,5 µl; Bahn 6, 8: Saposhnikoviae divaricatae radix aus deutscher Herkunft, Anbau 2006, 2010 7,5 µl; Bahn 9, 10: Referenzsubstanzen: PC und MV, jeweils 7,5 µl, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

Tabelle 39: Ergebnisse der Wiederholpräzision der Prüfung auf Identität von Saposhnikoviae divaricatae radix durch HPTLC-Fingerprint

R_F	20120214_01	20120214_02	20120214_03	ΔR_F
PC	0,41	0,39	0,40	0,02
MV	0,51	0,50	0,51	0,01

5.5.1.4.6 Laborpräzision

Bei der Überprüfung der Laborpräzision werden die verschiedenen Proben an drei aufeinanderfolgenden Tagen unabhängig voneinander eingewogen, extrahiert und mit frischem Fließmittel entwickelt. Der Test auf Laborpräzision wurde akzeptiert, da sich bei 366 nm keine Änderung der Intensität und Lage der Banden von PC und MV (Abbildung 65) ergab, die mehr als 0,05 R_F -Einheiten (Tabelle 40) betrug.

Saposhnikoviawurzel 148

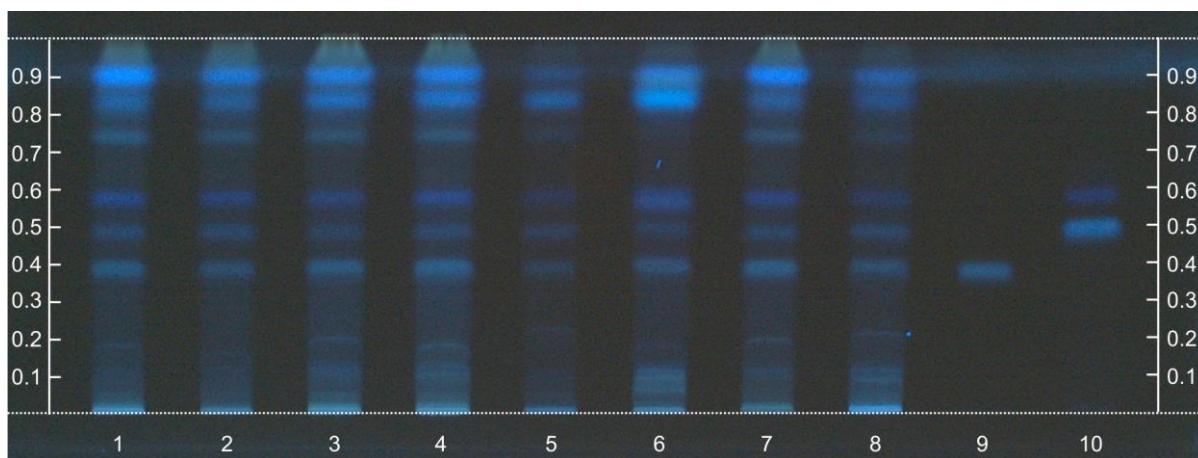


Abbildung 65: Laborpräzision, Platte Saposhnikovia_20120214_01; Bahn 1-4, 7, 8: Saposhnikoviae divaricatae radix Extrakt aus chinesischem Import jeweils 7,5 µl; Bahn 6, 8: Saposhnikoviae divaricatae radix aus deutscher Herkunft, Anbau 2006, 2010 7,5 µl; Bahn 9, 10: Referenzsubstanzen: PC und MV, jeweils 7,5 µl, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

Tabelle 40: Ergebnisse der Laborpräzision der Prüfung auf Identität von Saposhnikoviae divaricatae radix durch HPTLC-Fingerprint

R_F	20120213_01	20120214_01	20120215_03	ΔR_F
PC	0,39	0,41	0,38	0,03
MV	0,50	0,51	0,49	0,03

5.5.1.4.7 Robustheit

5.5.1.4.7.1 Verschiedener Kammer-/Platten-Typ

HPTLC-Platten wurden durch DC-Platten ersetzt, die in einer Flachbodenkammer bis zu einer Laufstrecke von 10 cm entwickelt (Abbildung 66) und bei 366 nm ausgewertet wurden. Die Lage der Banden und die Farbintensität wurden mit der ersten Platte der Wiederholpräzision (Saposhnikovia_20120214_01) verglichen (Tabelle 41). Die R_F -Werte der Referenzsubstanzen PC und MV zeigten eine Abweichung von weniger als 0,06 R_F -Einheiten. Damit kann die Methode sowohl mit HPTLC als auch mit DC-Platten in unterschiedlichen Kammern durchgeführt werden.

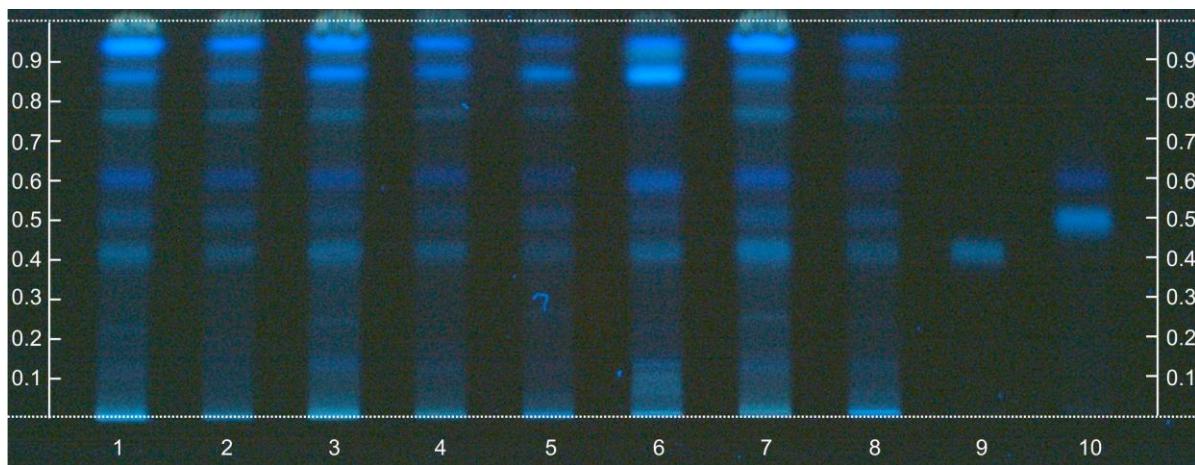


Abbildung 66: Robustheit Kammer/DC-Platte; Bahn 1-4, 7, 8: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt aus chinesischem Import jeweils 10 µl; Bahn 6, 8: *Saposhnikoviae divaricatae radix* aus deutscher Herkunft, Anbau 2006, 2010 10 µl; Bahn 9, 10: Referenzsubstanzen: PC und MV, jeweils 10 µl, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 10 cm, 366 nm

Tabelle 41: Ergebnisse der Robustheitsprüfung mit verschiedenem Kammer- und Plattentyp

R_F	Flachbodenkammer DC-Platte	ADC 2 HPTLC-Platte	ΔR_F
PC	0,40	0,41	0,01
MV	0,49	0,51	0,02

5.5.1.4.7.2 Verschiedenen Entwicklungsdistanz

Die Entwicklungsdistanz wurde auf 5 cm verringert und auf 7 cm erhöht, um mögliche Fehlerquellen bei der Durchführung zu evaluieren. Beide Chromatogramme (Abbildung 67) wurden mit der ersten Platte der Wiederholpräzision (*Saposhnikovia_20120214_01*) auf Lage und Intensität des Fingerprints verglichen (Tabelle 42). Die R_F -Werte der Referenzen PC und MV zeigten eine Abweichung von weniger als 0,06 R_F -Einheiten.

Saposhnikoviawurzel 150

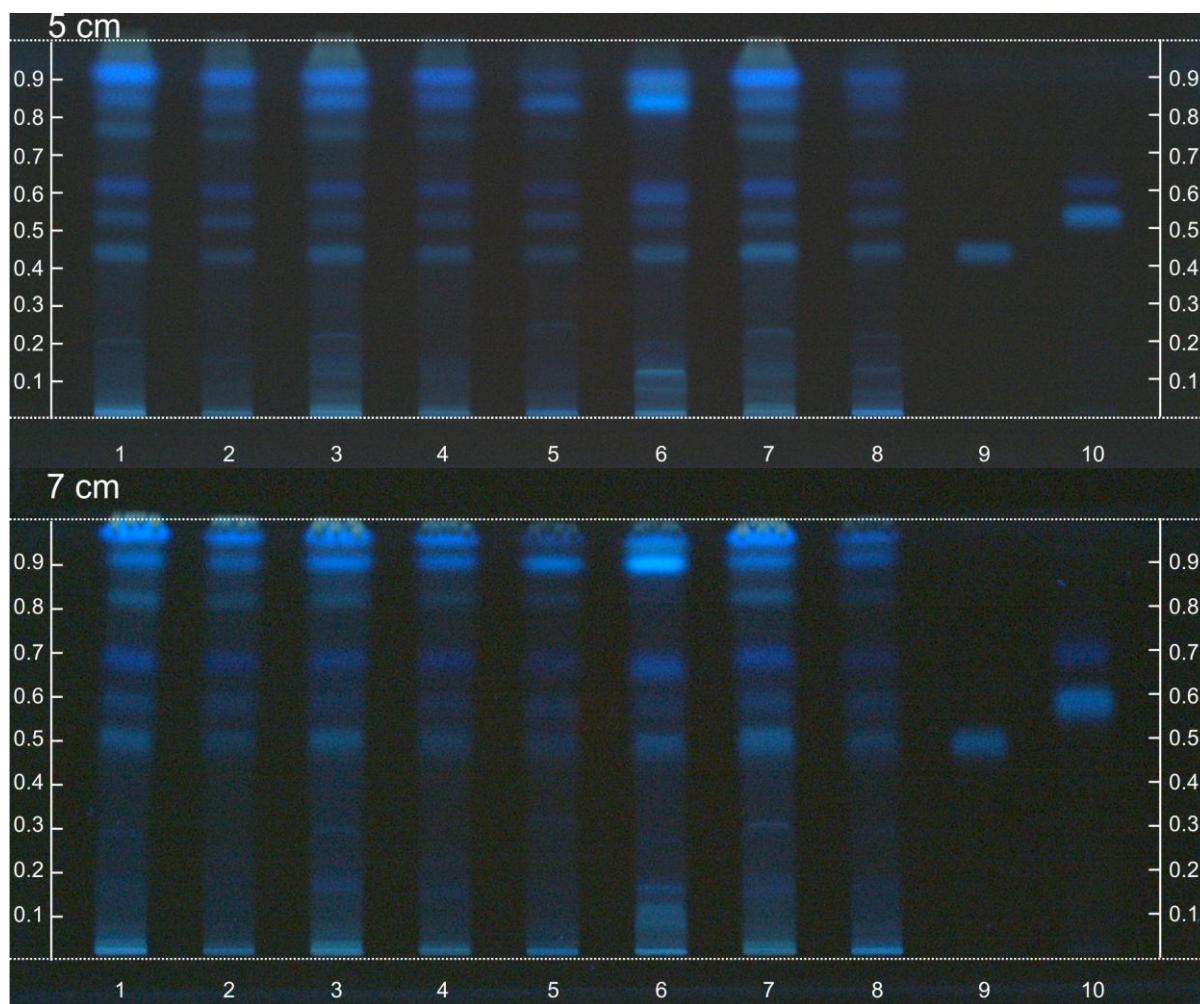


Abbildung 67: Robustheit Entwicklungsdistanz; Bahn 1-4, 7, 8: *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extrakt aus chinesischem Import jeweils 7,5 µl; Bahn 6, 8: *Saposhnikoviae divaricatae radix* aus deutscher Herkunft, Anbau 2006, 2010 7,5 µl; Bahn 9, 10: Referenzsubstanzen: PC und MV, jeweils 7,5 µl, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 5 bzw 7 cm, 366 nm

Tabelle 42: Ergebnisse der Robustheitsuntersuchung mit verschiedenen Entwicklungsdistanzen

R_F	5 cm	6 cm	7 cm	ΔR_F
PC	0,42	0,41	0,47	0,06
MV	0,52	0,51	0,57	0,06

5.6 Reinheitsuntersuchungen

5.6.1 Trocknungsverlust

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes erfolgte entsprechend der Allgemeinen Methoden des Ph Eur. 7.0/2.2.32 [55]. Dazu wurde die pulverisierte Droge (355) 2 h im Trockenschränk bei 105 °C getrocknet und danach gewogen.

Tabelle 43: Ergebnisse der Trocknungsverluste von Saposhnikoviae divaricatae radix

	Arobemed		Baicheng		CaeLo		Chinamedica	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	55,9643	1,0030	53,8383	1,0053	62,7270	1,0044	34,2985	1,0078
2. Einwaage	56,9424	1,0063	52,8864	1,0011	56,8760	1,0008	60,9164	1,0030
3. Einwaage	57,4310	1,0021	62,5654	0,9981	56,8756	1,0010	56,9411	1,0046
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	56,8795	0,9152	54,7556	0,9173	63,6524	0,9254	35,2310	0,9325
2. Einwaage	57,8650	0,9226	53,7995	0,9131	57,7994	0,9234	61,8463	0,9299
3. Einwaage	58,3519	0,9209	63,4813	0,9159	57,8040	0,9284	57,8740	0,9329
1. Einwaage	Trock.verlust	8,75	Trock.verlust	8,75	Trock.verlust	7,87	Trock.verlust	7,47
2. Einwaage		8,32		8,79		7,73		7,29
3. Einwaage		8,10		8,24		7,25		7,14
	Mittelwert	8,39	Mittelwert	8,59	Mittelwert	7,62	Mittelwert	7,30
	%-STABW	3,95	%-STABW	3,61	%-STABW	4,23	%-STABW	2,30

	Herbasinica		LfL 10		Sinophyto	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	32,7274	1,0031	58,5048	1,0005	61,4952	1,0045
2. Einwaage	56,1595	1,0035	31,7328	1,0018	61,9899	1,0037
3. Einwaage	32,7263	1,0013	55,9629	1,0006	61,9782	1,0027
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	33,6545	0,9271	59,4119	0,9071	62,4096	0,9144
2. Einwaage	57,0847	0,9252	32,6443	0,9115	62,9066	0,9167
3. Einwaage	33,6552	0,9289	56,8737	0,9108	62,8985	0,9203
1. Einwaage	Trock.verlust	7,58	Trock.verlust	9,34	Trock.verlust	0,9144
2. Einwaage		7,80		9,01		0,9167
3. Einwaage		7,23		8,97		0,9203
	Mittelwert	7,54	Mittelwert	9,11	Mittelwert	8,97
	%-STABW	3,82	%-STABW	2,17	%-STABW	8,67

Die Ergebnisse der einzelnen Drogenmuster verschiedener Anbieter zeigten keine größeren Abweichungen (Tabelle 43). Der Trocknungsverlust betrug 7,30-9,11%. Anhand der Ergebnisse wurde für die zu erstellende Monographie Saposhnikoviae divaricatae radix für das DAB, analog des ChP 2010, ein maximaler Trocknungsverlust von 10%, vorgeschlagen.

Saposhnikoviaawurzel 152

5.6.2 Asche

Die Bestimmung der Asche erfolgte entsprechend der Allgemeinen Methoden des Ph. Eur 7.0/2.4.16 [56]. 1,0 g der pulverisierten Droge (355) wurden in einen Quarziegel eingewogen und bei 600 °C bis zur Massenkonsistenz geglüht.

Tabelle 44: Ergebnisse der Aschebestimmungen von Saposhnikoviae divaricatae radix

	Arobemed		China-Medica		Herbasinica		LfL 2006	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	21,76777	0,99821	20,60350	1,00740	22,85239	1,02202	23,25878	1,01103
2. Einwaage	27,43736	1,00559	27,38070	1,00876	27,66279	0,96771	28,52496	1,00466
3. Einwaage	21,53291	0,99602	23,96340	0,99648	22,53214	1,00373	20,10668	1,01801
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	21,83233	0,06456	20,65156	0,04806	22,89913	0,04674	23,31350	0,05472
2. Einwaage	27,50275	0,06539	27,43027	0,04957	27,70770	0,04491	28,58048	0,05552
3. Einwaage	21,59691	0,06400	24,01219	0,04879	22,57774	0,04560	20,16123	0,05456
1. Einwaage	%-Asche	6,47	%-Asche	4,77	%-Asche	4,57	%-Asche	5,41
2. Einwaage		6,50		4,91		4,64		5,53
3. Einwaage		6,43		4,90		4,54		5,36
	Mittelwert	6,47	Mittelwert	4,86	Mittelwert	4,59	Mittelwert	5,43
	%-STABW	0,60	%-STABW	1,61	%-STABW	1,09	%-STABW	1,57

	Pharmachin	
	Tara	Einwaage
1. Einwaage	21,60804	0,99274
2. Einwaage	20,49085	0,99065
3. Einwaage	20,46057	1,03603
	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	21,65435	0,04631
2. Einwaage	20,53732	0,04647
3. Einwaage	20,50845	0,04788
1. Einwaage	%-Asche	4,66
2. Einwaage		4,69
3. Einwaage		4,62
	Mittelwert	4,66
	%-STABW	0,75

Die Ergebnisse der Aschebestimmungen der einzelnen Proben zeigten keine größeren Abweichungen oder Verfärbung des Ascherückstandes. Die erhaltenen Werte lagen zwischen 4,59-6,47% und damit in dem vom ChP 2010 vorgeschlagenen Rahmen von maximal 6,5%. Daher wird für die entsprechende Monographie Saposhnikoviae divaricatae radix für das DAB ein maximaler Aschewert von 6,5 % empfohlen.

5.6.3 Salzsäureunlösliche Asche

Die Bestimmung der salzsäureunlöslichen Asche erfolgt entsprechend der Allgemeinen Methoden des Ph Eur 7.0/2.8.1 [57].

Tabelle 45: Ergebnisse der salzsäureunlöslichen Aschebestimmungen von Saposhnikoviae divaricatae radix

	Arobemed		China-Medica		Herbasinica		LfL 2006	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	22,29731	0,99821	21,71100	1,00740	21,28428	1,02202	19,53428	1,01103
2. Einwaage	28,77632	1,00559	20,90899	1,00876	25,82100	0,96771	21,29675	1,00466
3. Einwaage	21,39099	0,99602	30,50082	0,99648	27,00708	1,00373	26,97210	1,01801
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	22,31183	0,01452	21,71772	0,00672	21,28888	0,00460	19,54659	0,01231
2. Einwaage	28,78965	0,01333	20,91607	0,00708	25,82500	0,00400	21,30900	0,01225
3. Einwaage	21,40521	0,01422	30,50722	0,00640	27,01132	0,00424	26,98357	0,01147
1. Einwaage	%-Asche	1,45	%-Asche	0,67	%-Asche	0,45	%-Asche	1,22
2. Einwaage		1,33		0,70		0,41		1,22
3. Einwaage		1,43		0,64		0,42		1,13
	Mittelwert	1,40	Mittelwert	0,67	Mittelwert	0,43	Mittelwert	1,19
	%-STABW	4,85	%-STABW	4,47	%-STABW	4,47	%-STABW	4,46

	Pharmachin	
	Tara	Einwaage
1. Einwaage	20,41582	0,99274
2. Einwaage	20,03759	0,99065
3. Einwaage	27,03945	1,03603
	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	20,42177	0,00595
2. Einwaage	20,04363	0,00604
3. Einwaage	27,04604	0,00659
1. Einwaage	%-Asche	0,60
2. Einwaage		0,61
3. Einwaage		0,64
	Mittelwert	0,62
	%-STABW	3,08

Ähnlich den Ergebnissen der Aschebestimmung, zeigten die salzsäureunlöslichen Aschewerte keine großen Schwankungen zwischen den Mustern der einzelnen Anbieter. Zudem lag der gemessene Wert von 0,43-1,40% im vorgegebenen Rahmen des ChP 2010, welches einen maximalen salzsäureunlöslichen Anteil von 1,5% vorschlägt. Da die gemessenen Ergebnisse dem Wert der bereits existierenden Monographie entsprachen, wurde ein maximaler Wert für die salzsäureunlösliche Asche von 1,5% für die DAB Monographie von Saposhnikoviae divaricatae radix vorgeschlagen.

5.7 Gehaltsbestimmungen

5.7.1 HPLC

5.7.1.1 Optimierung

In der neuen Monographie von *Saposhnikoviae divaricatae radix* in ChP 2010 [136] wird der Gesamtgehalt an PC und MV durch HPLC bestimmt. Die Messung erfolgt bei 254 nm, was nicht den UV Maxima der beiden Substanzen entspricht (PC $\text{UV}_{\max} = 305 \text{ nm}$, MV $\text{UV}_{\max} = 295 \text{ nm}$ gemessen im UV-DAD Spektrum im Fließmittel MeOH, H_2O 40:60). Überdies ist in der Monographie keine Angabe zur Säulentemperatur zu finden, weshalb die Messung bei Raumtemperatur (25°C) durchgeführt wurde. Beide Markersubstanzen waren im Chromatogramm deutlich voneinander getrennt (PC $R_t = 9,0 \text{ min}$; MV $R_t = 28 \text{ min}$) wobei der MV Peak durch die lange Elutionszeit unscharf und unsymmetrisch wurde (Abbildung 68). Um die Trennzeit zu verkürzen, wurde die Säulentemperatur auf 40°C erhöht, wodurch Retentionszeit beider Referenzen unter 20 min verkürzt (Abbildung 69 A), die Auflösung von PC zu den vorangehenden Peaks aber deutlich verschlechtert wurde.

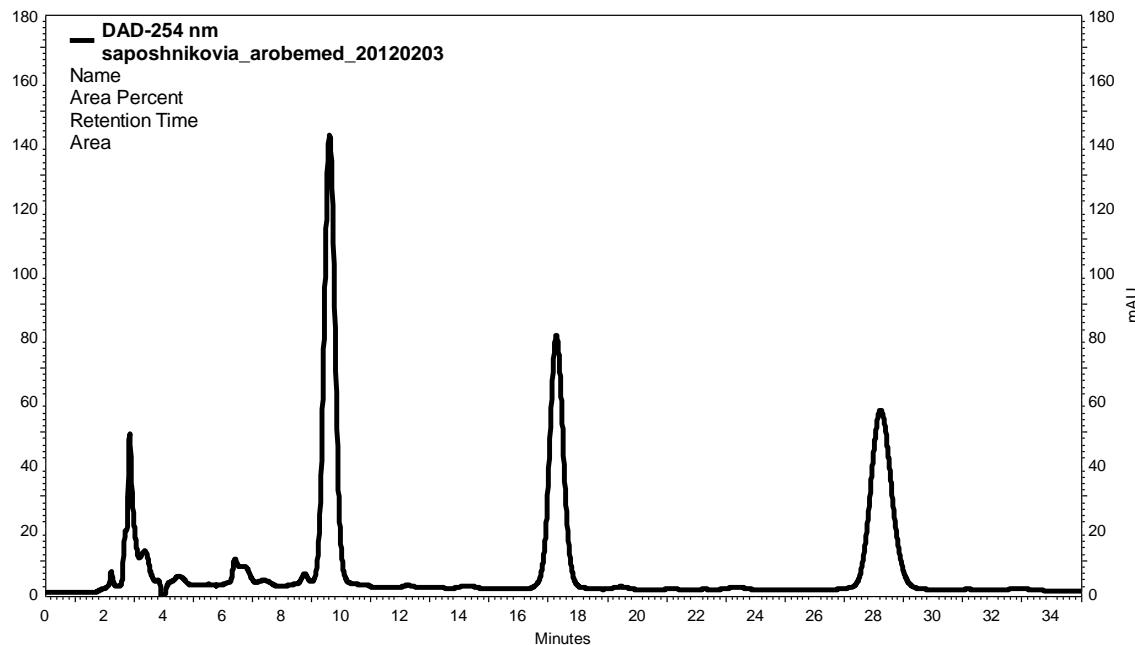
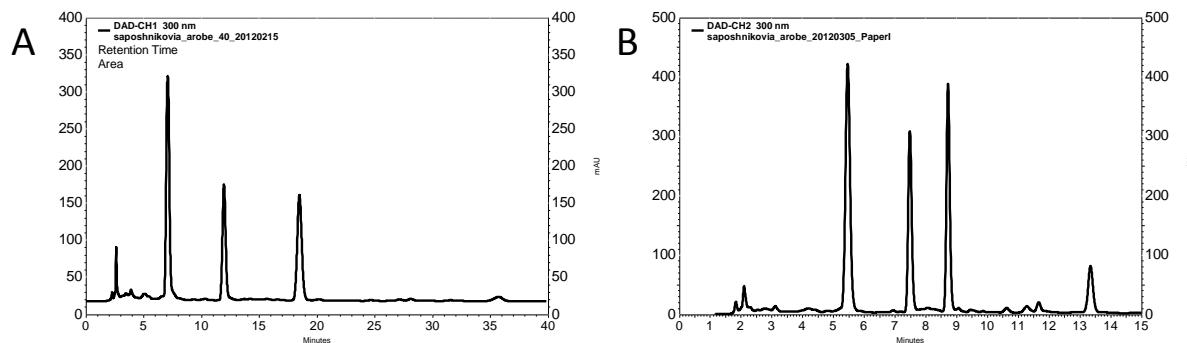


Abbildung 68: Methode ChP 2010: HPLC-Chromatogramm eines *Saposhnikoviae divaricatae radix* Extraktes aus chinesischer Import, $2 \mu\text{l}$, 254 nm , $1,0 \text{ ml/min}$, 25°C , Methanol, H_2O (40:60), isokratisch

Eine Literaturrecherche führte zu einem vielversprechenden Trennsystem nach [149] für die beiden Markersubstanzen und die restlichen Inhaltsstoffe von *Saposhnikovia divaricata*. Jedoch waren die Peaks beider Referenzen unsymmetrisch und nicht basisliniengetrennt zu dem weiteren Spektrum (Abbildung 69 B).



Um eine Trennung unter 10 min und scharfe Peaks mit einer Peaksymmetrie von 1,05 bzw. 1,04 zu erreichen, wurde das Trennsystem nach [149] leicht verändert (Abbildung 70).

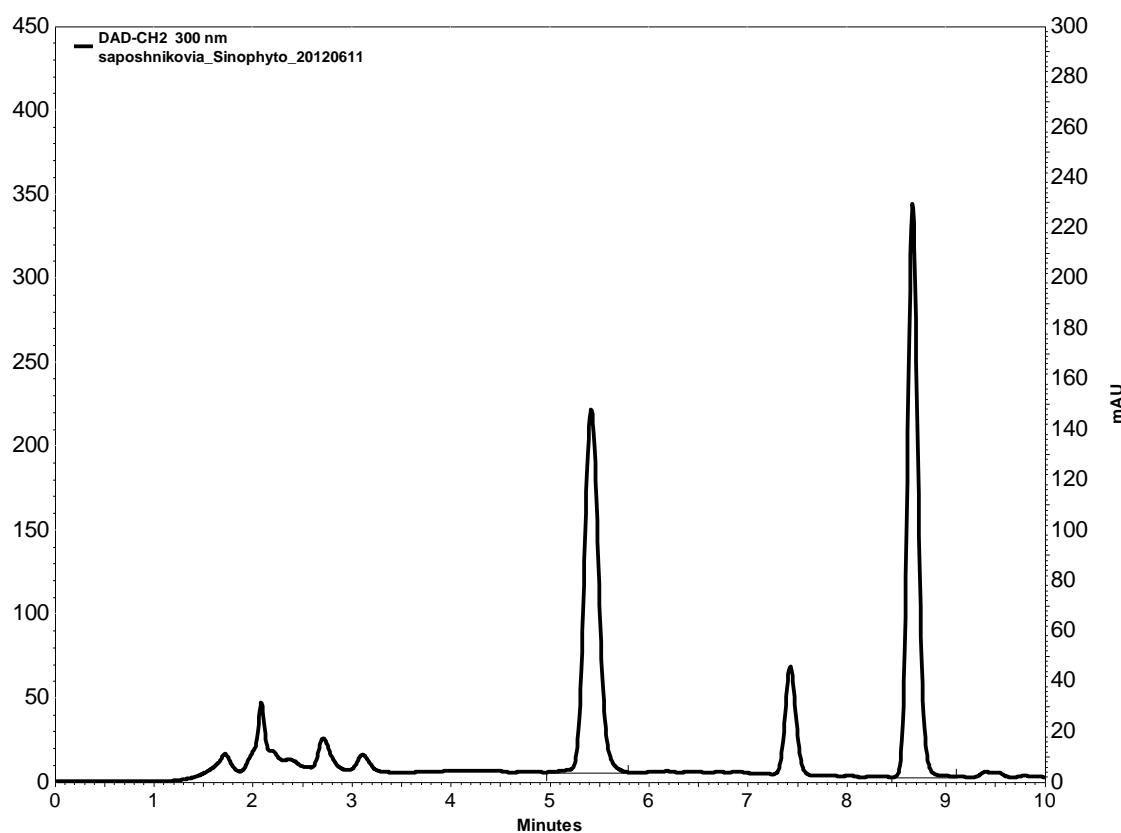


Abbildung 70: Neu entwickelte Methode: HPLC-Chromatogramm eines Saposhnikoviae divaricatae radix Extraktes aus chinesischem Import, 10 µl, 300 nm, 1,0 ml/min, 35 °C, A: H₂O, B: Methanol; 0-5 min: 60-45% A, 5-10 min 45-40% A, 10-15 min: 40-0% A, 15-20 min: 0% A

5.7.1.2 Validierung

Die Methode zur Gehaltsbestimmung von PC und MV in Saposhnikoviae divaricatae radix (Tabelle 38 Neu entwickelte Methode) wurde hinsichtlich Stabilität, Präzision, Robustheit und Richtigkeit mittels des Validierungsprotokolls (3.6.11) untersucht.

5.7.1.3 Stabilität des Extraktes

Ein Extrakt aus chinesischer Herkunft wurde fünfzehnmal nacheinander HPLC chromatographiert. Die Flächen der Markersubstanzen PC und MV ergaben einen Variationskoeffizienten von unter 5% (Tabelle 46). Der Test auf Stabilität wurde akzeptiert.

Tabelle 46: Stabilität des Extraktes

Zeit [min]	PC		MV	
	Messung	Fläche [mAU]	Messung	Fläche [mAU]
0-35	1	7878518	1	8865277
35-70	2	7814095	2	8803164
70-105	3	7978498	3	8981210
105-140	4	7896501	4	8892984
140-175	5	7791718	5	8788605
175-210	6	7907592	6	8912652
210-245	7	7889402	7	8901549
245-280	8	7733598	8	8736064
280-315	9	7727716	9	8725502
315-350	10	7698190	10	8692717
350-385	11	7747087	11	8746087
385-420	12	7680474	12	8678386
420-455	13	7664326	13	8658402
455-490	14	7649255	14	8641293
490-525	15	7762026	15	8767305
Σ 8h 45 min	MW	7787933	MW	8786079
	Stabw	101647	Stabw	103899
	V _K	1,31	V _K	1,18

5.7.1.4 Spezifität

Die Peaks der Substanzen PC und MV waren bei allen Proben mit $R_t = 5,4$ bzw. $8,7$ min vorhanden (Abbildung 70). Zudem zeigte der Peak der Markersubstanz PC eine Auflösung von $R = 8,6$ zu dem nachfolgenden Peak (Cimifugin) bzw. der Peak von MV eine Auflösung von $R = 1,0$ zum darauffolgenden Peak. Die Peakreinheit von 1,00 für PC und 0,99 für MV ergab ferner, dass sich unter dem Peak der Referenzsubstanzen keine Verunreinigung mit demselben Absorptionskoeffizienten und –maximum befand.

5.7.1.5 Kalibrierung

5.7.1.5.1 Messbereiches

Um den Gehalt der beiden Chromonglucoside PC und MV in Saposhnikoviae divaricatae radix zu bestimmen, musste der Messbereich der Kalibrierung evaluiert werden. Dazu wurden sieben Proben ausgewählt und jeweils nach der Methode Tabelle 38 extrahiert, chromatographiert und das erhaltene Detektorsignal dokumentiert (Tabelle 47). Jeweils eine

Lösung der beiden Referenzsubstanzen wurde verdünnt und ebenfalls chromatographiert (Tabelle 48).

Tabelle 47: Vorversuche der verwendeten Proben

Probe	Detektorsignal PC [mAU]	Detektorsignal MV [mAU]
Arobemed	10938238	7272989
Baicheng	7005084	7911885
CaeLo	7174239	2934516
Chinamedica	9705266	5083861
Herbasinica	12279784	6186210
LfL	8899281	5415969
Sinophyto	5193766	6222344

Tabelle 48: Vorversuche der verschiedenen PC und MV-Konzentrationen

Konzentrationen (PC) [mg/ml]	Detektorsignal [mAU]	Konzentrationen (MV) [mg/ml]	Detektorsignal [mAU]
0,212	14039068	0,11	6520115
0,0212	1481830	0,011	661598
0,00212	146888	0,0011	66056

Aus den Vorversuchen ergab sich ein linearer Zusammenhang der Regressionsgerade zwischen der vermessenen Konzentration und dem erhaltenen Detektorsignal (Abbildung 71). Der Mittelwert der Detektorsignale der Proben wurde als Mitte der Kalibriergerade definiert.

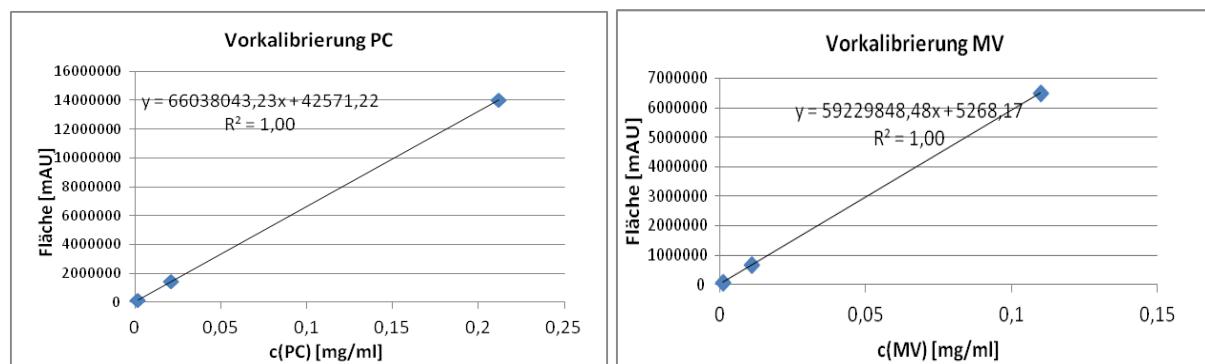


Abbildung 71: Kalibriergerade der Vorversuche zur Festlegung des Messbereichs von PC und MV

Der Messbereich wurde zwischen den Konzentrationen 0,0212 mg/ml und 0,212 mg/ml für PC und 0,011 mg/ml und 0,15 mg/ml für MV festgelegt.

Als Konzentrationen der einzelnen Kalibierlösungen (Level 1-5) wurden folgende Konzentrationen festgelegt:

Saposhnikoviawurzel 158

	PC	MV
Konzentration 1 (Level 1):	0,0450 mg/ml	0,0192 mg/ml
Konzentration 2 (Level 2):	0,0900 mg/ml	0,0384 mg/ml
Konzentration 3 (Level 3):	0,1350 mg/ml	0,0768 mg/ml
Konzentration 4 (Level 4):	0,1800 mg/ml	0,1152 mg/ml
Konzentration 5 (Level 5):	0,2250 mg/ml	0,1536 mg/ml

5.7.1.5.2 Kalibrierfunktion

Die Kalibrierlösungen wurde aus frisch hergestellten Stammlösungen von PC und MV an fünf aufeinanderfolgenden Tagen hergestellt und nach Tabelle 38 (Neu entwickelte Methode) chromatographiert.

Tabelle 49: Kalibrierung von PC und MV in Saposhnikoviae divaricatae radix

Level	1	2	3	4	5
c(PC) [mg/ml]	0,0450	0,0900	0,1350	0,1800	0,2250
1. Messung [mAU]	2950870	5888889	8763788	11620040	14567637
2. Messung [mAU]	3006400	6110680	9046048	12014912	14766218
3. Messung [mAU]	2806365	5697526	8527696	11202224	14090775
4. Messung [mAU]	2913911	5945663	8886600	11764647	14262247
5. Messung [mAU]	3012595	5899695	8841885	11806321	14554096
MW Fläche	2938028	5908491	8813203	11681629	14448195
Stabw	84138	147674	189989	302961	268769
V _K	2,86	2,50	2,16	2,59	1,86
Level	1	2	3	4	5
c(MV) [mg/ml]	0,0192	0,0384	0,0768	0,1152	0,1536
1. Messung [mAU]	1229609	2463024	4740478	7134316	9513758
2. Messung [mAU]	1208955	2426010	4800414	7188235	9545985
3. Messung [mAU]	1126280	2296302	4511432	6859421	9231294
4. Messung [mAU]	1173869	2407262	4805439	7209077	9379193
5. Messung [mAU]	1115318	2237186	4421105	6646860	9076468
MW Fläche	1170806	2365957	4655774	7007582	9349340
Stabw	49960	95090	177763	245647	196843
V _K	4,27	4,02	3,82	3,51	2,11

5.7.1.5.2.1 Lineare Regression

Eine Kalibrierfunktion wurde aus den Mittelwerten der Vermessung der Kalibrierlösungen durch lineare Regression erstellt. Dazu wurden die Formeln unter Punkt 3.6.11.2.5 verwendet um die Parameter m (Steigung der Gerade), b (Achsenabschnitt) und das Bestimmtheitsmaß r^2 zu berechnen.

Saposhnikoviawurzel 160

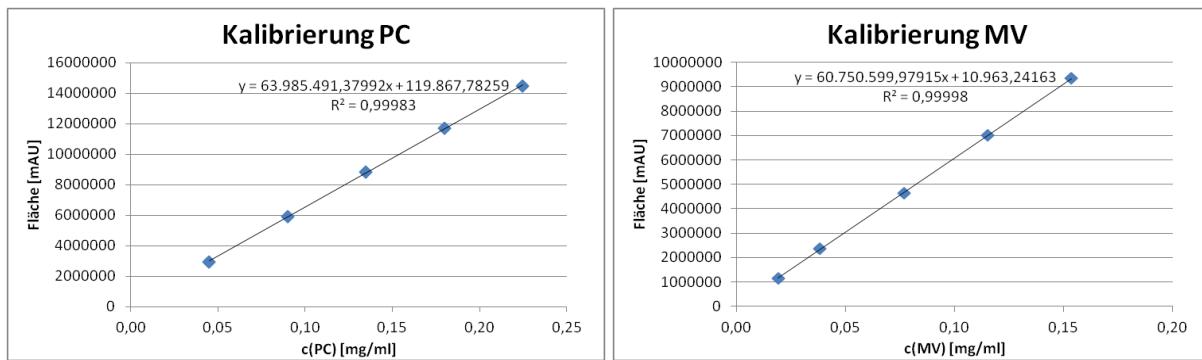


Abbildung 72: Kalibrierfunktion mit linearer Regression von PC und MV

Die Reststandardabweichung wurde mit Formel 10 berechnet und betrug 84692,53 für PC und 18460,86 für MV.

Die Verfahrensstandardabweichung, berechnet nach Formel 11 , war 0,0013 bzw. 0,0003.

Daraus ergab sich ein relative Verfahrensstandardabweichung von 0,98 bzw. 0,38 % (Formel 12).

5.7.1.5.2.2 Quadratische Regression

Eine Kalibrierfunktion wurde aus den Mittelwerten der Vermessung der Kalibrierlösungen durch quadratische Regression erstellt. Dazu wurden die Formeln unter Punkt 3.6.11.2.6 verwendet um die Parameter m, n, b und das Bestimmtheitsmaß r^2 zu berechnen.

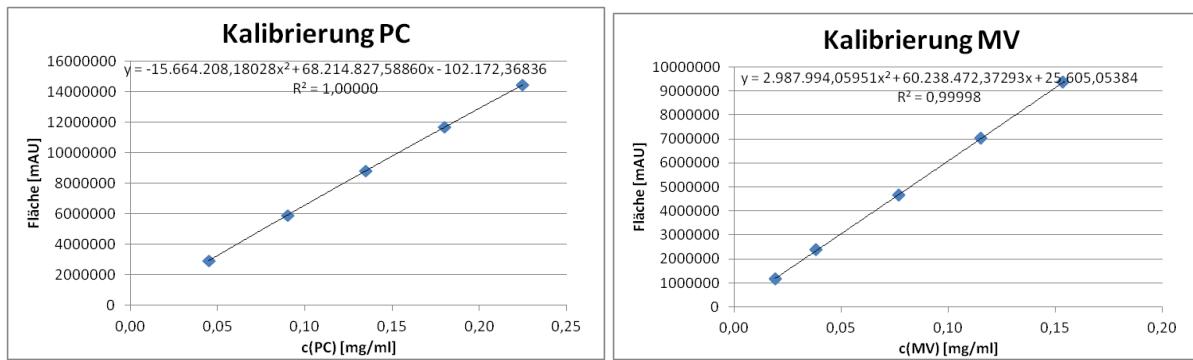


Abbildung 73: Kalibrierfunktion mit quadratischer Regression von PC und MV

Die Reststandardabweichung wurde mit Formel 22 berechnet und betrug 15914,79 für PC und 946937,26 für MV.

Die Verfahrensstandardabweichung, berechnet nach Formel 23 und Formel 24, war 0,0002 bzw. 0,0172.

Daraus ergab sich ein relative Verfahrensstandardabweichung von 0,18 bzw. 21,28% (Formel 12)

5.7.1.5.2.3 Anpassung nach Mandel

Ein Anpassungstest nach Mandel für die quadratische und lineare Regressionskurven entfiel für 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol, da die Verfahrensstandardabweichung der linearen Regression kleiner war als der quadratischen und somit die lineare Regression akzeptiert werden kann.

Für Prim-*O*-Glucosylcimifugin musste ein Anpassungstest nach Mandel durchgeführt werden.

$$PG = \frac{\Delta s_y^2}{s_{yQ}^2} = 82,96, \text{ tabellierter F-Wert } (f_1 = 1, f_2 = 2, P = 99\%) = 98,5$$

Die Nullhypothese ist anzunehmen, d. h. der Unterschied der beiden relativen Verfahrensstandardabweichungen war nicht signifikant unterschiedlich und eine lineare Regression für Prim-*O*-Glucosylcimifugin wurde verwendet.

5.7.1.6 Wiederholpräzision

Zur Untersuchung der Wiederholpräzision wurde eine Probe aus chinesischem Import fünfmal an einem Tag unabhängig voneinander eingewogen und nach Tabelle 38 (Neu entwickelte Methode) extrahiert und chromatographiert. Die prozentuelle Standardabweichung der Proben lag bei 4,56 bzw. 4,14 (Tabelle 50), somit unter 5% wodurch die Untersuchung der Wiederholpräzision akzeptiert werden konnte.

Tabelle 50: Ergebnisse der Wiederholpräzision

PC					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,4971	0,50574	0,51421	0,50332	0,52772
Fläche [mAU]	6859704	6976379	7116412	7150760	6642570
Gehalt [%]	0,21190	0,21188	0,21265	0,21832	0,19317
MW Gehalt			0,20958		
Stabw			0,00956		
V _K			4,56		
MV					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,4971	0,50574	0,51421	0,50332	0,52772
Fläche [mAU]	7722613	7729622	7904043	7956220	7473877
Gehalt [%]	0,25536	0,25123	0,25267	0,25984	0,23278
MW Gehalt			0,25038		
Stabw			0,01037		
V _K			4,14		

5.7.1.7 Laborpräzision

Die Probe aus chinesischer Herkunft wurde an 4 weiteren Tagen unabhängig voneinander eingewogen, extrahiert und chromatographiert nach Tabelle 38 (Neu entwickelte Methode). Da der Variationskoeffizient (Tabelle 51) unter 5% lag, konnte der Test auf Laborpräzision akzeptiert werden.

Tabelle 51: Ergebnisse der Laborpräzision

PC					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,50301	0,50505	0,50207	0,52981	0,4971
Fläche [mAU]	7005084	7003512	7050898	7878518	6859704
Gehalt [%]	0,21392	0,21301	0,21575	0,23240	0,21190
MW Gehalt	0,21740				
Stabw	0,00851				
V _K	3,91				
MV					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,50301	0,50505	0,50207	0,52981	0,4971
Fläche [mAU]	7911885	7767510	7567860	8865277	7722613
Gehalt [%]	0,24210	0,25280	0,24776	0,27510	0,25536
MW Gehalt	0,25462				
Stabw	0,01252				
V _K	4,92				

5.7.1.8 Probenauswertung und Prognoseintervall

Um den Gehalt an PC und MV der verschiedene Proben abzuschätzen, wurden diese dreimal an aufeinanderfolgenden Tagen extrahiert, chromatographiert nach Tabelle 38 (Neu entwickelte Methode) und die Konzentration an PC bzw. MV durch Umstellen der Kalibriergerade nach x berechnet.

Tabelle 52: Ergebnisse der Probenauswertung der Saposhnikoviae divaricatae radix Proben

	Arobemed	Baicheng	CaeLo	Chinamedica	Herbasinica	LfL	Sinophyto
PC							
MW Gehalt [%]	0,32800	0,21423	0,21653	0,29741	0,37052	0,26989	0,16586
Stabw	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
V _K	3,29	0,65	3,26	3,81	2,18	3,78	4,32
MV							
MW Gehalt [%]	0,23276	0,25304	0,09505	0,16694	0,19387	0,17474	0,21033
Stabw	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00
V _K	4,48	2,13	3,95	3,43	3,83	4,23	2,21

Saposhnikoviawurzel 164

Der „wahre“ Wert der Probe liegt jedoch zwischen zwei Hyperbelästen um die Kalibriergerade, da sich Fehler aus der Kalibriergerade und der Messung aufsummieren. Das Intervall (Tabelle 53), in dem sich die Konzentration an PC und MC in *Saposhnikoviae divaricatae radix* befindet, wurde nach Formel 38 berechnet.

Tabelle 53: Prognoseintervall der vermessenen *Saposhnikoviae divaricatae radix* Proben

Prognose-intervall [mg/ml]	Arobemed	Baicheng	CaeLo	Chinamedica	Herbasinica	LfL	Sinophyto
PC	0,16397± 0,00280	0,10710± 0,00279	0,10825± 0,00278	0,14869± 0,00269	0,18524± 0,00305	0,13494± 0,00266	0,08292± 0,00308
MV	0,11507± 0,00069	0,12510± 0,00073	0,04699± 0,00068	0,08253± 0,00061	0,09584± 0,00063	0,08639± 0,00061	0,10398± 0,00065

5.7.1.9 Robustheit

Eine Probe aus chinesischem Import wurde bei einer Säulenofentemperatur von 35°C, 40°C und 30°C nach Tabelle 38 (Neu entwickelte Methode) chromatographiert. Die Temperatur wurde erhöht bzw. erniedrigt, um die Robustheit der Methode zu untersuchen. Der Variationskoeffizient der gemessenen Flächen lag unter 5%. Die Methode wird als robust angesehen.

Tabelle 54: Ergebnisse der Robustheitsuntersuchung von Saposhnikoviae divaricatae radix

	PC	MV
Fläche bei 40°C [mAU]	5838945	6638868
Fläche bei 30°C [mAU]	5981409	6599541
Fläche bei 35°C [mAU]	5607380	6401492
Mittelwert [mAU]	5809245	6546634
Stab	188775	127225
V _K	3,25	1,94

5.7.1.10 Wiederfindung

Zu 0,500 g pulverisierte Droge (355) wurden 1,0 ml einer 8,054 µg/ml (PC) bzw. 7,6608 µg/ml (MV) haltigen Referenzlösung, was einer ca. 10% Aufstockung entsprach, pipettiert, extrahiert und chromatographiert. Die Wiederfindung wurde nach Formel 39 berechnet (Tabelle 55) und lag in den vorgegeben Grenzen von 95-105%.

Tabelle 55: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchung von PC bzw. MV in Saposhnikoviae divaricatae radix

	Einwaage [g]	Zugabe [mg]	Errechnete Konzentration [mg/ml]	Gefundene Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung [%]	Wiederfindung- Mittelwert [%]
PC						
1. Messung	0,4935	0,00805	0,11366	0,10931	96,18	
2. Messung	0,4920	0,00805	0,11331	0,10976	96,87	96,49
3. Messung	0,4930	0,00805	0,11355	0,10949	96,42	
MV						
1. Messung	0,4935	0,00766	0,13103	0,12920	98,60	
2. Messung	0,4920	0,00766	0,13063	0,12739	97,51	98,50
3. Messung	0,4930	0,00766	0,13091	0,13010	99,38	

5.7.1.11 Nachweisgrenze

Nachweisgrenze für PC bzw. MV (berechnet nach Formel 40): 4,37 µg/ml bzw. 1,00 µg/ml

5.7.1.12 Quantifizierungsgrenze

Quantifizierungsgrenze für PC bzw. MV (berechnet nach Formel 41): 13,24 µg/ml bzw. 3,04 µg/ml

5.7.2 HPTLC/Densitometrie

5.7.2.1 Optimierung der HPTLC Methode

Das bei der Idenitätsprüfung mittels Dünnschichtchromatographie verwendete Fließmittel (Tabelle 37, Chromonglucoside: Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) zeigte eine gute Trennung der beiden Markersubstanzen auf der Platte und im Densitogramm bei 366 nm und wurde für die Gehaltsbestimmung mit HPTLC/Densitometrie beibehalten. Die Verringerung des Auftragevolumens von 7,5 auf 4 µl ergab deutlich schärfere und symmetrischere Peaks.

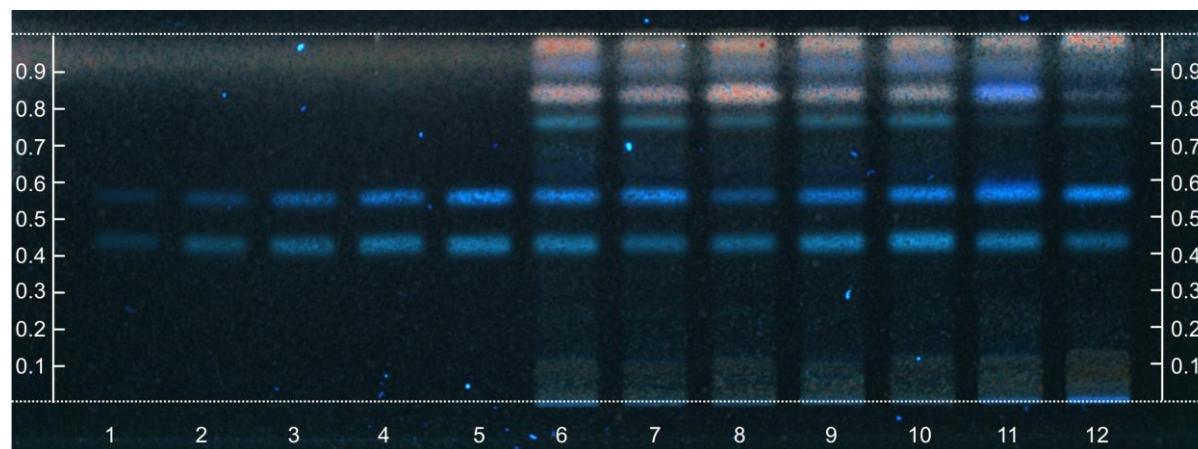


Abbildung 74: HPTLC Chromatogramm nach Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz; Bahn 1-5: Kalibrierlösungen der Substanzen PC und MV in zunehmender Konzentration, jeweils 4 µl; Bahn 6-10, 12: Saposhnikoviae divaricatae radix Extrakt aus chinesischer Herkunft 4 µl; Bahn 10: Saposhnikoviae divaricatae radix Extrakt aus deutscher Herkunft 4 µl, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz, 366 nm

Zudem wurde ein Nachweis mit Anisaldehydreagenz (Abbildung 74) durchgeführt, was die Intensität der Peaks von PC und MV in Densitogramm leicht erhöhte, aber aufgrund des zusätzlichen Arbeitsschrittes und der damit verbundenen Fehlerquelle nicht angewendet wurde.

5.7.2.2 Validierung

5.7.2.2.1 Stabilität der Testlösung während der Chromatographie

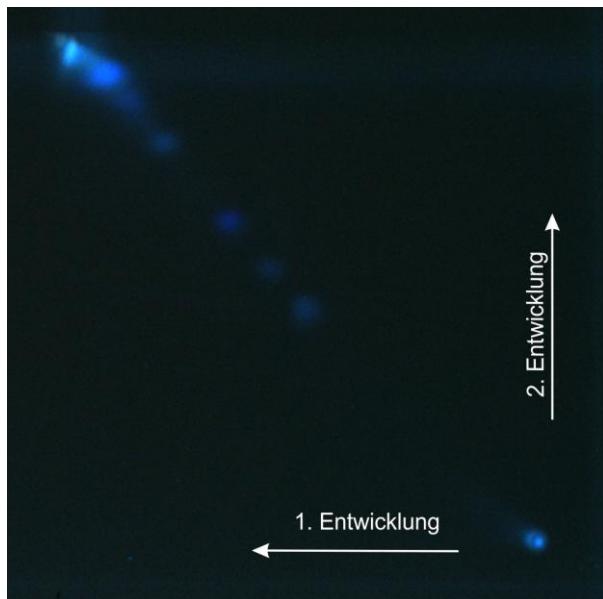


Abbildung 75: 2D-Chromatogramm von Saposhnikoviae divaricatae radix, 2 µl Testlösung, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

Analog 5.5.1.4.1 wurde Stabilität des Extraktes während der Chromatographie durch 2D-HPTLC nach Tabelle 37 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) untersucht, wobei alle Banden des Fingerprints auf der Diagonale zwischen dem Auftragepunkt und dem Schnittpunkt der beiden Fließmittelfronten zu finden waren (Abbildung 75). Somit waren die Analyten des Extraktes während der Chromatographie stabil. Zusätzlich wurde eine Stabilitätsuntersuchung mittels 2D-HPTLC für die beiden Referenzsubstanzen durchgeführt. Weder PC noch MV zeigten während der Chromatographie eine Artefaktbildung und konnten zur Gehaltsbestimmung verwendet werden.

5.7.2.2.2 Stabilität der Testlösung in Lösung und auf der Platte

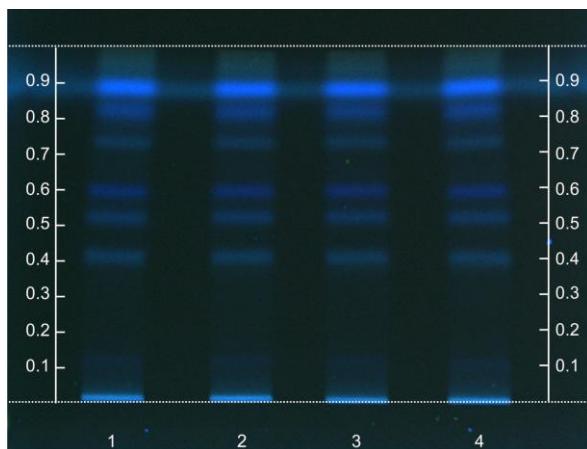


Abbildung 76: Stabilität auf der Platte und in Lösung, Bahn 1: Saposhnikoviae divaricatae radix Extrakt 3 h auf der Platte, Bahn 2, 3: frischer Saposhnikoviae divaricatae radix Extrakt, Bahn 4: Saposhnikoviae divaricatae radix Extrakt 3 h in Lösung jeweils 4 µl, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

Wie in 4.5.3.2.2 beschrieben wurden die verschiedenen Extrakte hergestellt, jeweils 4 µl auf die Platte aufgetragen und mit der nach Tabelle 37 (Neu entwickelten Methode-Gehaltsbestimmung) chromatographiert (Abbildung 76). Die Flächen der beiden Referenzsubstanzen wurden densitometrisch bestimmt und miteinander verglichen. Die prozentuale Standardabweichung der Messungen betrug für PC 3,3% und für MV 4,3%. Die Extrakte waren somit auf der HPTLC-Platte und in Lösung stabil.

5.7.2.3 Stabilität der Ergebnisse

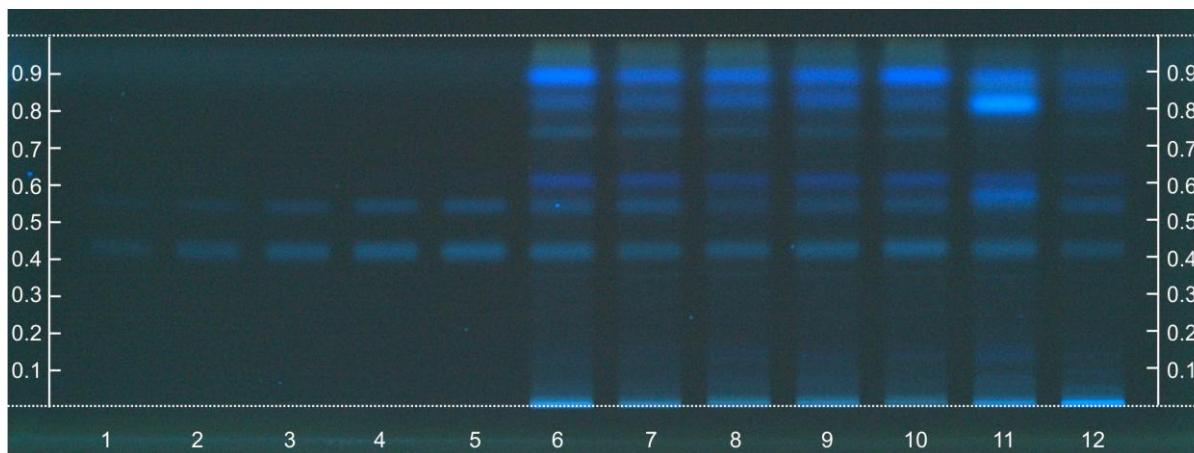


Abbildung 77: Stabilität der Derivatisierung nach t = 5 min; Bahn 1-5: Kalibrierlösungen von PC und MV in aufsteigender Konzentration jeweils 4 µl; Bahn 6-10, 12: Saposhnikoviae divaricatae radix aus chinesischem Anbau 4 µl; Bahn 11: Saposhnikoviae divaricatae radix aus deutschem Anbau 4 µl FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

Sieben Proben wurden nach Tabelle 37 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) extrahiert und chromatographiert. Die Flächen von PC und MV wurden nach densitometrischer Messung bei 366 nm 0, 10, 30 und 60 min nach der Chromatographie

verglichen (Tabelle 56). Die Ergebnisse waren stabil, da sich auch nach 60 min (Abbildung 77) lediglich eine Abweichung von 0,52-1,01% bei PC und 0,63-2,78% bei MV zeigte.

Tabelle 56: Stabilität der Ergebnisse der Chromatographie

Fläche (AU)	0 min	10 min	30 min	60 min	MW	Stabw	V_k
PC							
Arobemed	7090,01	7039,34	7032,64	7002,32	7041,08	36,38	0,52
Baicheng	5097,1	5046,42	5013,33	5008,48	5041,33	40,82	0,81
CaeLo	5353,19	5356,53	5299,47	5318,33	5331,88	27,66	0,52
Chinamedica	6429,9	6460,95	6335,45	6336,96	6390,82	64,32	1,01
Herbasinica	7748,04	7774,11	7671,33	7663	7714,12	55,36	0,72
LfL	6425,05	6404,18	6375,23	6346,38	6387,71	34,30	0,54
Sinophyto	4064,82	4055,19	4032,34	3992,7	4036,26	32,08	0,79
MV							
Fläche (AU)	0 min	10 min	30 min	60 min	MW	Stabw	V_k
Arobemed	5174,91	5075,87	5105,02	5160,06	5128,97	46,44	0,91
Baicheng	5287,29	5232,53	5221,44	5280,18	5255,36	33,20	0,63
CaeLo	2493,15	2441,78	2447,81	2505,31	2472,01	31,91	1,29
Chinamedica	3716,69	3699,26	3673,46	3735,08	3706,12	26,23	0,71
Herbasinica	4260,05	4203,85	4188,33	4269,19	4230,36	40,24	0,95
LfL	4367,99	4206,5	4210,9	4448,33	4308,43	119,75	2,78
Sinophyto	4501,62	4447,05	4423	4481,08	4463,19	34,99	0,78

5.7.2.3 Spezifität

PC und MV waren in allen Proben bei $R_F = 0,41$ bzw. 0,52 vorhanden (Abbildung 78). Beide Banden waren im Chromatogramm und im Densitogramm (Abbildung 79) deutlich voneinander getrennt.

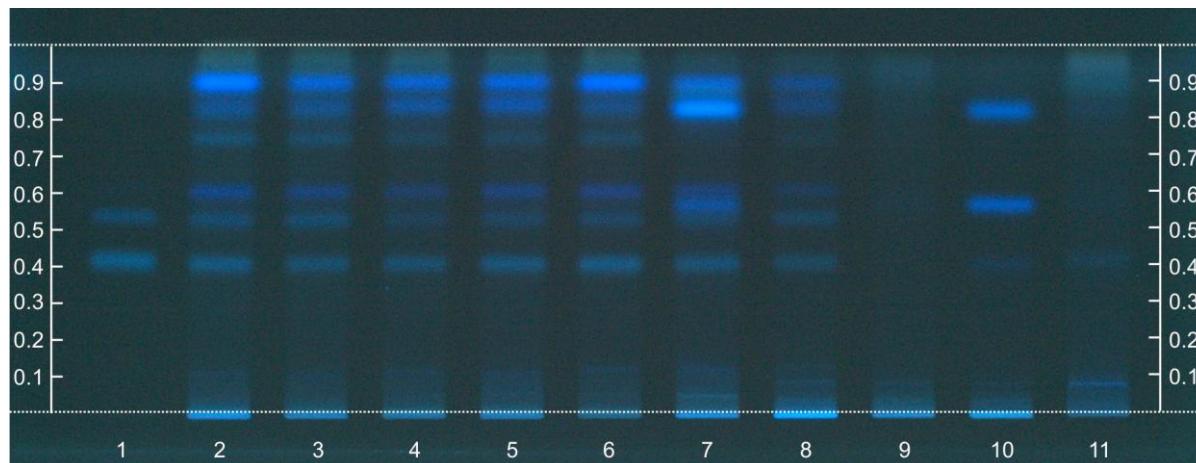


Abbildung 78: Spezifität: Bahn 1: Referenzsubstanzen PC und MV 4 µl, Bahn 2-6, 8: Saposhnikoviae divaricatae radix Extrakte aus chinesischem Import, jeweils 4 µl, Bahn 7: Saposhnikoviae divaricatae radix Extrakte aus deutschem Anbau verunreinigt mit Daucus carotae radix 4 µl, Bahn 9-11: Extrakte der Verfälschungen *Carum carvi* Wurzel, *Daucus carota* Wurzel, *Seseli mairei* Wurzel; FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

Saposhnikoviawurzel 170

Die blau fluoreszierende Bande ($R_f = 0,52$) in der Probe aus deutschem Anbau (Bahn 7), die einer Verunreinigung mit *Daucus carota* zuzuordnen war, konnte im Densitogramm (Abbildung 79 A) nicht nachgewiesen werden. Beide Peaks der Markersubstanzen zeigten eine Reinheit von 0,99 durch den Vergleich der UV-Spektren am Anfang, der Mitte und am Ende des Peaks.

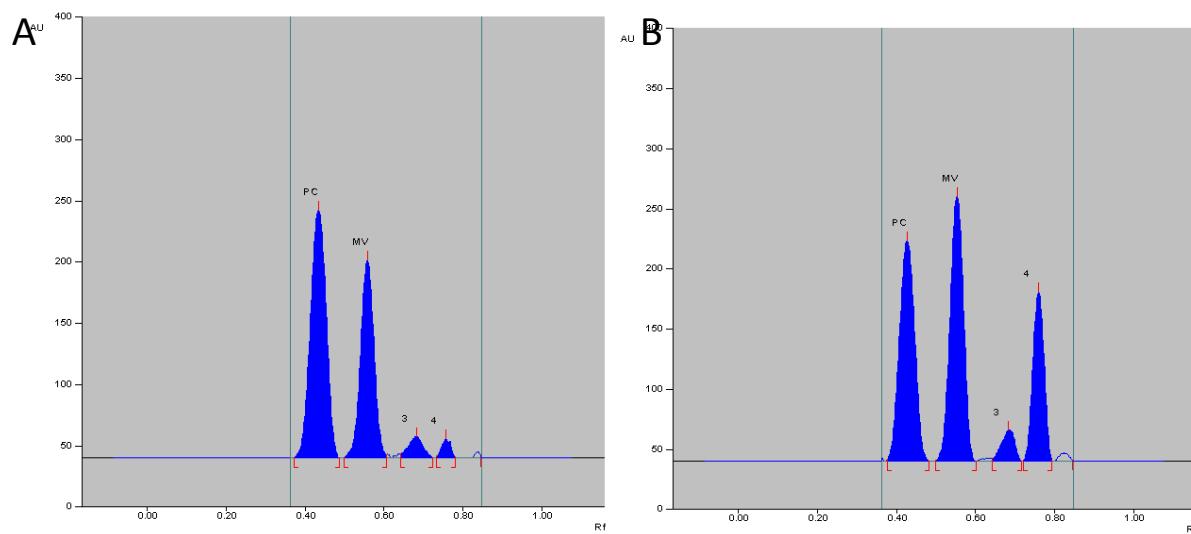


Abbildung 79: Densitogramm bei 300 nm nach Chromatographie mit FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 4 µl, A: *Saposhnikoviae divaricatae radix* aus bayerischem Anbau; B: *Saposhnikoviae divaricatae radix* aus chinesischem Import

5.7.2.4 Kalibrierung

5.7.2.4.1 Messbereiches

Zur Gehaltsbestimmung der beiden Chromonglucoside in *Saposhnikoviae divaricatae radix* mittels HPTLC/Densitometrie wurden die Konzentrationen der Kalibrierlösungen analog der Bestimmung mit Flüssigkeitschromatographie 4.7.2.3.1 verwendet. Um zu Überprüfen, ob der gewählte Bereich alle Proben abdeckt, wurden sieben Proben wie in Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung beschrieben, mit den fünf Kalibrierstandards chromatographiert und bei 300 nm densitometrisch ausgewertet.

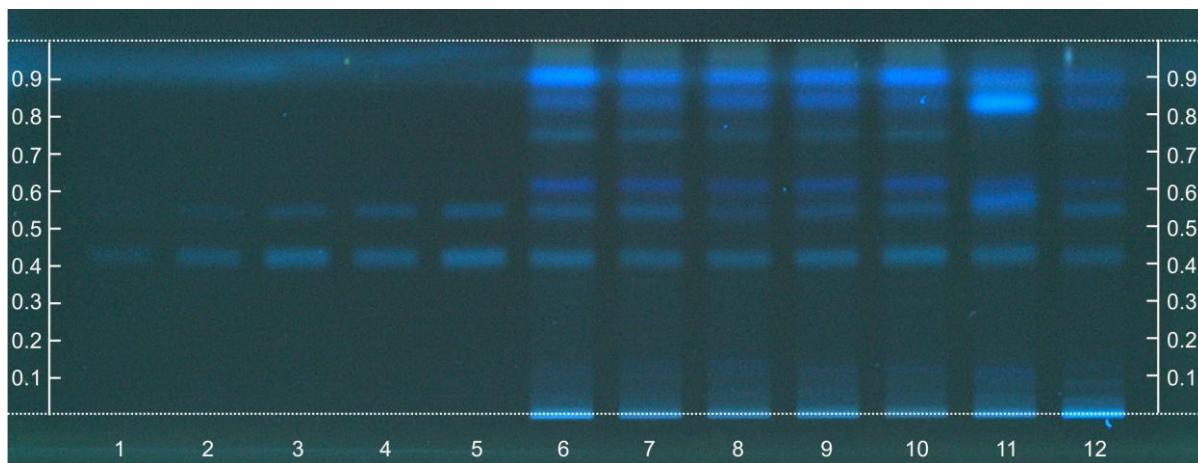


Abbildung 80: Messbereich; Bahn 1-5: Kalibrierlösungen von PC und MV in aufsteigender Konzentration jeweils 4 µl; Bahn 6-10, 12: Saposhnikoviae divaricatae radix aus chinesischem Anbau 4 µl; Bahn 11: Saposhnikoviae divaricatae radix aus deutschem Anbau 4 µl FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

Tabelle 57: Wertetabelle zu den Vorversuchen der verwendeten Proben

Probe	Detektorsignal PC (AU)	Detektorsignal MV (AU)
Arobemed	7022,40	4853,22
Baicheng	4896,88	5203,95
CaeLo	4890,46	2189,32
Chinamedica	6073,56	3512,18
Herbasinica	7594,36	4182,06
LfL	5607,97	3743,27
Sinophyto	4134,08	4574,04

Tabelle 58: Wertetabelle zu den Vorversuchen der verschiedenen PC und MV-Konzentrationen

Konzentrationen (PC) [mg/ml]	Detektorsignal (AU)	Konzentrationen (MV) [mg/ml]	Detektorsignal (AU)
0,04914	2372,64	0,019248	906,47
0,09828	4227,04	0,038496	1697,9
0,19656	7417,15	0,076992	3055,18
0,14742	5985,13	0,115488	4343,66
0,2457	8732,16	0,153984	5474,9

Aus der Regressionsgerade der Vorversuche zeigte sich ein quadratischer Zusammenhang zwischen der vermessenen Konzentration und dem erhaltenen Detektorsignal (Abbildung 81).

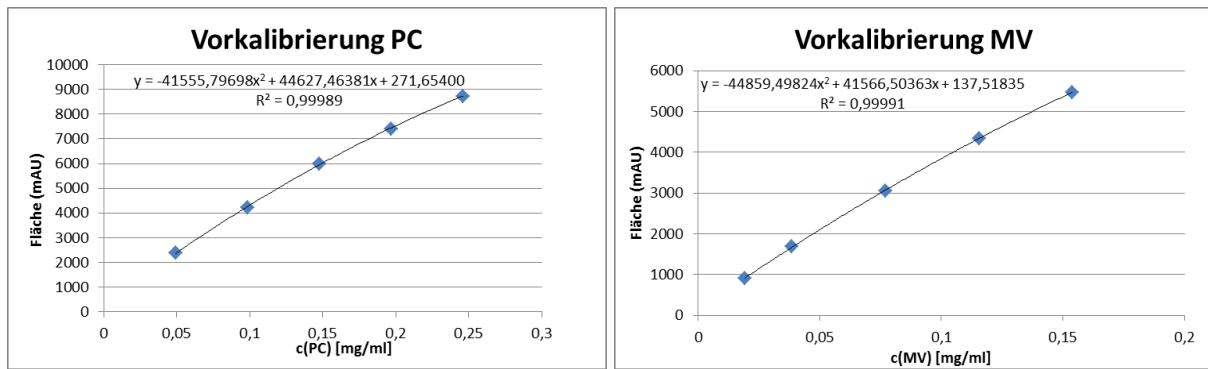


Abbildung 81: Kalibriergerade der Vorversuche zur Festlegung des Messbereichs von PC und MV

Als Konzentrationen der einzelnen Kalibierlösungen (Level 1-5) wurde festgelegt:

	PC	MV
Konzentration 1 (Level 1):	0,0491 mg/ml	0,0192 mg/ml
Konzentration 2 (Level 2):	0,0983 mg/ml	0,0385 mg/ml
Konzentration 3 (Level 3):	0,1474 mg/ml	0,0770 mg/ml
Konzentration 4 (Level 4):	0,1966 mg/ml	0,1155 mg/ml
Konzentration 5 (Level 5):	0,2457 mg/ml	0,1540 mg/ml

5.7.2.4.2 Kalibrierfunktion

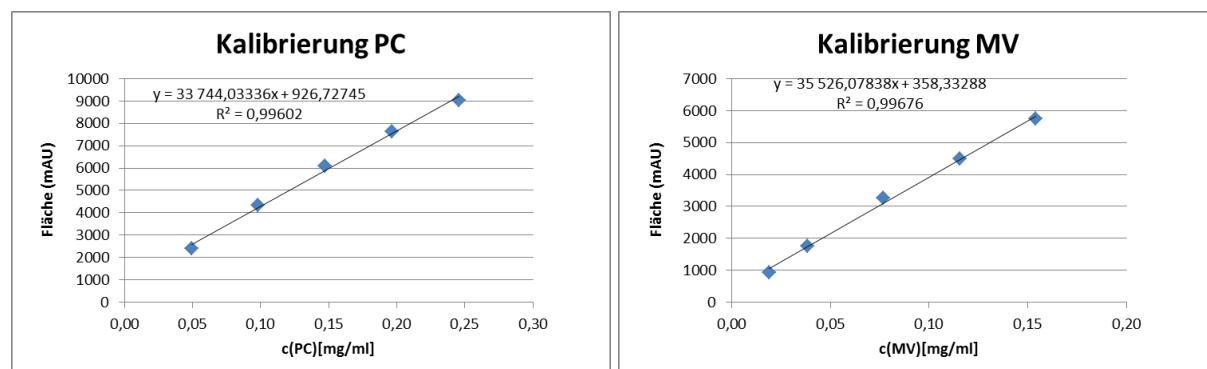
Die Kalibrierlösungen wurde aus frisch hergestellten Stammlösungen von PC und MV an fünf aufeinanderfolgenden Tagen hergestellt und nach Tabelle 37 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) mit jeweils sieben Proben auf einer Platte chromatographiert.

Tabelle 59: Wertetabelle für die Kalibrierung von PC und MV in Saposhnikoviae divaricatae radix

Level	1	2	3	4	5
c(PC) [mg/ml]	0,04914	0,09828	0,14742	0,19656	0,24570
1. Messung (AU)	2372,64	4227,04	5985,13	7417,15	8732,16
2. Messung (AU)	2388,12	4339,62	6119,15	7793,79	8983,61
3. Messung (AU)	2386,31	4398,64	6164,59	7754,46	8924,53
4. Messung (AU)	2451,85	4393,51	6058,00	7556,82	9593,13
5. Messung (AU)	2421,65	4324,36	6106,79	7633,24	9005,54
MW Fläche	2404,11	4336,63	6086,73	7631,09	9047,79
Stabw	32,21	69,37	68,31	152,47	323,31
V _K	1,34	1,60	1,12	2,00	3,57
Level	1	2	3	4	5
c(MV) [mg/ml]	0,01925	0,03850	0,07699	0,11549	0,15398
1. Messung (AU)	906,47	1697,90	3055,18	4343,66	5474,90
2. Messung (AU)	953,53	1795,24	3356,16	4702,65	5793,99
3. Messung (AU)	896,57	1810,93	3354,28	4632,46	5974,50
4. Messung (AU)	903,07	1713,60	3267,95	4234,89	5505,03
5. Messung (AU)	917,31	1794,85	3207,62	4515,07	5950,13
MW Fläche	915,39	1762,51	3248,24	4485,75	5739,71
Stabw	22,61	52,51	124,70	195,29	238,51
V _K	2,47	2,98	3,84	4,35	4,16

5.7.2.4.2.1 Lineare Regression

Eine Kalibrierfunktion wurde aus den Mittelwerten der Vermessung der Kalibrierlösungen durch lineare Regression erstellt. Dazu wurden die Formeln unter Punkt 3.6.11.2.5 verwendet, um die Parameter m (Steigung der Gerade), b (Achsenabschnitt) und das Bestimmtheitsmaß r^2 zu berechnen.

**Abbildung 82: Kalibrierfunktion mit linearer Regression von PC und MV**

Die Reststandardabweichung wurde mit Formel 10 berechnet und betrug 191,32 für PC und 128,93 für MV.

Die Verfahrensstandardabweichung, berechnet nach Formel 11, war 0,006 bzw. 0,004.

Daraus ergab sich ein relative Verfahrensstandardabweichung von 3,85 bzw. 4,49% (Formel 12).

5.7.2.4.2.2 Quadratische Regression

Eine Kalibrierfunktion wurde aus den Mittelwerten der Vermessung der Kalibrierlösungen durch quadratische Regression erstellt. Dazu wurden die Formeln unter Punkt 3.6.11.2.6 verwendet, um die Parameter m, n, b und das Bestimmtheitsmaß r^2 zu berechnen.

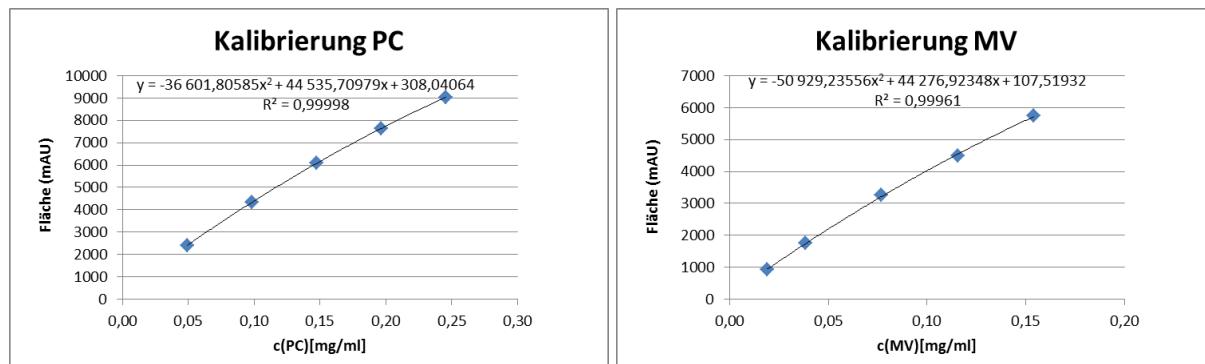


Abbildung 83: Kalibrierfunktion mit quadratischer Regression von PC und MV

Die Reststandardabweichung wurde mit Formel 22 berechnet und betrug 14,95 für PC und 55,07 für MV.

Die Verfahrensstandardabweichung, berechnet nach Formel 23 und Formel 24, lag bei 0,004 bzw. 0,002.

Daraus ergab sich ein relative Verfahrensstandardabweichung von 0,30 bzw. 1,90% (Formel 12).

5.7.2.4.2.3 Anpassung nach Mandel

Ein Anpassungstest nach Mandel für die quadratische und lineare Regressionskurven entfiel für PC und MV, da die Verfahrensstandardabweichung der quadratischen Regression kleiner war als der lineare und somit die quadratische Regression akzeptiert werden kann.

5.7.2.5 Wiederholpräzision

Zur Untersuchung der Wiederholpräzision wurde eine Probe aus chinesischem Import fünfmal an einem Tag unabhängig voneinander eingewogen und nach Tabelle 37 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) extrahiert und mit 5 Kalibrierstandards von PC und MV auf einer HPTLC-Platte chromatographiert. Die prozentuelle Standardabweichung der Proben lag bei 3,93 bzw. 3,56% (Tabelle 60), somit unter 5% wodurch die Untersuchung der Wiederholpräzision akzeptiert werden konnte.

Tabelle 60: Ergebnisse der Wiederholpräzision

PC					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,50709	0,49809	0,50592	0,50145	0,50719
Fläche (AU)	4896,88	5097,1	4994,97	5235,54	4968,47
Gehalt [%]	0,24548	0,26498	0,24643	0,23876	0,24688
MW Gehalt	0,24851				
Stabw	0,00978				
V _K	3,93				
MV					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,50709	0,49809	0,50592	0,50145	0,50719
Fläche (AU)	5277,89	5379,65	5086,95	5030,31	5160,57
Gehalt [%]	0,27719	0,28725	0,26959	0,26243	0,26729
MW Gehalt	0,27275				
Stabw	0,00970				
V _K	3,56				

5.7.2.6 Laborpräzision

Die Probe aus chinesischer Herkunft wurde an vier weiteren Tagen unabhängig voneinander eingewogen, extrahiert und mit 5 Kalibrierstandards auf einer HPTLC-Platte nach Tabelle 37 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) chromatographiert. Da der Variationskoeffizient (Tabelle 51) unter 5% lag, somit konnte der Test auf Laborpräzision akzeptiert werden.

Tabelle 61: Ergebnisse der Laborpräzision

PC					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,50145	0,49572	0,49232	0,49875	0,50555
Fläche (AU)	5235,54	5526,49	5172,52	5092,37	5296,44
Gehalt [%]	0,22665	0,23934	0,23001	0,24548	0,22799
MW Gehalt			0,23389		
Stabw			0,00816		
V _K			3,49		
MV					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,50145	0,49572	0,49232	0,49875	0,50555
Fläche (AU)	5277,89	5379,65	5086,95	5030,31	5160,57
Gehalt [%]	0,26928	0,27969	0,26444	0,27719	0,26717
MW Gehalt			0,27155		
Stabw			0,00657		
V _K			2,42		

5.7.2.7 Probenauswertung und Prognoseintervall

Um den Gehalt an PC und MV der verschiedene Proben abzuschätzen, wurden diese dreimal an aufeinanderfolgenden Tagen extrahiert, chromatographiert nach Methode Tabelle 37 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) und die Konzentration an PC bzw. MV durch Umstellen der Kalibriergerade nach x berechnet.

Tabelle 62: Ergebnisse der Probenauswertung der Saposhnikoviae divaricatae radix Proben

	Arobemed	Baicheng	CaeLo	Chinamedica	Herbasinica	LfL	Sinophyto
PC							
MW Gehalt [%]	0,34782	0,23684	0,23460	0,31612	0,39596	0,28363	0,18474
Stabw	0,00737	0,01167	0,00726	0,01464	0,00479	0,01166	0,00293
V _K	2,12	4,93	3,09	4,63	1,21	4,11	1,59
MV							
MW Gehalt [%]	0,25209	0,27114	0,10336	0,18022	0,20970	0,19237	0,22914
Stabw	0,00704	0,00779	0,00319	0,00547	0,00427	0,00636	0,00260
V _K	2,79	2,87	3,08	3,03	2,04	3,30	1,13

Der „wahre“ Wert der Probe liegt zwischen zwei Hyperbelästen um die Kalibriergerade, da sich Fehler aus der Kalibriergerade und der Messung aufsummieren. Das Intervall (Tabelle 53), in dem sich die Konzentration an PC und MV in *Saposhnikoviae divaricatae radix* befindet, wurde nach Formel 38 berechnet.

Tabelle 63: Prognoseintervall der vermessenen *Saposhnikoviae divaricatae radix* Proben

Prognose-intervall [mg/ml]	Arobemed	Baicheng	CaeLo	Chinamedica	Herbasinica	LfL	Sinophyto
PC	0,17837± 0,01212	0,11641± 0,01183	0,12107± 0,01169	0,15851± 0,01156	0,19884± 0,01301	0,14772± 0,01143	0,09290± 0,01294
MV	0,12930± 0,00894	0,13654± 0,00934	0,05338± 0,00777	0,08957± 0,00741	0,10529± 0,00785	0,09918± 0,00765	0,11522± 0,00825

5.7.2.8 Robustheit

Um die Robustheit der densitometrischen Gehaltsbestimmung von PC und MV in *Saposhnikoviae divaricatae radix* zu untersuchen, wurde die Entwicklungsstrecke um 5 mm erniedrigt bzw. erhöht. Eine Probe aus chinesischem Import wurde nach Methode Tabelle 37 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) extrahiert und bis zu einer Strecke von 55, 60 und 65 mm entwickelt. Nach der densitometrischen Messung wurden die Flächen der beiden Markersubstanzen verglichen (Tabelle 64) und zeigten eine Abweichung von unter 5%. Die Methode kann als robust angesehen werden.

Tabelle 64: Ergebnisse der Robustheitsuntersuchung von *Saposhnikoviae divaricatae radix*

	PC	MV
Fläche bei 55 nm (AU)	4881,46	5171,12
Fläche bei 60 nm (AU)	4968,47	5172,19
Fläche bei 65 nm (AU)	4886,17	5156,55
Mittelwert (AU)	4912,03	5166,62
Stab	48,93	8,74
V_K	1,00	0,17

5.7.2.9 Wiederfindung

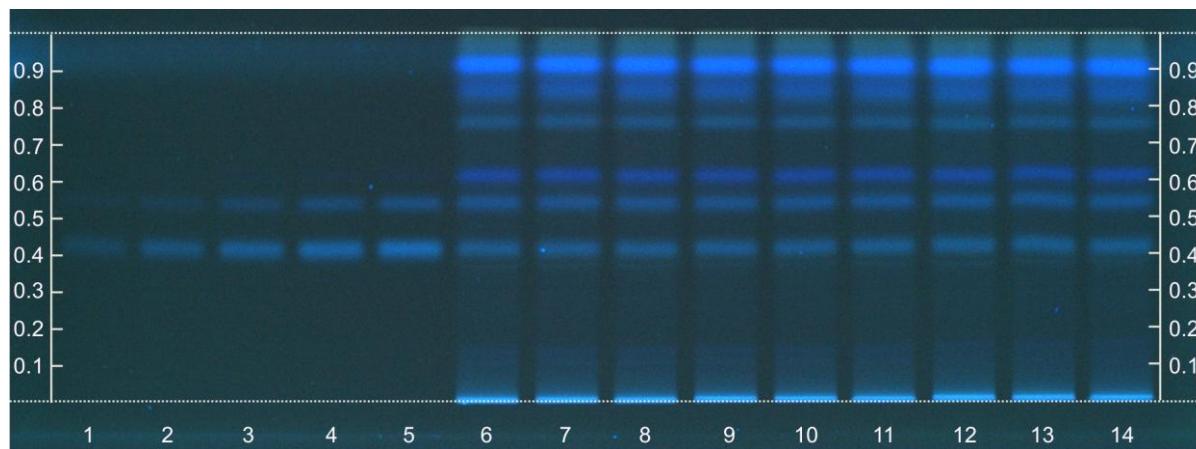


Abbildung 84: Wiederfindung; Bahn 1-5: Kalibrierlösungen von PC und MV in aufsteigender Konzentration jeweils 4 µl; Bahn 6-8: Saposhnikoviae divaricatae radix aus chinesischem Anbau + 10% Zusatz PC bzw. MV, Einwaage 1, 4 µl; Bahn 9-11: Saposhnikoviae divaricatae radix aus chinesischem Anbau + 10% Zusatz PC bzw. MV, Einwaage 2, 4 µl; Bahn 12-14: Saposhnikoviae divaricatae radix aus chinesischem Anbau + 10% Zusatz PC bzw. MV, Einwaage 3, 4 µl; FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

Zu 0,500 g pulverisierte Droge (355) wurden 0,1 ml einer 0,147 mg/ml (PC) bzw. 0,1155 mg/ml (MV) Referenzlösung, was einer Aufstockung von 10% entsprach, pipettiert und wie unter Tabelle 37 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) extrahiert und chromatographiert. Die Wiederfindung wurde nach Formel 39 berechnet (Tabelle 65) und lag in den vorgegebenen Grenzen von 95-105%.

Tabelle 65: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchung von PC bzw. MV in Saposhnikoviae divaricatae radix

	Einwaage [g]	Zugabe [mg]	Errechnete Konzentration [mg/ml]	Gefundene Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung [%]	Wiederfindung- Mittelwert [%]
PC						
1. Messung	0,4952	0,01470	0,13238	0,12952	97,84	
2. Messung	0,5007	0,01470	0,13092	0,12917	98,66	97,99
3. Messung	0,4976	0,01470	0,13174	0,12841	97,47	
MV						
1. Messung	0,4952	0,01155	0,14952	0,14509	97,04	
2. Messung	0,5007	0,01155	0,14788	0,14484	97,94	97,08
3. Messung	0,4976	0,01155	0,14880	0,14323	96,26	

5.7.2.10 Nachweisgrenze

Nachweisgrenze für PC bzw. MV (berechnet nach Formel 40): 1,11 µg/ml bzw. 4,10 µg/ml

5.7.2.11 Quantifizierungsgrenze

Quantifizierungsgrenze für PC bzw. MV (berechnet nach Formel 41): 3,36 µg/ml bzw. 12,46 µg/ml

5.8 Untersuchungen des ätherischen Öls

5.8.1 Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls

Die Gehalte an ätherischem Öl von 0,2-1,78% in *Saposhnikoviae divaricatae radix* waren sehr unterschiedlich. Im LfL 2006 Pflanzenmaterial konnte kein ätherisches Öl nachgewiesen werden, was wahrscheinlich am Alter der Droge lag. In der Literatur wird beschrieben [59], dass der Gehalt an ätherischem Öl entweder vom Erntezeitpunkt oder von der Art der Kultur (Wildwuchs oder Feldanbau) abhängt, somit stellt der Gehalt an ätherischem Öl im Drogenmaterial kein Aussagekriterium für die Drogenqualität.

Tabelle 66: Gehalt an ätherischem Öl in *Saposhnikoviae divaricatae radix*

Probe	Einwaage [g]	Ätherisches Öl [ml]	Gehalt an ätherischem Öl [ml/kg]
Arobemed	25	0,01	0,40
Baicheng	23	0,04	1,78
CaeLo	25	0,02	0,80
LfL 2006	25	<0,005	-
LfL 2010	25	0,005	0,20
Herbasinica	25	0,02	0,80
Sinophyto	25	0,03	1,20

5.8.2 GC-FID Untersuchung

Die GC-FID-Chromatogramme des ätherischen Öls von *Saposhnikoviae divaricatae radix* zeigten einen unterschiedlichen Fingerprint, wobei die Hauptpeaks bei $R_t = 10$, 13 und 14 min bei der Wurzeldroge aus Deutschland (Abbildung 85) und $R_t = 10$ und 21 min bei der chinesischen Droge (Abbildung 86) nachweisbar waren. Die Anzahl an Substanzen im Öl reichte von 160 (LfL 2010) bis 203 (CaeLo) Peaks. Diese große Bandbreite an Inhaltsstoffen war auch für *Saposhnikoviae divaricatae* Proben von verschiedenen chinesischen Anbauorten der Literatur beschrieben [59], weshalb auf eine weitere GC-MS Identifizierung verzichtet wurde.

Saposhnikoviaawurzel 180

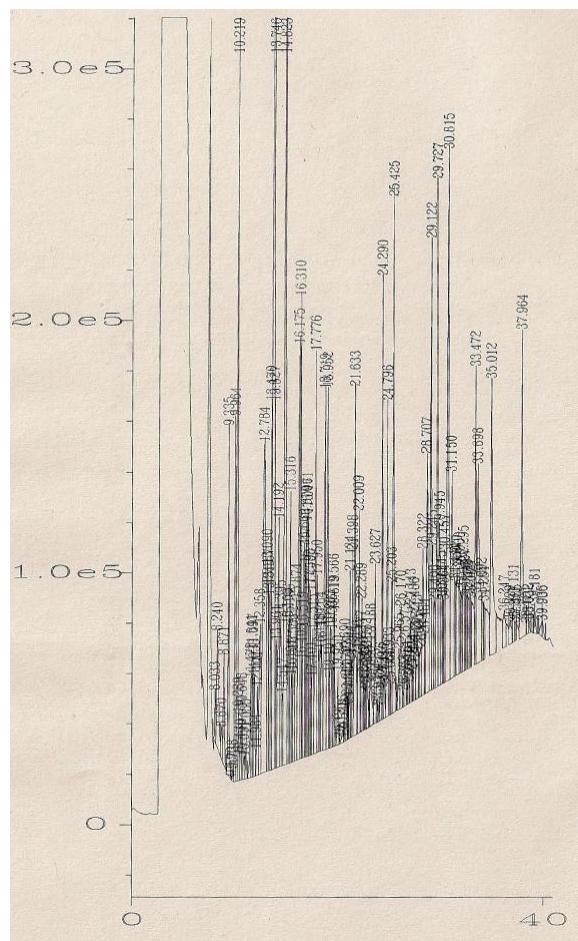


Abbildung 85: GC-FID Chromatogramm des ätherischen Öls von *Saposhnikoviae divaricatae radix* aus Deutschland (LfL 2010)

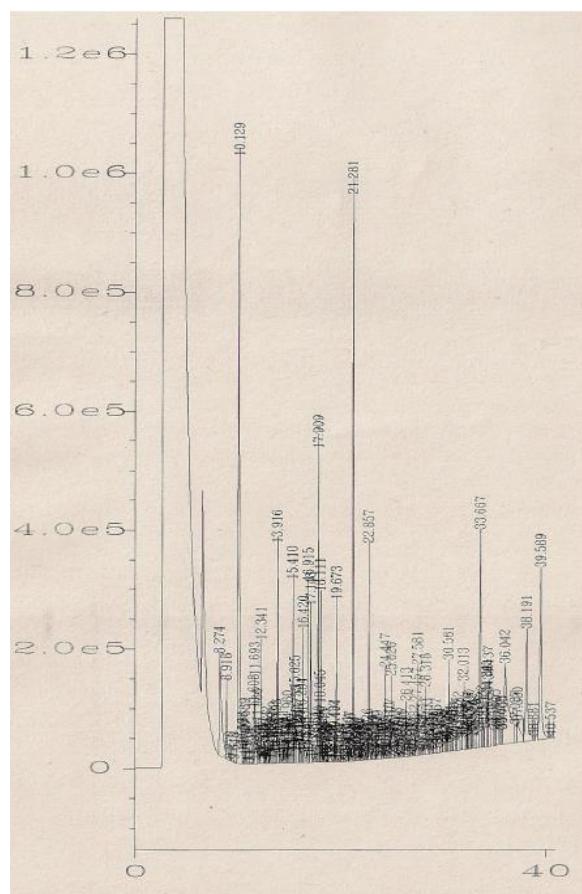


Abbildung 86: GC-FID Chromatogramm des ätherischen Öls von *Saposhnikoviae divaricatae radix* aus China (CaeLo)

5.8.3 TLC-MS Identifizierung

Nach Chromatographie des ätherischen Öls von *Saposhnikoviae divaricatae radix* mit Methode Tabelle 37 (Ätherisches Öl) wurde die vermeindliche Panaxynolbande bei $R_f = 0,35$ und einer Fluoreszenzlösung bei 254 nm auf dem HPTLC-Chromatogramm ohne Derivatisierung mit Anisaldehyd identifiziert und markiert. Das APCI-MS-Spektrum (Abbildung 87) nach Absaugen von der HPTLC-Platte mittels TLC-MS-Interface ergab einen Molekülpeak [$M+H^+$] bei m/z 245,1 und einen größeren Peak bei m/z 268,1, bei dem es sich um das Natriumaddukt [MH^++Na^+] handelt, was schon bei [153] im ESI-MS als [$M+Na^+$] mit einer Masse von 267 g/mol beschrieben wurde. Im Fragmentierungsmuster ist einen Peak bei m/z 221,1 zu erkennen, der eine Abspaltung von H_2O [MH^+-H_2O] am C3 darstellt. Die Bande konnte also eindeutig als Panaxynol identifiziert werden.

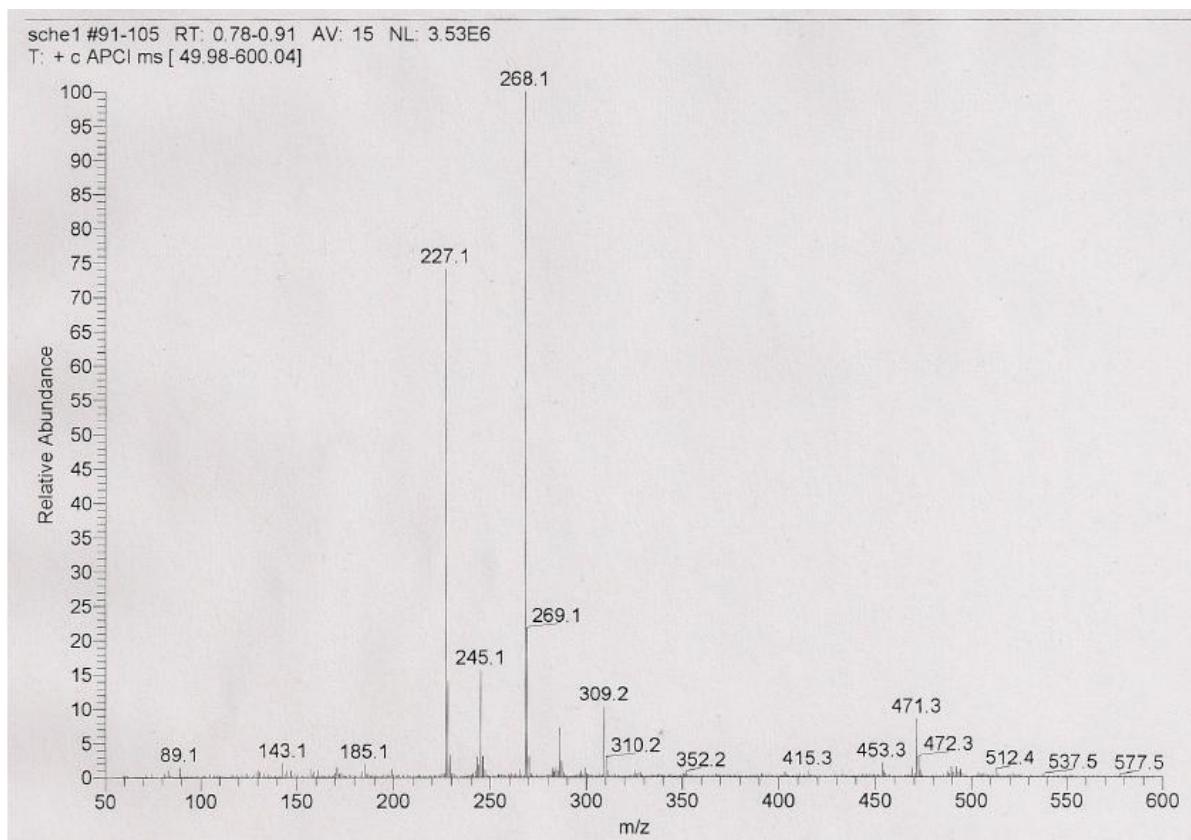


Abbildung 87: APCI-MS-Spektrum von Panaxynol nach Absaugen einer Bande des Ätherischen Öls aus Saponnikoviae divaricatae radix aus chinesischem Anbau durch das CAMAG TLC-MS Interface, FM: Dichlormethan, 5 µl

5.9 Untersuchung der Proben bayerischer Herkunft

5.9.1 Dünnschichtchromatographische Untersuchung

Wie die Chromatogramme (Abbildung 57, Abbildung 58) der ersten dünnenschicht-chromatographischen Analysen des Inhaltsstoffspektrums von Saponnikoviae divaricatae radix zeigten, schien das in Bayern kultivierte Pflanzenmaterial mit Daucus carota Wurzeln, der wilden Möhre, verunreinigt zu sein. Auffällig war ein starker Geruch nach Karotte, der bei der bayerischen Probe und bei manchen Proben aus China jedoch nicht so ausgeprägt, zu finden war. Neues Probenmaterial wurde von der bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft zur Verfügung gestellt, um weitere Chargen auf Verunreinigungen zu untersuchen. Um eine Artefaktbildung während der Trocknung bei 100 °C von Daucus carota radix auszuschließen, wurde frisches Pflanzenmaterial im Botanischen Garten, Universität Regensburg geerntet und bei 40 bzw. 80 °C im Trockenschrank getrocknet. Im Chromatogramm (nach Methode Tabelle 37 Neu entwickelte Methode-Identität) zeigte sich die blau fluoreszierende Bande bei $R_F = 0,55$ bei den Extrakten beider

Saposhnikoviaawurzel 182

Trocknungsbedingungen (Abbildung 88, Bahn 12, 13), wodurch ein temperaturbedingter Abbauprozess ausgeschlossen werden konnte.

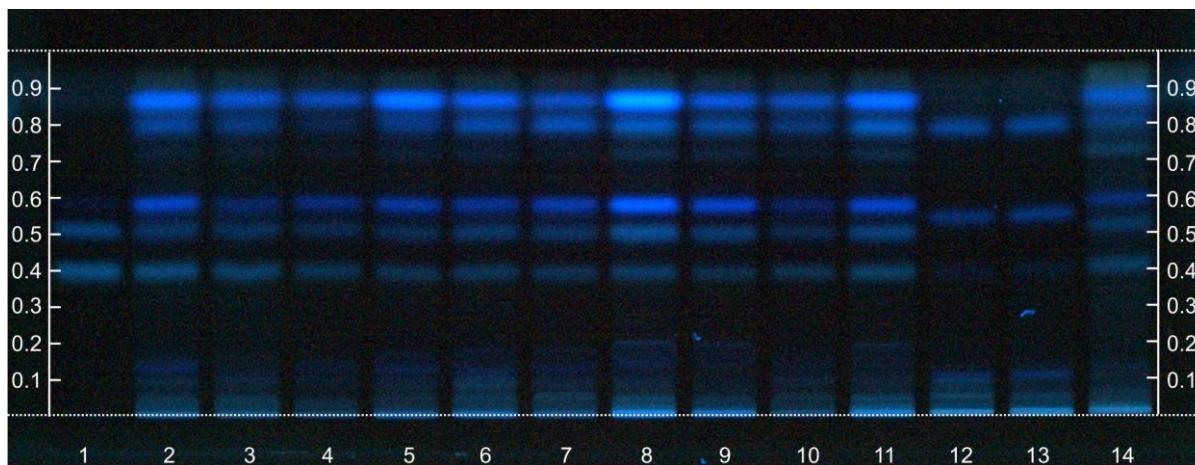


Abbildung 88: *Saposhnikoviae divaricatae* Proben aus Bayern: Bahn 1: Referenzsubstanzen: PC und MV 7 µl; Bahn 2-11: *Saposhnikoviae divaricatae* radix aus bayerischem Anbau LfL 101-110, 7 µl; Bahn 12, 13: Extrakte der Verfälschung *Daucus carotae* radix, getrocknet bei 40 bzw. 80°C, 7 µl; Bahn 14: *Saposhnikoviae divaricatae* radix aus chinesischem Anbau, 7 µl, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

Keine der neu angeforderten Proben aus Deutschland zeigte eine blau fluoreszierende Bande analog zu *Daucus carotae* radix, trotz unterschiedlich starkem Geruch nach Karotte (Tabelle 67). Der Geruch allein lässt also nicht auf das Vorhandensein der Wilden Möhre schließen.

Tabelle 67: Olfaktorische Untersuchung des Probenmaterial von *Saposhnikovia divaricatae* radix aus bayerischem Anbau

Probenmaterial	Geruch nach Karotte
LfL 101	++
LfL 102	-
LfL 103	+
LfL 104	+
LfL 105	-
LfL 106	-
LfL 107	+
LfL 108	-
LfL 109	+
LfL 110	-

Alle bayerischen Proben konnten darüber hinaus als *Saposhnikoviae divaricatae* radix identifiziert werden, da die für PC und MV charakteristischen blau fluoreszierenden Baden bei 366 nm vorhanden waren.

5.9.2 Gehaltsbestimmung

Der Gehalt an PC und MV aller in Bayern kultivierter Proben wurde mittels der neu entwickelten HPLC und HPTLC/Densitometrie-Methode bestimmt, um zu untersuchen, ob Anbaujahr oder genetische Herkunft (Tabelle 68) Auswirkungen auf den Chromonglucosidgehalt haben.

Tabelle 68: Genetische Herkünfte der *Saposhnikoviae divaricatae radix* Proben aus Deutschland

Probenname	Anbaujahr	Erntejahr	Herkunft
LfL 101	2011	2011	Richters
LfL 102	2011	2011	B.T.World Seeds
LfL 103	2011	2011	Herba Farm
LfL 104	2011	2011	Mongolei
LfL 105	2011	2011	CNTSC 07
LfL 106	2011	2011	IPK 1
LfL 107	2010	2010	F1, selektiert aus Richters
LfL 108	2010	2010	F1, selektiert aus B.T. World Seeds
LfL 109	2011	2011	F1, selektiert aus Herba Farm
LfL 110	2010	2010	F1, selektiert aus B.T. World Seeds

5.9.2.1 HPLC

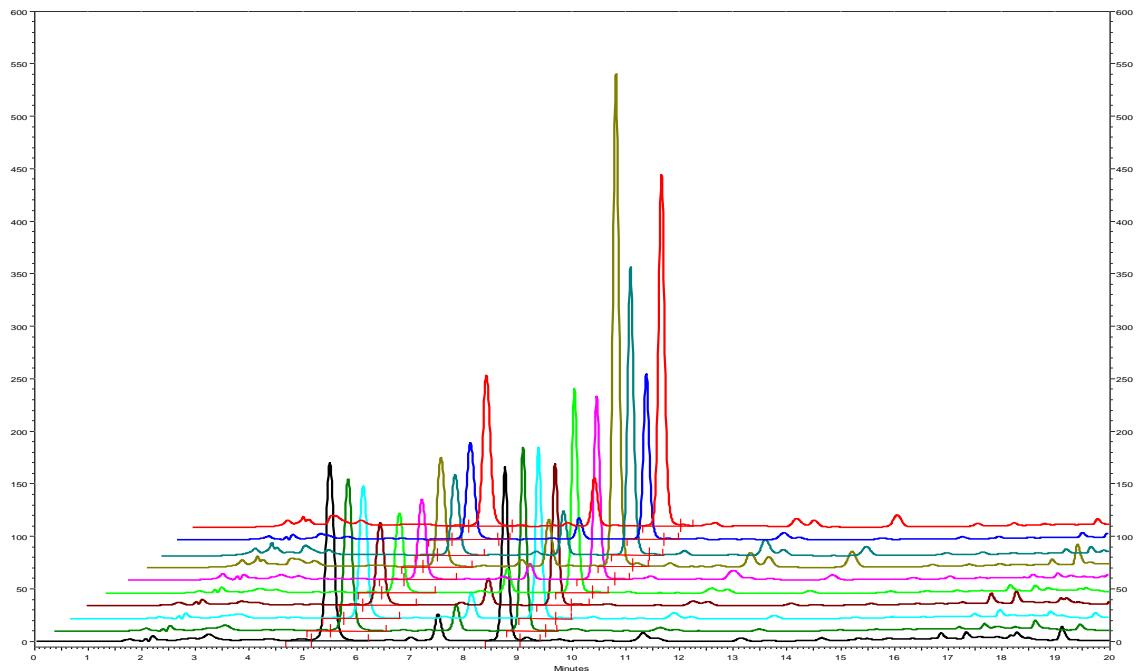


Abbildung 89: HPLC-Chromatogramme der verschiedenen Proben aus bayerischem Anbau LfL 101-110, 10 µl, 300 nm, 1,0 ml/min, 35 °C, A: H₂O, B: Methanol; 0-5 min: 60-45% A, 5-10 min 45-40% A, 10-15 min: 40-0% A, 15-20 min: 0% A

Das Probenmaterial aus Deutschland wurde nach Tabelle 38 (Neu entwickelte Methode) extrahiert und chromatographiert. Bei allen Proben waren deutliche Peaks der beiden Markersubstanzen PC und MV bei $R_t = 5,4$ bzw. 8,7 min zu erkennen (Abbildung 89). Auffallend war der hohe Anteil an MV in den 2010 (LfL 107, 108, 110) geernteten Pflanzen (0,4%, Tabelle 69) im Gegensatz zu den Proben, die 2011 kultiviert wurden (0,2%), obwohl alle Pflanzen am selben Anbauort gepflanzt wurden. Beide Anbaujahre 2010 und 2011 wurden mit Hilfe von SPSS ausgewertet (*t*-Test für unabhängige Stichproben, $P = 95\%$) und zeigten einen hoch signifikanten Unterschied im Gehalt an MV, jedoch nicht an PC. Aus den Ergebnissen ließ sich ableiten, dass die genetische Herkunft der Samen einen untergeordneten Einfluss auf die Zusammensetzung des Chromonglucosidspektrums zeigte, die jahresbedingten Schwankungen hingegen deutliche Unterschiede im Gehalt ergaben. Da keine weiteren Daten zu Bodenbeschaffenheit oder Temperaturverlauf der beiden Anbaujahre vorhanden waren, konnten die genauen Parameter für die Gehaltsunterschiede nicht determiniert werden.

Tabelle 69: Ergebnisse der Gehaltsbestimmung der Saposhnikoviae divaricatae radix Proben aus bayerischem Anbau mittels HPLC

Probenname	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwert	Stabw	V_K
PC, Gehalt [%]						
101	0,24441	0,23654	0,23246	0,23780	0,00607	2,55
102	0,18079	0,19083	0,18287	0,18483	0,00530	2,87
103	0,14813	0,16319	0,15992	0,15708	0,00792	5,04
104	0,09822	0,08605	0,09445	0,09291	0,00623	6,71
105	0,09313	0,10171	0,09449	0,09644	0,00461	4,78
106	0,09110	0,09055	0,08910	0,09025	0,00103	1,14
107	0,12689	0,12557	0,12884	0,12710	0,00164	1,29
108	0,09899	0,10437	0,09574	0,09970	0,00436	4,37
109	0,10909	0,11079	0,11044	0,11010	0,00090	0,82
110	0,17008	0,17708	0,17544	0,17420	0,00366	2,10
MV, Gehalt [%]						
101	0,21617	0,20861	0,19364	0,20614	0,01146	5,56
102	0,18829	0,20321	0,19241	0,19464	0,00770	3,96
103	0,17800	0,19613	0,18117	0,18510	0,00968	5,23
104	0,15618	0,12841	0,14234	0,14231	0,01389	9,76
105	0,20863	0,23018	0,21484	0,21788	0,01110	5,09
106	0,20470	0,19723	0,18945	0,19713	0,00763	3,87
107	0,53103	0,51295	0,52676	0,52358	0,00945	1,80
108	0,33286	0,34950	0,31311	0,33182	0,01821	5,49
109	0,17844	0,18111	0,16879	0,17611	0,00648	3,68
110	0,36220	0,38147	0,37619	0,37329	0,00996	2,67
Gesamtgehalt an Chromonglucosiden [%]						
101	0,46058	0,44515	0,42610	0,44394	0,01727	3,89
102	0,36908	0,39404	0,37528	0,37947	0,01300	3,43
103	0,32613	0,35932	0,34108	0,34218	0,01662	4,86
104	0,25440	0,21446	0,23680	0,23522	0,02002	8,51
105	0,30176	0,33189	0,30933	0,31432	0,01568	4,99
106	0,29580	0,28779	0,27855	0,28738	0,00863	3,00
107	0,65793	0,63853	0,65560	0,65068	0,01059	1,63
108	0,43186	0,45387	0,40885	0,43153	0,02251	5,22
109	0,28753	0,29190	0,27922	0,28622	0,00644	2,25
110	0,53228	0,55854	0,55164	0,54749	0,01361	2,49

5.9.2.2 HPTLC/Densitometrie

Nach Extraktion und Chromatographie (Abbildung 90) mit der neu entwickelten Methode-Gehaltsbestimmung (Tabelle 37) wurden die Proben aus bayerischem Anbau bei 300 nm densitometrisch vermessen und der Gehalt an PC und MV ermittelt (Tabelle 70). Die densitometrische Methode zeichnete sich durch ihren deutlich geringeren Lösemittelverbrauch und Zeitersparnis aus und ergab vergleichbare Ergebnisse zu den Bestimmungen mittels HPLC. Auch bei dieser Methode zeigte sich der hohe Gehalt an MV bei den Proben, die 2010 geerntet wurden.

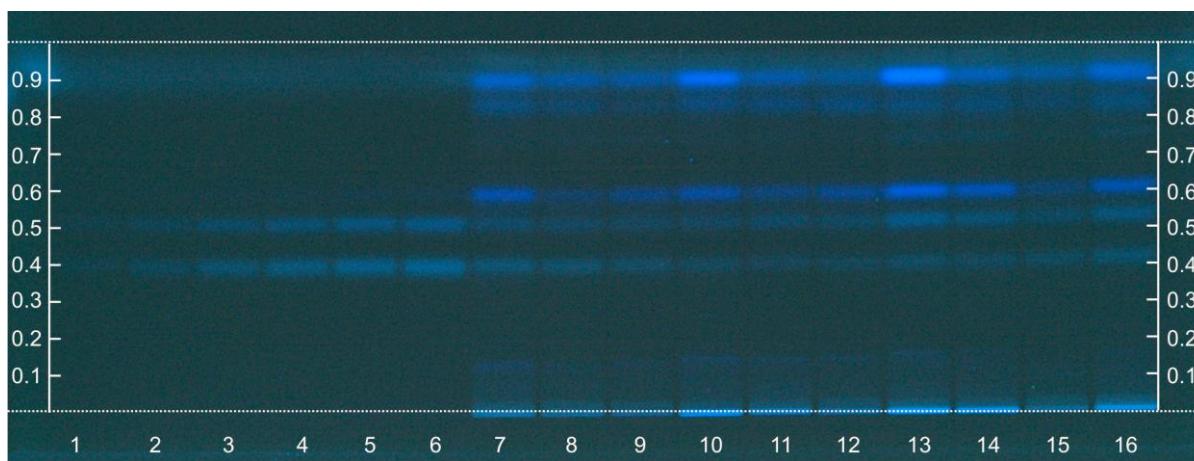


Abbildung 90: Densitometrische Untersuchung der bayerischen *Saposhnikoviae divaricatae radix* Proben: Bahn 1-6: Kalibrierlösungen von PC und MV in aufsteigender Konzentration jeweils 4 µl; Bahn 7-16: *Saposhnikoviae divaricatae radix* aus bayerischem Anbau, LfL 101-110, 4 µl, FM: Dichlormethan, Methanol, Acetonitril (4:2:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, 366 nm

Tabelle 70: Ergebnisse der Gehaltsbestimmung der Saposhnikoviae divaricatae radix Proben aus bayerischem Anbau mittels HPLC

Probenname	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwert	Stabw	V_k
PC, Gehalt [%]						
101	0,24374	0,2349	0,23314	0,23726	0,00568	2,40
102	0,18216	0,1942	0,18747	0,18795	0,00605	3,22
103	0,15368	0,1688	0,17400	0,16548	0,01055	6,38
104	0,10176	0,0886	0,10034	0,09691	0,00721	7,44
105	0,09874	0,1008	0,10414	0,10123	0,00272	2,69
106	0,08746	0,0936	0,09687	0,09264	0,00478	5,16
107	0,12964	0,1302	0,13163	0,13048	0,00103	0,79
108	0,10679	0,1097	0,09985	0,10545	0,00506	4,80
109	0,11354	0,1148	0,11583	0,11471	0,00114	1,00
110	0,17191	0,1811	0,18490	0,17930	0,00668	3,72
MV, Gehalt [%]						
101	0,22138	0,21197	0,19671	0,21002	0,01245	5,93
102	0,19774	0,20576	0,19424	0,19925	0,00590	2,96
103	0,18729	0,20149	0,19551	0,19476	0,00713	3,66
104	0,16250	0,13559	0,14812	0,14874	0,01346	9,05
105	0,22251	0,22722	0,22528	0,22500	0,00237	1,05
106	0,20478	0,20636	0,19784	0,20299	0,00454	2,23
107	0,52886	0,50845	0,49297	0,51009	0,01800	3,53
108	0,33714	0,34739	0,31117	0,33190	0,01867	5,62
109	0,19030	0,19016	0,17777	0,18608	0,00720	3,87
110	0,35290	0,36421	0,37057	0,36256	0,00895	2,47
Gesamtgehalt an Chromonglucosiden [%]						
101	0,46513	0,44659	0,42985	0,44719	0,01764	3,95
102	0,37990	0,39955	0,38171	0,38705	0,01086	2,81
103	0,34097	0,36972	0,36951	0,36007	0,01654	4,59
104	0,26426	0,23571	0,24846	0,24948	0,01430	5,73
105	0,32125	0,32734	0,32942	0,32600	0,00424	1,30
106	0,29224	0,29924	0,29471	0,29539	0,00355	1,20
107	0,65850	0,63799	0,62460	0,64036	0,01708	2,67
108	0,44393	0,45639	0,41102	0,43711	0,02344	5,36
109	0,30384	0,30425	0,29359	0,30056	0,00604	2,01
110	0,52481	0,54486	0,55546	0,54171	0,01557	2,87

5.9.2.3 Vergleich beider Methoden

Die Ergebnisse beider Gehaltsbestimmungsmethoden wurden mittels *t*-Test (SPSS Statistics Version 19, $P = 95\%$) bei unabhängigen Stichproben miteinander verglichen. Dazu wurden die gemessenen Werte des Gesamtgehalts an Chromonglucosiden der 10 Proben auf signifikante Unterschiede untersucht. Die statistische Auswertung ergab, dass sich die gemessenen Werte des Gesamtgehalts nicht signifikant voneinander unterschieden und beide Messmethoden verwendet werden können.

5.10 Diskussion der Ergebnisse-Saposhnikoviaawurzel

Das makroskopische Schnittbild von *Saposhnikoviae divaricatae radix* war bei den aus China stammenden Drogenproben sehr einheitlich. Die Wurzeldroge lag ausschließlich als quergeschnittene Scheiben mit unterschiedlicher Braunfärbung und deutlich sichtbarem „Chrysanthemenmuster“ im Inneren, was laut Materia Medica für eine gute Qualität der Droge spricht [135], vor. Die aus Deutschland stammende Droge hingegen lag zu geringem Teil als hellbraune quergeschnittene Scheiben, aber hauptsächlich als bis zu 10 cm langen Wurzelstücken von weicher Konsistenz und schwach bis mittlerem Geruch nach Karotten vor (5.3). Nach H. Heuberger (Bay. Landesanstalt für Landwirtschaft) ist derzeit die chinesische Schneidetechnik in Deutschland noch nicht durchführbar, da die Apparatur und das Knowhow fehlen, was aber durch Kooperationen mit Technischen Hochschulen behoben werden soll [154]. Das mikroskopische Bild der unterschiedlichen pulverisierten Muster (5.4) war hingegen sehr einheitlich, da in allen *Saposhnikoviae radix Pulvern* Apiaceen-typische schizogene Exkretgänge mit gelb-bräunlichem ätherischem Öl zu finden waren [155].

Um eine DC-Identitätsmethode für *Saposhnikoviae divaricatae radix* zu entwickeln, wurden Fingerprintanalysen von den bekannten Inhaltsstoffgruppen in *Saposhnikovia divaricata* durchgeführt. Nach Destillation und dünnsschichtchromatographischer Trennung der Komponenten des ätherischen Öls von *Saposhnikovia divaricata* wurde nach Derivatisierung mit Anisaldehyd bei 366 nm eine braune Hauptbande mit $R_F = 0,35$ bei allen Proben sichtbar (5.5.1.1). In mehreren Literaturstellen [146], [156] wird Panaxynol, oder auch Falcarinol genannt, als einer der Hauptinhaltsstoffe des ätherischen Öls beschrieben. Nach Absaugen der underivatisierten DC-Bande durch das TLC-MS Interface und Vermessen mittels APCI-MS konnte diese als Panaxynol identifiziert werden (5.8.3). Allerdings sind Polyacetylenen, wie Falcarinol, in der Familie der Apiaceae, zu denen auch die Verfälschungen mit Wurzel von *Daucus carota* und *Carum carvi* zählen, sehr häufig zu finden [150]. Damit war Panaxynol als Markersubstanz zur eindeutigen Identifizierung von *Saposhnikoviae divaricatae radix* nicht geeignet. Zudem zeigte die Wurzeldroge einen stark schwankenden Gehalt an ätherischem Öl von 0,2-1,78% sowie ein unterschiedliches GC-FID Spektrum der verschiedenen Handelsmuster (5.8). Yan et al. beschrieben 2009 ebenfalls abhängig vom Anbauort einen unterschiedlichen Gehalt an Falcarinol von 6,4-46,1% [157]. Die Verwendung von Falcarinol als Markersubstanz zur Identifizierung ist nicht praktikabel, obwohl antiinflammatorische Aktivitäten für die Verbindung beschrieben wurden [158], [156].

Die Wirksamkeit der Chromone bei rheumatoider Arthritis, die zu ca. 1% in *Saposhnikovia divaricata* vorkommen [138], ist gut belegt [159]. *Prim-O-glucosylcimifugin* und *4'-β-D-Glucosyl-5-O-methylvisamminol* weisen dabei den größten Anteil unter den Chromonen auf und werden als wirksamkeitsbestimmende Substanzen beschrieben [144]. Beide Chromone sind nach oraler Gabe im Plasma und im Urin von Ratten neben zwei unbekannten Metaboliten zu finden. Neuste Erkenntnisse zeigen, dass *Prim-O-glucosylcimifugin* von der humanen Darmflora zu dessen Aglykon Cimifugin durch β -Glucosidase gespalten und zu *5-O-Methylvisamminol* durch Reduktion der OH-Gruppe am C9 metabolisiert wird [160]. Beide Metaboliten zeigen höhere Radikalfänger und antiinflammatorische Eigenschaften als die Ausgangsverbindung. Zudem konnte für Cimifugin gezeigt werden, dass es im Caco-2-Zellmodell besser als die glucosidische Verbindung absorbiert wird [138]. Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten durch CYP P450 Hemmung sind für *Saposhnikoviae divaricatae radix* nicht bekannt [161].

Aufgrund der belegten Wirksamkeit, des Prodrugcharakters und des hohen Anteils wurden *Prim-O-glucosylcimifugin* (PC) und *4'-β-D-Glucosyl-5-O-methylvisamminol* (MV) als Markersubstanzen in der Monographie von *Saposhnikoviae divaricatae radix* im ChP 2005 und im aktuellen ChP 2010 verwendet. Das im ChP 2010 beschriebene Fließmittelsystem zeigte eine gute Auflösung zwischen den 2 Markersubstanzen und dem restlichen Fingerprint (5.5.1.2). Allerdings war die mobile Phase wegen ihres toxischen Chloroformanteils nicht für die Erarbeitung einer DAB-Monographie Methode verwendbar. Durch Ersatz des Chloroforms durch Dichlormethan und ACN konnte eine Methode entwickelt werden, durch die *Saposhnikoviae divaricatae radix* von den beschriebenen Verfälschungen *Carum carvi radix* und *Daucus carotae radix* unterschieden werden konnte (5.5.1.3). Die neu entwickelte Methode lieferte präzise, robuste und stabile Ergebnisse und wird zur Identitätsbestimmung C von *Saposhnikoviae divaricatae radix* für das DAB vorgeschlagen. Im Fingerprint war eine zusätzliche blau fluoreszierende Bande der bayerischen Droge auffallend, der dem Bandenmuster von *Daucus carota* der Wilden Möhre entsprach (Abbildung 58). Um eine generelle Verfälschung von *Saposhnikovia divaricata* und *Daucus carota* bei der deutschen Ware auszuschließen, wurden weitere Proben untersucht und *Daucus carota* bei verschiedenen Temperaturen getrocknet, um eine mögliche Artefaktbildung zu untersuchen. Die zusätzliche blaue Bande konnte in keiner der neuen Proben nachgewiesen werden was für eine zufällige Untermischung der Probe aus deutscher Herkunft spricht (5.9.1).

Saposhnikoviawurzel 190

Zur Gehaltsbestimmung von Chromonen wie PC und MV in *Saposhnikoviae divaricatae radix* sind bereits verschiedene Methoden beschrieben, die jedoch nicht zur Erstellung einer DAB-Monographie geeignet waren. Es handelt sich dabei meistens um LC-MS Methoden, die zwar geringe Nachweisgrenzen von 1,0 ng/ml [162] sowie akzeptable Validierungsparameter zeigten, jedoch aufgrund ihres hohen apparativen Aufwands für die Arzneibuchqualitätskontrolle nicht geeignet sind. Darüber hinaus finden sich auch HPLC-UV/DAD Methoden, allerdings mit schlechter Auflösung der Peaks, die somit nur in Kombination mit MS-Detektion nutzbar sind [163], oder eine zu lange Detektionszeit von 15 min besaßen [164]. Eine neue Methode zur Gehaltsbestimmung von PC und MV in *Saposhnikovia divaricata* musste daher entwickelt werden.

Einerseits wurde die HPLC-DAD Methode aus dem ChP 2005 und 2010 evaluiert und in Bezug auf die Retentionszeit, Auflösung und Detektionswellenlänge optimiert (5.7.1). Die neu entwickelte Methode wurde mit einer authentischen Handelsprobe aus Baicheng validiert und zeigte bei einer Trennzeit von 10 min akzeptable Validierungsparameter hinsichtlich Präzision, Linearität, Robustheit, Stabilität und Wiederfindung. Der Gehalt für die getrocknete Droge bei allen sieben Proben lag für PC bei 0,17-0,37% und MV bei 0,10-0,25%. Der in der ChP 2010 vorgeschriebene Mindestgehalt an PC und MV von 0,24% konnte in allen Proben erreicht werden. Den niedrigsten Gesamtgehalt von 0,31% besaß die Probe der Firma CaeLo, der höchste wurde bei Proben von Arobemed und Herbasinica gemessen (0,56%).

Als weitere Möglichkeit der Quantifizierung wurden beide Chromone mittels HPTLC/Densitometrie vermessen (5.7.2). Dazu wurden die Proben mit dem zur Identitätsprüfung C entwickelten Fließmittel chromatographiert und ohne Derivatisierung bei 300 nm densitometrisch vermessen. Eine Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz erhöhte die gemessene Peakintensität nur leicht und wurde wegen der anfallenden möglichen Fehlerquellen nicht zur Quantifizierung benutzt. Die Validierung der Trenn- und Messmethode wurde wiederum mit der authentischen Probe Baicheng durchgeführt und ergab Parameter, die in den gesetzten Grenzen lagen und für Präzision und Robustheit der Methode bessere Werte lieferten als die HPLC. Die Kalibrierfunktion zeigt häufig bei densitometrischer Messung keinen linearen Verlauf, da anders als bei der HPLC die Absorption des Analyten nicht in Lösung, sondern durch Reflektion von der HPTLC-Platte

vermessen wird. Das eingestrahlte Licht kann aus verschiedenen Schichten von Kieselgel reflektiert werden, was meistens einen polynomialen Verlauf der Kalibrierfunktion zur Folge hat [51]. Bei der densitometrischen Vermessung der beiden Chromone zeigte eine quadratische Funktion, im Gegensatz zur linearen Funktion bei der HPLC Methode, eine geringere Verfahrensstandardabweichung, d.h. eine geringere Streuung der Signalwerte in y-Richtung um die Ausgleichsgerade [62]. Der Gesamtgehalt an PC und MV betrug bei den HPTLC/Densitometrie Messungen 0,34-0,61%. Da der Anteil an PC und MV in der densitometrischen Bestimmung gegenüber der HPLC-Messung leicht erhöht war, wurden beide Gehaltsbestimmungsmethoden statistisch miteinander verglichen, um einen systematischen Fehler auszuschließen. Dazu wurden alle gemessenen Werte der sieben Proben jeweils für die HPLC und die HPTLC/Densitometrie Methode zusammengefasst und mittels *t*-Test für unabhängige Stichproben ($p = 0,05$) überprüft. Dieser ergab, dass die verschiedenen Gehalte nicht signifikant unterschiedlich und somit zufälliger Natur sind.

Um die Anwendbarkeit der beiden neu entwickelten quantitativen Bestimmungsmethoden zu überprüfen, wurden die zehn Proben verschiedener genetischer Herkunft aus bayerischem Anbau vermessen (5.9.2). Sowohl die HPLC als auch die HPTLC/densitometrische Methode lieferten vergleichbare, nicht signifikant unterschiedliche Ergebnisse. Der Gehalt an PC war bei allen Proben gleich, wohingegen sich der Anteil an MV je nach Anbaujahr stark voneinander unterschied. Dieser Zusammenhang ist in der Literatur bekannt [165] und unterstreicht die Bedeutung der Qualitätskontrolle der relevanten Inhaltsstoffe für *Saposhnikoviae divaricatae radix*, um eine gleichbleibende Wirksamkeit der Droge zu garantieren.

Saposhnikoviawurzel 192

6 Siegesbeckienkraut

6.1 Einleitung

Für die Droge *Siegesbeckiae herba* sind im ChP 2010 drei verschiedene Stammpflanzen, *Siegesbeckia glabrescens* MAKINO, *Siegesbeckia orientalis* L. und *Siegesbeckia pubescens* MAKINO, zugelassen. Die Gattung *Siegesbeckia* gehört zum Tribus Heliantheae der Familie Asteraceae und ist in den tropischen bis subtropischen Gebieten Asiens beheimatet [70]. Carl von Linné benannte die unscheinbare Pflanze 1737 in seinem Werk *Hortus Cliffortianus* [166] nach einem russischen Botaniker, Johann Georg Siegesbeck (1686-1755), der als Gegner seiner binären botanischen Nomenklatur galt [167]. *Siegesbeckia orientalis* besitzt im Gegensatz zu *S. glabrescens* und *S. pubescens*, die regelmäßig gezähnte Blätter zeigen, im oberen Teil gegabelte Äste und unregelmäßig gelappte Blätter und ist somit gut zu unterscheiden. *S. glabrescens* zeichnet sich durch kürzere Früchte (2 mm), beidseitig weich behaarte Blätter und das fehlen von Drüsenhaaren am Stängel aus. Wohingegen die Blätter von *S. pubescens* nur auf der Unterseite dicht behaart sind und deutliche Drüsensaare auf den Stängeln aufweisen [168].

Die Krautdroge wird bei rheumatoider Arthritis, Taubheitsgefühl der Extremitäten, halbseitiger Lähmung [169] und zur Behandlung des Bi Zheng-Syndroms (schmerhaftes Blockade-Syndrom), das sich in Stagnation und Schmerzen der Muskeln, Gelenke, Sehnen und Knochen äußert [16]. In der koreanischen Medizin wird *Siegesbeckiae herba* bei Asthma und allergischen Symptomen eingesetzt [170].

Zu den Hauptinhaltsstoffen zählen Diterpene und deren Glykoside des *ent*-Pimaran- und *ent*-Kaurantyps [171], Sesquiterpenlactone des Melampolidtyps [172], Sterole [173], Fettsäuren und deren Estern [174] sowie Mono-, Di- und Tri-methylierte Flavonoide [175].

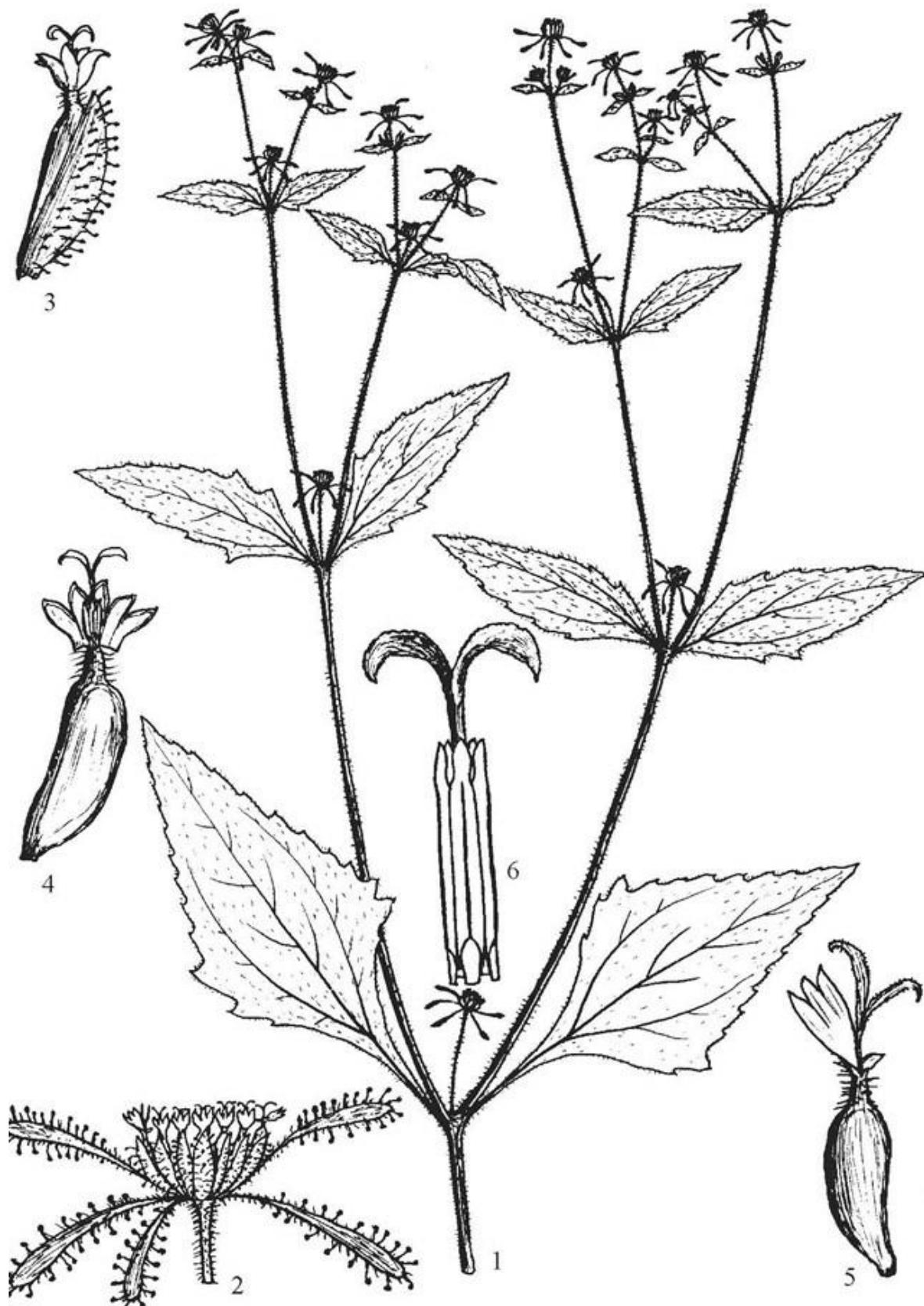


Abbildung 91: Illustration von *Siegesbeckia orientalis* L.; 1: Längsansicht der blühenden oberirdischen Teile, 2: Köpfchen mit inneren und äußeren Hüllblättern, 3: Röhrenblüte mit Hüllblatt, 4: Röhrenblüte, 5: Zungenblüte, 6: Staubblätter und Griffel [176]

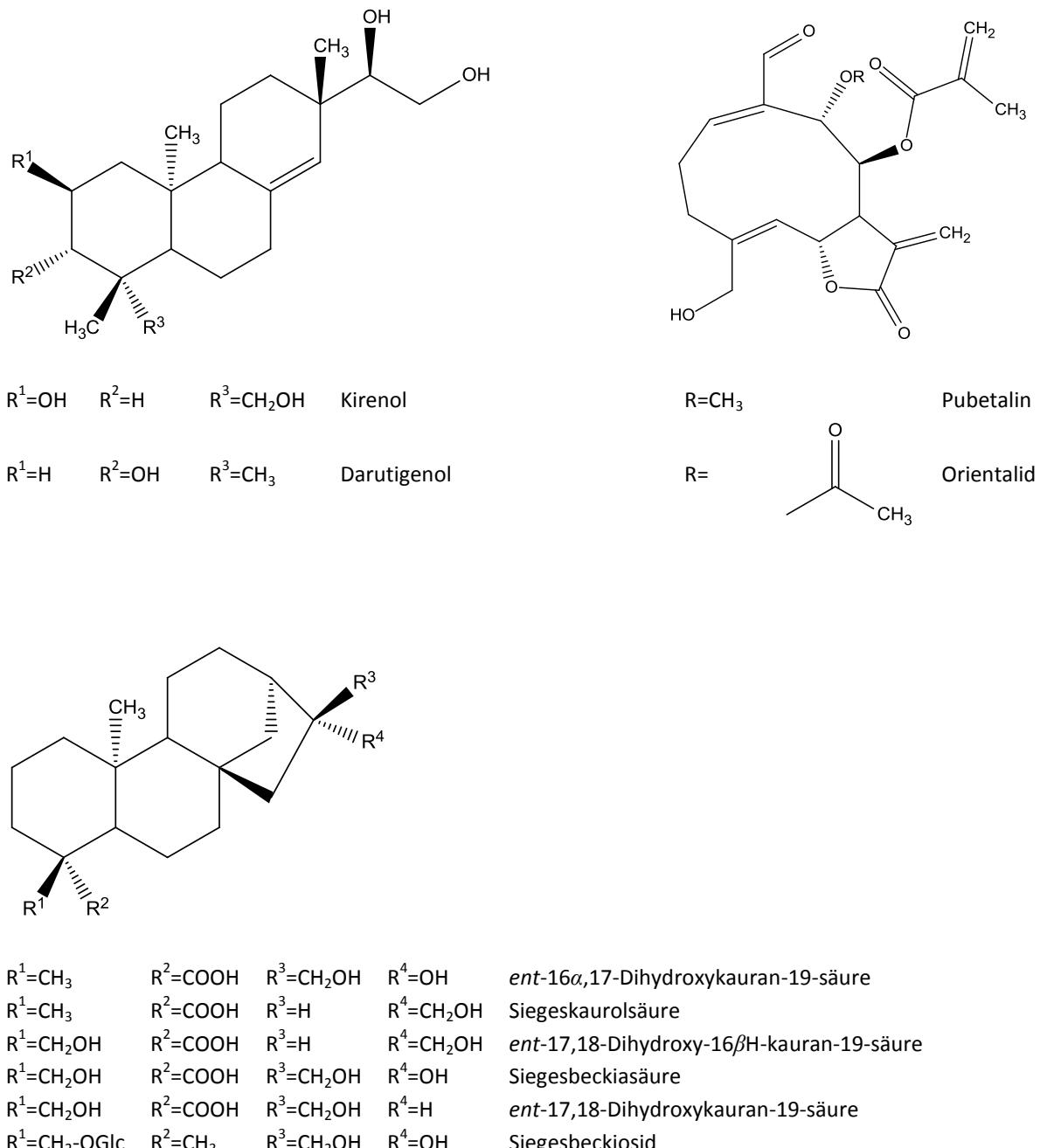


Abbildung 92: Inhaltsstoffe aus Siegesbeckiae herba

Die Wirksamkeit von *Siegesbeckiae herba* bei rheumatoider Arthritis ist gut untersucht. Bei oraler Gabe eines *Siegesbeckiae herba* Extraktes konnte bei Mäusen die Steifigkeit von Gelenken gesenkt und antiinflammatorische sowie analgetische Effekte gemessen werden [177]. Bei der topischen Anwendung einer Kirenol-haltigen halbfesten Zubereitung zeigte sich eine antiinflammatorische und analgetische Wirkung vergleichbar mit Piroxicam [178], weshalb das Diterpen vom *ent*-Pimarantyp als wirksamkeitsbestimmend gilt. Darüber hinaus erzielte eine p.o. Gabe von Kirenol eine verminderte Schwellung von Rattenpfoten und eine Reduzierung von inflammatorische Mediatoren wie IL-1 β und NF- κ B ähnlich wie Prednisolon, ohne dabei die Expression des Glucocorticoidrezeptors herunter zu regulieren und somit eine Therapieresistenz zu induzieren [179].

Darüber hinaus zeigten *Siegesbeckiae herba* Extrakte wundheilfördernde Eigenschaften, indem sie die Proliferation von Mausfibroblasten [180] und keratinozytischen Stammzellen [181] erhöhten. Nach bioaktivitätsgeleiteter Fraktionierung konnte in beiden Modellen ein Diterpen vom *ent*-Kaurantyp als wirksame Verbindung isoliert werden.

Die Anwendung von *Siegesbeckiae herba* bei Asthma in der Traditionellen Koreanischen Medizin wurde ebenfalls untermauert. Pharmakologische Untersuchungen belegten eine Hemmung der Histaminfreisetzung aus Mastzellen [170]. In vitro als auch in vivo wurde die Bildung von Immunglobulin E [182] in B-Zellen eines H₂O-Extraktes der ganzen Pflanze von *Siegesbeckia glabrescens* gehemmt.

Des Weiteren wurde eine antibakterielle Wirkung eines Methanol-Extraktes von *Siegesbeckia pubescens* gegen *Staphylococcus aureus* publiziert und die Wirksamkeit einem Fettsäureester zugeschrieben [174]. Kim et al. beschrieb zudem einen antidiabetischen Effekt eines *Siegesbeckia glabrescens* Extraktes und eines daraus isolierten *ent*-Kauran Diterpens [183].

Die klinische Wirkung von *Siegesbeckiae herba* (100 g) wurde bislang nur in Kombination mit *Angelicae sinensis radix* (30 g) bei Bi Zheng-Syndrom belegt [16].

6.2 Methoden

6.2.1 Dünnschichtchromatographie

Tabelle 71: Methoden zur dünnschichtchromatographischen Analyse von Siegesbeckiae herba

Methode	Herstellung Testlösung	Herstellung Referenzlösung	Fließmittel	Entwicklungsstrecke	Applikationsvolumen
Flavonoidglykoside	1,0 g pulverisierte Droge (355) mit 10 ml MeOH im Ultraschallbad für 30 min	1 mg Chlorogensäure und 1 mg Rutin in jeweils 10 ml MeOH	Ameisensäure: Essigsäure, H ₂ O, Ethylacetat (11:11:27:100)	6 cm	10 µl
Flavonoidaglyka	1,0 g pulverisierte Droge (355) mit 10 ml Hexan im Ultraschallbad für 30 min	1 mg Quercetin in 10 ml MeOH	Toluol, Ethylacetat, Ameisensäure (70:30:1)	6 cm	10 µl
Lipophile Komponenten	1,0 g pulverisierte Droge (355) mit 10 ml MeOH im Ultraschallbad für 30 min	-	Dichlormethan	6 cm	10 µl

Siegesbeckienkraut 198

Methode nach ChP 2010	1,0 g pulverisierte Droge (355) mit 10 ml MeOH im Ultraschallbad für 15 min	1 mg Kirenol in 10 ml MeOH	CHCl ₃ , MeOH (4:1)	6 cm	5 µl
Entwickelte Methode- Identität	1,5 g pulverisierte Droge (355) mit 10 ml MeOH Ultraschall für 30 min	1 mg Kirenol und 1 mg β-Sitosterol in jeweils 10 ml MeOH	Dichlormethan, MeOH (5:1)	6 cm	10 µl
Entwickelte Methode- Gehaltsbestimmung	1,0 g pulverisierte Droge (355) mit 50 ml MeOH bei 70 °C unter Reflux im Wasserbad erhitzt, filtriert und auf 50 ml auffüllen	Kirenol- siehe Kalibriergerade	Dichlormethan, MeOH (5:1)	6 cm	10 µl

6.2.2 Flüssigkeitschromatographie

Tabelle 72: Methoden zur flüssigkeitschromatographischen Untersuchung von Siegesbeckiae herba

Methode	Herstellung Testlösung	Fließmittel, Flussrate	Säule, Temperatur	Detektion	Injektions- volumen
Methode nach ChP 2005	1,0 g pulverisierte Droge (355) wurden mit 150 ml Petrolether (60-90 °C) 3 h mit Soxhlet extrahiert. Nachdem das Lösemittel verdampft war, wurde das Drogenmaterial mit 50 ml MeOH im Wasserbad unter Rückfluss für 2 h extrahiert	A: H ₂ O, B: ACN 95% 75% A, isokratisch, 1,0 ml/min	RP-18, 250 x 4,0 5 µm, 25°C	215 nm	20 µl
Methode nach ChP 2010	1,0 g pulverisierte (355) Droge wurden mit 50 ml MeOH für 5 h unter Rückfluss bei 70 °C extrahiert, filtriert und auf 50 ml mit Methanol aufgefüllt.	A: H ₂ O, B: ACN 95% 0-5 min: 95-76% A, 5-30 min 76% A, 1,0 ml/min	RP-18, 250 x 4,0 5 µm, 25°C	215 nm	20 µl
Neu entwickelte Methode	1,0 g pulverisierte (355) Droge wurden mit 50 ml MeOH für 30 min unter Rückfluss bei 70 °C extrahiert, filtriert und auf 50 ml mit MeOH aufgefüllt.	A: H ₂ O, B: ACN 95% 0-15 min: 75-60% A, 15-20 min 40-100%, 20-25 min: 100 %A, 25-30 min: 100-75%, 30-35 min: 75% A 1,0 ml/min	RP-18, 250 x 4,0 5 µm, 40°C	215 nm	10 µl

6.3 Makroskopische Beschreibung

Die verschiedenen Proben von Siegesbeckiae herba zeigen Unterschiede hinsichtlich ihrer Farbe, des Stängelanteils und der Größe der einzelnen Bestandteile. Das meiste Drogenmaterial ist von braungrüner Färbung, außer einem Muster aus deutschem Anbau (Abbildung 94), welches eine intensiv grüne Farbe und einen deutlich höheren Anteil an Blattfragmenten aufweist. Die Blattspreite ist häufig zusammengerollt, unregelmäßig gezähnt und 3-nervig. Die Stängel sind 0,3-3,5 cm lang und 0,3-1,5 cm breit mit längsverlaufenden Furchen und weißer Behaarung. An den Bruchstellen des Stängels erkennt man weißes Mark, teilweise ist der Stängel hohl. Die aus China importierte Droge der Firma Chinamedica (Abbildung 93) fällt durch besonders dicke und große Stängelstücke auf. Im Gegensatz dazu bestehen die anderen Muster (Abbildung 94-Abbildung 95) aus klein geschnittenen Stängeln und Blättern. Teilweise finden sich Blütenköpfchen mit gelben Zungen- und Röhrenblüten und lanzettlichen Hüllblättern (Abbildung 96).



Abbildung 93: Chinesischer Import (Chinamedica), hoher Stängelanteil, Stängel-Ø 0,3-1,2 cm



Abbildung 94: Deutscher Anbau, hoher Blattanteil, Stängel-Ø 0,3-0,5 cm



Abbildung 95: Chinesischer Import (Sinophyto), Stängel-Ø 0,3-0,8 cm



Abbildung 96: Chinesischer Import (Herbasinica), Blütenköpfchen (Asteraceenblüte mit Zungen- und Röhren-blüten)

6.4 Mikroskopische Beschreibung

Die Droge wurde pulverisiert, gesiebt (Sieb mit 355 µm Maschenweite, [53]) und mit Chloralhydrat-Lösung *R* aufgehellt. Das Pulver ist graugrün oder graubraun und zeigt anomocytische Spaltöffnungen [90] (Abbildung 97), Leitgewebsfragmente (Abbildung 98) aus Stängeln und Blattnerven und kugelförmige, etwa 25 µm große Pollenkörner (Abbildung 99) mit stacheliger Exine und 3 Keimporen. Des Weiteren sind 2-reihige, mehrzellige Drüsenhaare vom Asteraceentyp (Abbildung 100) und einreihige, vielzellige Deckhaare, die spitz und gekrümmt zulaufend und 200-400 µm lang (Abbildung 101) sind, zu finden. Die für Siegesbeckiaarten typischen [184] Drüsenhaare, 200-800 µm lang, mit vielzelligem Stiel und vielzelligem Köpfchen (Abbildung 102), wobei das Köpfchen abgebrochen sein kann (Abbildung 103), sind feststellbar.

Siegesbeckienkraut 202

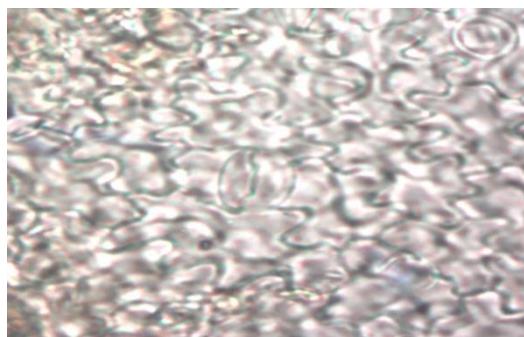


Abbildung 97: Spaltöffnung, 200-fache Vergrößerung



Abbildung 98: Leitgewebe, 200-fache Vergrößerung



Abbildung 99: Pollenkorn, 200-fache Vergrößerung



Abbildung 100: Asteraceendrüsenhaar, 200-fache Vergrößerung



Abbildung 101: einreihiges, vielzelliges Deckhaar, 200-fache Vergrößerung



Abbildung 102: mehrzelliges Drüsenhaar mit Köpfchen, 200-fache Vergrößerung



Abbildung 103: mehrzelliges Drüsenhaar ohne Köpfchen, 100-fache Vergrößerung

6.5 Dünnschichtchromatographische Untersuchung

6.5.1 Untersuchung verschiedener Fingerprints

Zur Identifizierung von Siegesbeckiae herba wurden zunächst Fingerprints verschiedener Stoffgruppen angefertigt und auf mögliche Markersubstanzen überprüft. Bekannte Inhaltsstoffe sind nach Chinese Materia Medica [185] ätherisches Öl, Terpene, insbesondere Diterpene vom *ent*-Pimaran-und *ent*-Kauran-Typ [173] sowie Flavonoidaglyka [186].

6.5.1.1 Flavonoide

Obwohl bis jetzt nur apolare Flavonoidaglyka und methylierte Flavonoide [187] aus Siegesbeckiae herba isoliert wurden, wurden sowohl die Flavonoidaglyka als auch das Flavonoidglykosidspektrum evaluiert.

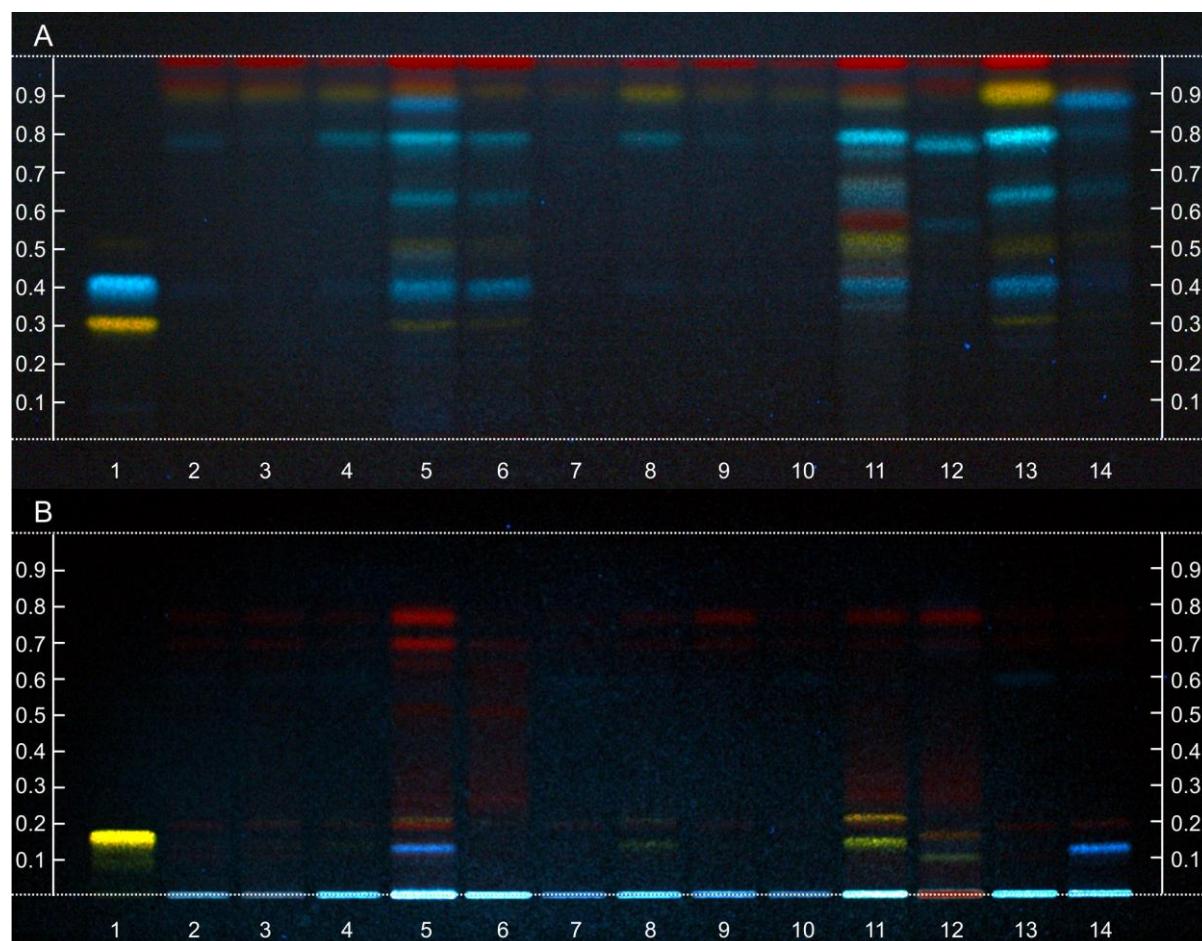


Abbildung 104: Flavonoidfingerprint, A. Glykoside, B: Aglyka; Bahn 1: Referenzen, A: Chlorogensäure, Rutin, B: Quercetin, 10 µl; Bahn 3, 4, 7-10: Siegesbeckiae herba Extrakt aus chinesischem Anbau, 10 µl; Bahn 5, 6: Siegesbeckiae herba Extrakt aus bayerischem Anbau, 10 µl; Bahn 11-13: Extrakte von *Siegesbeckia glabrescens*, *Siegesbeckia orientalis*, *Siegesbeckia pubescens*, jeweils 10 µl, Bahn 14: Extrakt der „Wine-processed drug“, 10 µl; FM: A: Ameisensäure, Essigsäure, Wasser, Ethylacetat (1:1:1:27:100), B: Toluol, Ethylacetat, Ameisensäure (70:30:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Naturstoff-/Macrogolreagens, 366 nm

Dazu wurden aus den Siegesbeckia-Proben nach Tabelle 71 (Flavonoidglykoside und Aglyka) extrahiert, chromatographiert und anschließend mit Naturstoff-/Macrogolreagens derivatisiert. Im Flavonoidglykosid-Chromatogramm (Abbildung 104 A) zeigte das Material aus Deutschland (Bahn 5, 6) sowie die Probe von *S. glabrescens* und *S. pubescens* (Bahn 11, 13) aus China eine schwache blau fluoreszierende Chlorogensäurebande bei $R_F = 0.4$. Im Inhaltsstoffmuster der weiteren Handelsproben hingegen zeigte sich eine orange

fluoreszierende Bande im oberen R_F -Bereich ($R_F = 0,92$), weshalb das Flavonoidaglykamuster untersucht wurde. In Abbildung 104 B sind nur schwach fluoreszierende Banden auf Höhe von Quercetin zu erkennen, die nicht in allen Proben vorhanden waren. Daher konnte der Flavonoidfingerprint nicht zur Identitätsbestimmung von *Siegesbeckiae herba* herangezogen werden.

6.5.1.2 Lipophile Komponenten

Der Fingerprint der lipophilen Komponenten (Tabelle 71, Lipophile Komponenten), zu denen insbesondere das ätherische Öl gehört, zeigte in allen Proben nach Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz keine charakteristische Bande (Abbildung 105), die als Markersubstanz verwendet werden konnte. Das Spektrum des ätherischen Öls in *Siegesbeckiae herba* wurde bis jetzt noch nicht im Detail untersucht. Lediglich eine verwandte Art *Siegesbeckia jorullensis* KUNTH wurde analysiert und wies Germacren D (13,6%) und ein nicht näher bezeichnetes oxygeniertes Diterpen (12,4%, m/z 309) als Hauptinhaltsstoffe auf.

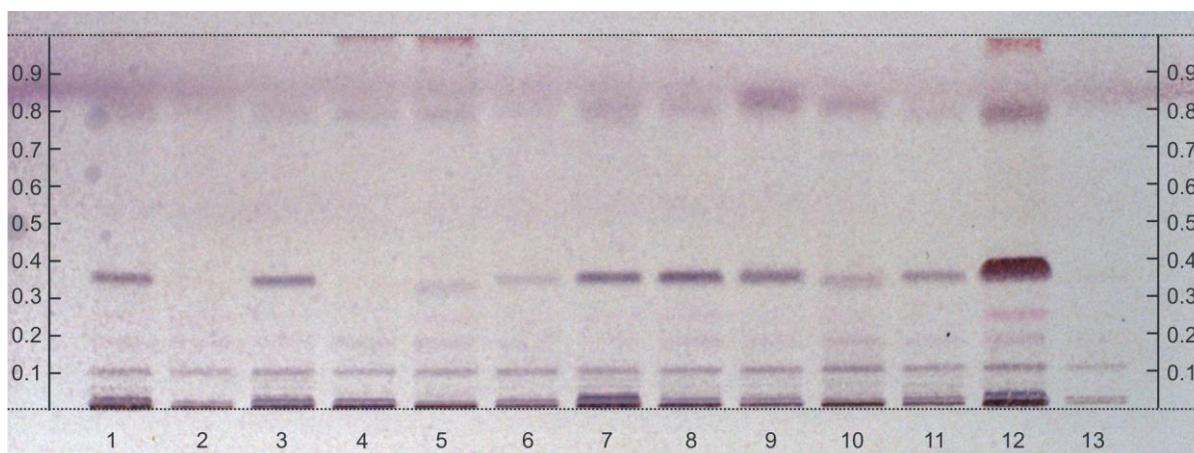


Abbildung 105: Lipophile Komponenten; Bahn 1-3, 6-9: *Siegesbeckiae herba* Extrakt aus chinesischem Anbau, 10 µl; Bahn 4, 5: *Siegesbeckiae herba* Extrakt aus bayerischem Anbau, 10 µl; Bahn 10-12: Extrakte von *Siegesbeckia glabrescens*, *Siegesbeckia orientalis*, *Siegesbeckia pubescens*, jeweils 10 µl, Bahn 13: Extrakt der „Wine-processed drug“, 10 µl; FM: Dichlormethan, Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, Weißlicht

Jedoch wurde in der Literatur gezeigt, dass es sich bei den wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen wahrscheinlich um Diterpene vom *ent*-Pimaran-Typ handelt [178]. Insbesondere Kirenol [179], [188] zeigt analgetische und antiinflammatorische Effekte weshalb es im ChP 2010 als Referenzsubstanz verwendet wird.

6.5.2 Evaluation der Monographie von Siegesbeckiae herba im ChP 2010

Um die Handelsproben auf die in der Monographie Siegesbeckiae herba des ChP 2010 [169] verwendete Markersubstanz Kirenol zu testen, wurde das Pflanzenmaterial nach Tabelle 71, (Methode ChP 2010) extrahiert, chromatographiert und anschließend mit Vanillinreagenz nach ChP 2010 derivatisiert (Abbildung 106). Die Referenzsubstanz Kirenol (Bahn 1) zeigte eine scharfe blau-violette Bande bei $R_F = 0,37$, die in allen Krautdrogen, jedoch nicht in Granulat (Bahn 3) zu finden war.

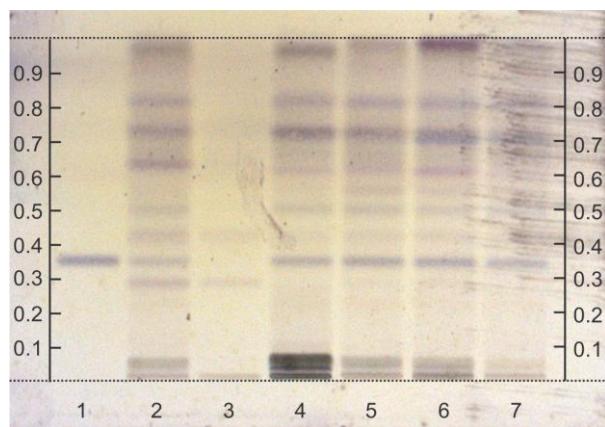


Abbildung 106: Identitätsbestimmung nach ChP 2010; Bahn 1: Referenz Kirenol 5 µl; Bahn 2, 5-7: Siegesbeckiae herba Extrakt aus chinesischer Herkunft, 5 µl; Bahn 3: Siegesbeckiae herba Granulat Extrakt (Chinamedica), 5 µl; Bahn 4: Siegesbeckiae herba Extrakt aus bayerischem Anbau, 5 µl; FM: Chloroform, Methanol (4:1), Entwicklungsdistanz 6 cm; derivatisiert mit Vanillinreagenz nach ChP 2010, Weißlicht

Trotz der guten Auflösung der Kirenolbande zum Rest des Fingerprints musste die mobile Phase gerändert werden. Aus toxikologischen Gründen wird CHCl_3 nicht mehr als Bestandteil von mobilen Phasen verwendet und muss durch weniger giftigere Lösungsmittel ersetzt werden. Darüber hinaus ist das Vanillinreagenz nach ChP 2010 schwierig in der Handhabung und Entsorgung, da es aus reiner Schwefelsäure besteht, weshalb andere Derivatisierungsreagenzien getestet wurden.

6.5.2.1 Optimierung

Nach mehreren Vorversuchen zeigte sich, dass CHCl_3 durch das weniger toxische [152] Dichlormethan ersetzt werden kann. Das neu entwickelte Fließmittel (Tabelle 71, Neue Methode) ergab nach Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz eine scharfe blau-violette Kirenolbande, die von restlichen Fingerprintkomponenten getrennt war (Abbildung 107). Um die chromatographische Trennung beurteilen zu können, wurde nach Wagner [189] β -Sitosterol mit einem $R_F = 0,82$ als zweite Referenz verwendet.

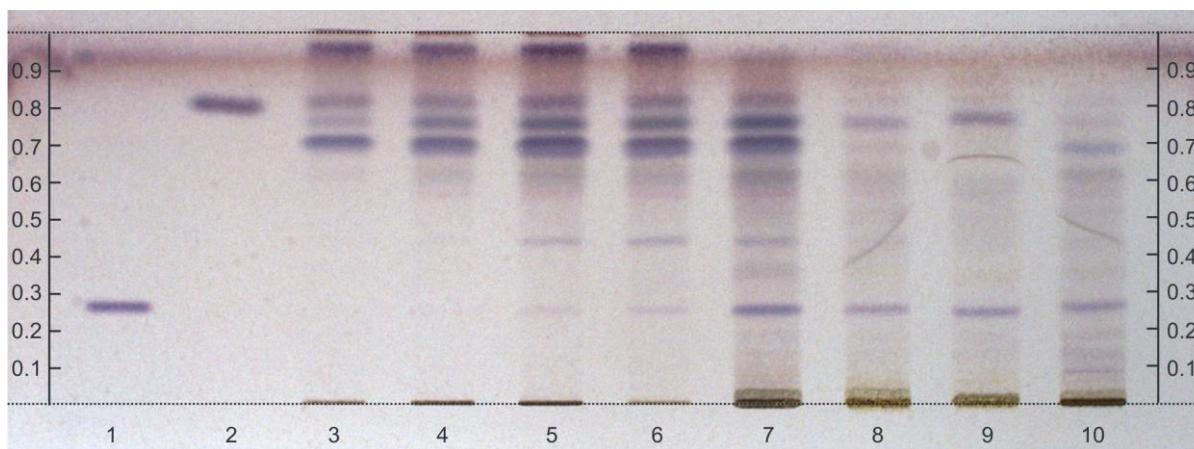


Abbildung 107: Variation der Extraktionsmittel; Bahn 1, 2: Referenzen Kirenol und β -Sitosterol, 10 µl, Bahn 3-10: Siegesbeckiae herba Extrakt mit verschiedenen Extraktionsmitteln: Heptan, Toluol, Dichlormethan, Aceton, Methanol, Wasser, Essigsäure: Wasser 1:9, Ammoniak: Wasser 1:9, jeweils 10 µl; FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, Weißlicht

Durch Extraktion von 1,0 g Drogenmaterial mit verschiedenen Lösungsmitteln konnte gezeigt werden, dass MeOH am besten geeignet ist, um die beiden Markersubstanzen zu extrahieren. Das Auftragen von 10 µl methanolischem Extrakt auf die HPTLC-Platte in 8 mm breiten Banden erbrachte die schärfsten Banden und wurde zur weiteren Chromatographie verwendet.

6.5.2.2 Validierung

Das neu entwickelte Fließmittelsystem mit anschließender Derivatisierung durch Anisaldehydreagenz (Tabelle 71, Neu entwickelte Methode-Identität) wurde zur Identitätsprüfung für Siegesbeckiae herba analog des Validierungsprotokolls 3.6.10 validiert um zu gewährleisten, dass die Methode robust, richtig und präzise war.

6.5.2.2.1 Stabilität der Testlösung während der Chromatographie

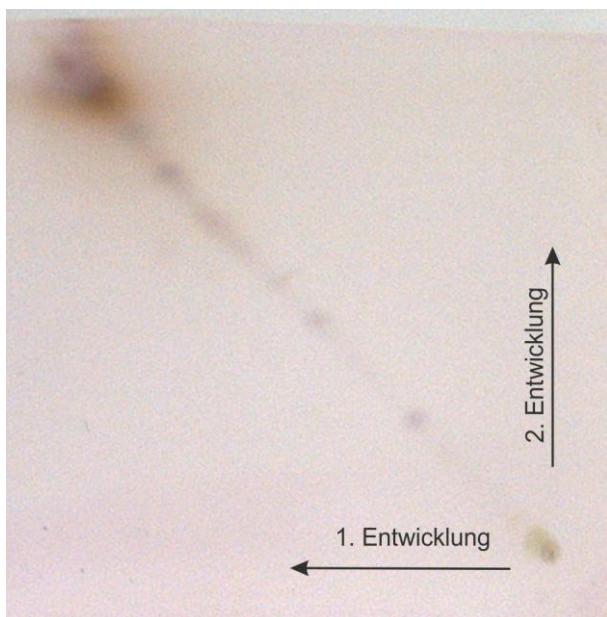


Abbildung 108: 2D-Chromatogramm von Siegesbeckiae herba, 3 µl Testlösung, FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, Weißlicht

Authentisches Probenmaterial aus China wurde extrahiert. Davon wurde 3 µl der Testlösung punktförmig an dem rechten unteren Plattenrand einer 10 x 10 cm Platte (1 cm von jedem Ende) aufgetragen. Die Platte wurde entwickelt und getrocknet nach Methode Tabelle 71 (Neu entwickelte Methode-Identität). Nach der ersten Entwicklung wurde die Platte um 90° gedreht, nochmals mit frischem Fließmittel entwickelt, danach mit Anisaldehydreagenz derivatisiert und bei Weißlicht dokumentiert. Der Test auf Stabilität während der Chromatographie wurde akzeptiert, da alle sichtbaren Banden im Chromatogramm auf der Winkelhalbierenden lagen und somit keine Abbaureaktion während der Chromatographie stattfindet (Abbildung 108).

6.5.2.2.2 Stabilität der Testlösung in Lösung und auf der Platte

Authentisches Probenmaterial aus China wurde extrahiert und 10 µl auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Danach wurde die Platte in Alufolie eingewickelt und mit der Testlösung 3 h bei Raumtemperatur gelagert. Dieselbe Droge wurde nochmals extrahiert und ebenfalls auf dieselbe Platte aufgetragen. Nach der Chromatographie und Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz zeigten sich bei Weißlicht keine Veränderungen in Lage und Intensität des Fingerprints (Abbildung 109).

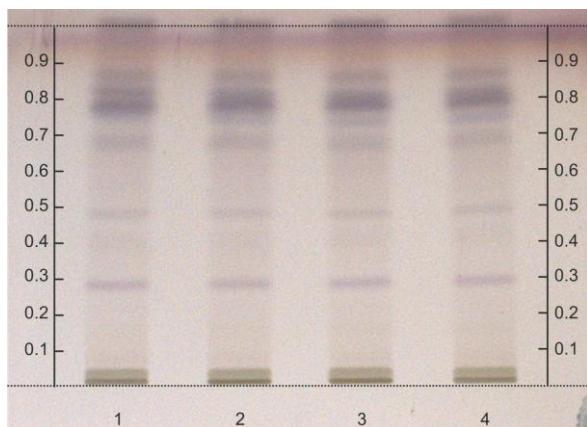
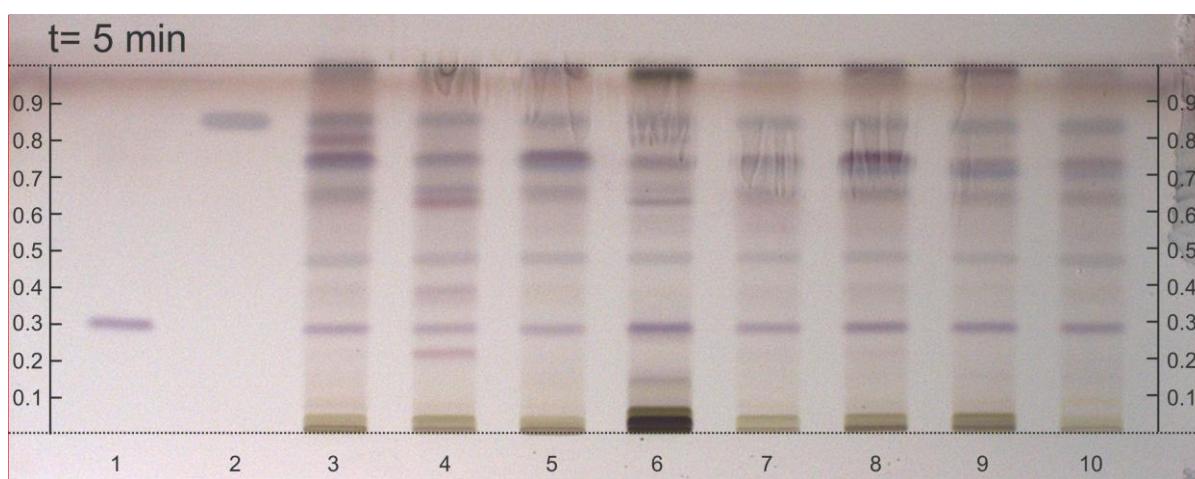


Abbildung 109: Stabilität auf der Platte und in Lösung, Bahn 1: Siegesbeckiae herba Extrakt 3 h auf der Platte, Bahn 2, 3: frischer Siegesbeckiae herba Extrakt, Bahn 4: Siegesbeckiae herba Extrakt 3 h in Lösung jeweils 10 µl, FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, Weißlicht

6.5.2.2.3 Stabilität der Ergebnisse der Derivatisierung

Um die Stabilität der Ergebnisse zu beurteilen, wurde die HPTLC Platte direkt nach der Detektion mit Anisaldehydreagenz, nach 5, 10, 15, 30 und 60 min bei Weißlicht dokumentiert. Die Ergebnisse der Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz waren stabil, da sich auch nach 60 min (Abbildung 110) keine Unterschiede bezüglich der Lage und Anzahl der Banden zeigten. Die Intensität der Banden nahm in 60 min geringfügig ab. Allerdings sind alle Zonen noch deutlich zu erkennen.



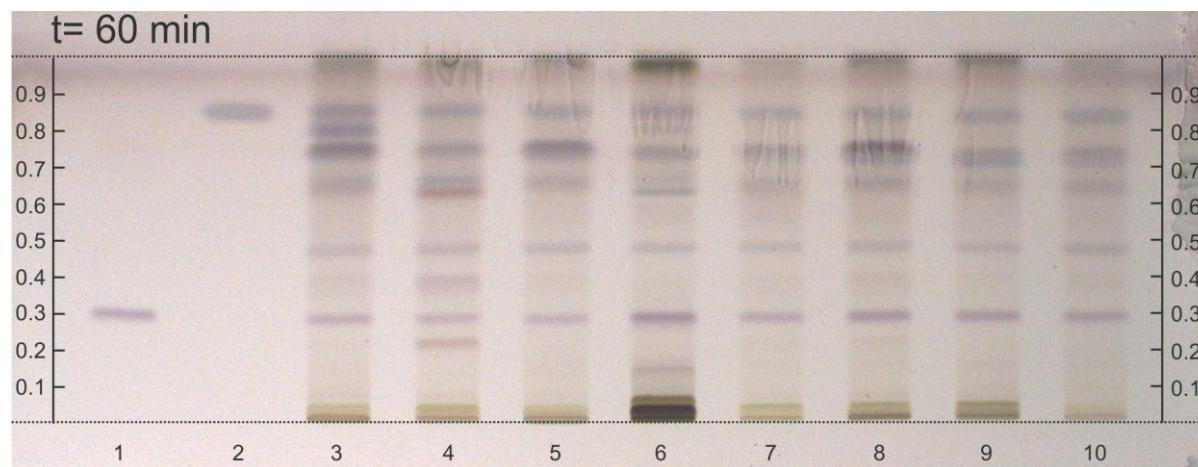


Abbildung 110: Stabilität der Derivatisierung nach $t = 5$ und 60 min ; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen: Kirenol und β -Sitosterol, jeweils $10 \mu\text{l}$, Bahn 3-5, 7-10: Siegesbeckiae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils $10 \mu\text{l}$; Bahn 6: Siegesbeckiae herba aus deutscher Herkunft, $10 \mu\text{l}$; FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm , derivatisiert mit Anisaldehydreaktanz, Weißlicht

6.5.2.2.4 Spezifität

6.5.2.2.4.1 HPTLC-Identifizierung von Siegesbeckiae herba Proben durch Vergleich mit authentischen Drogenproben und Referenzsubstanzen

Mehrere Muster von Siegesbeckiae herba aus deutschen und chinesischen Herkünften wurden extrahiert und zusammen mit den Referenzlösungen Kirenol und β -Sitosterol chromatographiert (Abbildung 111). Nach Derivatisierung mit Anisaldehyd zeigten alle 8 Handelsproben (Bahn 2-9) blau-violette Banden bei $R_F = 0,28$ und $0,82$ entsprechend der Kirenol- und der β -Sitosterolbande (Bahn 1), die ihn ihrer Intensität variierten, aber gut zu erkennen waren. Bei den Proben aus Xinmin City (Bahn 10-13) zeigte nur *Siegesbeckia pubescens* (Bahn 11) eine gut erkennbare und *Siegesbeckia orientalis* (Bahn 10) eine schwache Kirenolbande. Bei der „wine-processed“ Droge (Bahn 13) und bei *Siegesbeckia glabrescens* (Bahn 12) war hingegen keine blau-violette Bande bei $R_F = 0,28$ sichtbar. Auch Wagner beschreibt in seinen Untersuchungen zu Siegesbeckiae herba [189] das Fehlen der Markersubstanz in zwei der drei möglichen Stammpflanzen der Droge. Da jedoch Kirenol in der Monographie des ChP 2010 [169] als Markersubstanz für alle drei Stammpflanzen verwendet wird und es sich bei den Mustern aus Xinmin City um keine botanische Referenz handelte, wurde der Test auf Spezifität akzeptiert.

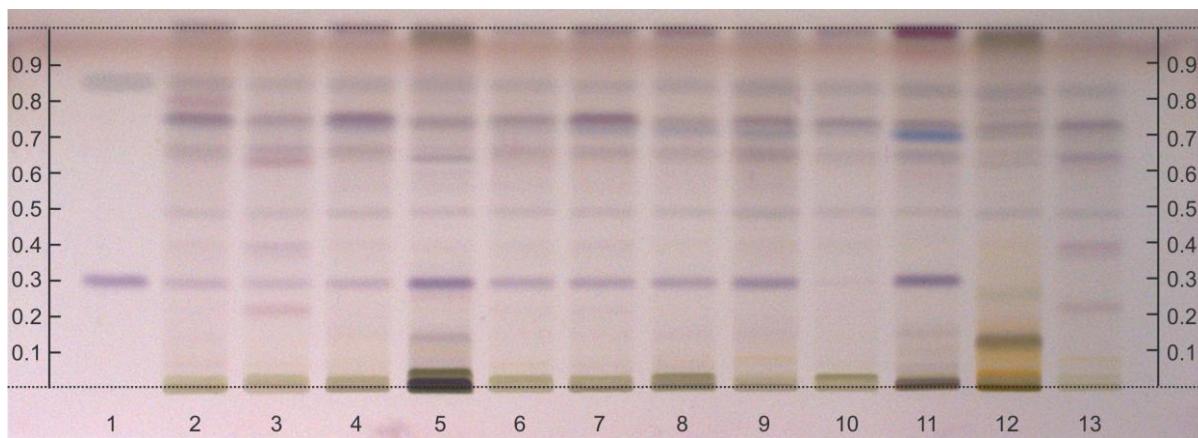


Abbildung 111: Spezifität; Bahn 1: Referenzsubstanzen: Kireno und β -Sitosterol, jeweils 10 μ l, Bahn 2-4, 6-9: Siegesbeckiae herba Extrakt aus chinesischem Anbau, 10 μ l; Bahn 5: Siegesbeckiae herba Extrakt aus bayerischem Anbau, 10 μ l; Bahn 10-12: Extrakte von *Siegesbeckia orientalis*, *Siegesbeckia pubescens*, *Siegesbeckia glabrescens* jeweils 10 μ l, Bahn 13: Extrakt der Wine-processed drug, 10 μ l; FM: Dichlormethan, Methanol, (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, 366 nm

6.5.2.2.4.2 Detektion von Verfälschungen

Die in der Materia Medica für Siegesbeckiae herba [185] gelisteten Verfälschungen *Bidens bipinnata*, *Epimeredi indicus* (= *Anisomeles indicus*) und *Phlomis umbrosa* konnten nicht erworben werden. Da alle vorhandenen Handelsmuster einen ähnlichen Fingerprint zeigten (Abbildung 112), kann davon ausgegangen werden, dass keine der 3 Verfälschungen vorliegt. In der Literatur sind für *Bidens bipinnata* als Hauptinhaltsstoffe Flavonoide sowie Acetylenglykoside [190] und das Fehlen von Diterpenen beschrieben. Die Pflanze gehört zu den Asteraceen, besitzt aber doppelt gefiederte Blätter [185] und kann somit makroskopisch gut von Siegesbeckiae herba unterschieden werden. Bei *Epimeredi indicus* und *Phlomis umbrosa* handelt es sich um 2 Lamiaceen, bei denen Diterpene vom Cembran-Typ und bei einer verwandten Phlomisart *Phlomis medicinalis* Diterpenglykoside vom Clerodan-Typ isoliert wurden [191], [192]. Die Verwechslungsgefahr mit *Epimeredi indicus* scheint am größten zu sein, da laut Easily Confused Chinese Medicines in Hong Kong [193] die Droge sowohl unter dem Namen Fang Feng Cao als auch Xi Xian Cao im Werk Ling Nan Cai Yao Lu [194] beschrieben wird. Beide Drogen lassen sich allerding makroskopisch sehr gut voneinander unterscheiden, da Herba Epimeredi indicae im Gegensatz zu Siegesbeckiae herba vierkantige Stängel besitzt [185].

Siegesbeckienkraut 212

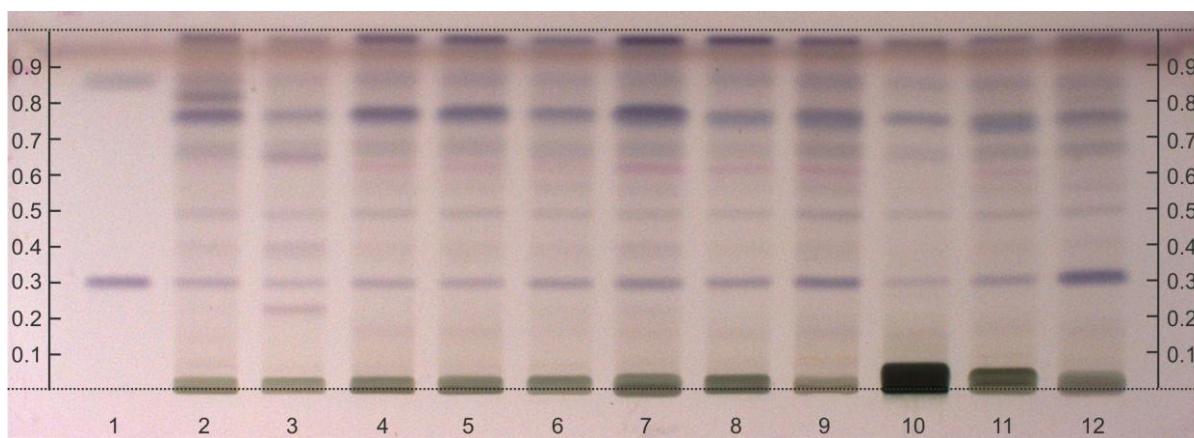


Abbildung 112: Detektion von Verfälschungen; Bahn 1: Referenzsubstanzen Kirenol und β -Sitosterol jeweils 10 μ l; Bahn 2-4, 6-12: Siegesbeckiae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 10 μ l; Bahn 5: Siegesbeckiae herba Extrakt aus deutschem Anbau jeweils 10 μ l; FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, Weißlicht

6.5.2.2.5 Wiederholpräzision

Sieben authentische Handelsproben aus China und eine Probe aus deutschem Anbau wurden dreimal eingewogen, extrahiert und mit jeweils frischem Fließmittel chromatographiert (Abbildung 113). Der mittlere R_F -Wert der Markersubstanzen Kirenol und β -Sitosterol wurde bei Weißlicht nach Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz ermittelt. Die neu entwickelte Methode zeigte dreimal an einem Tag (Tabelle 73) homogene Werte, die um weniger als 0,03 R_F -Einheiten schwankten. Die Lage und Intensität aller Banden im Fingerprint waren identisch. Der Test auf Wiederholpräzision wurde akzeptiert.

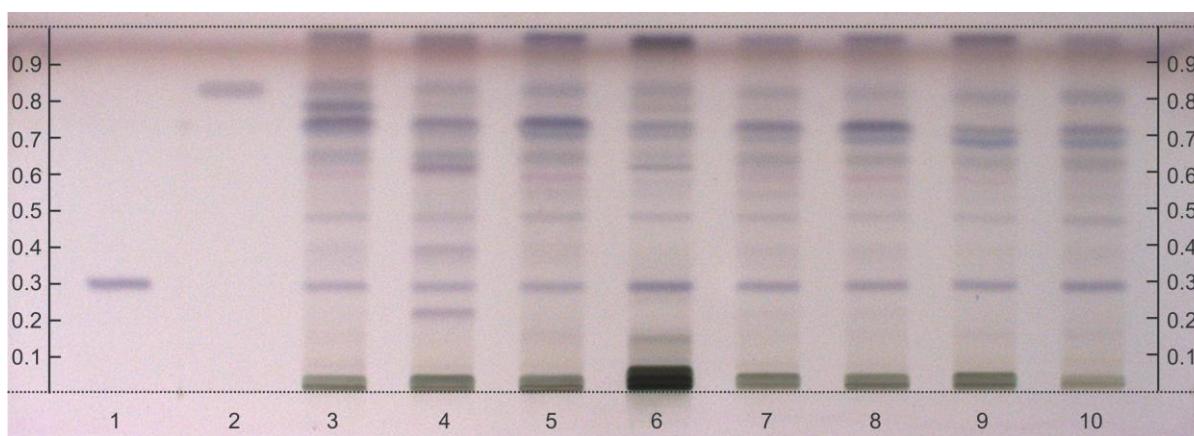


Abbildung 113: Wiederholpräzision Platte Siegesbeckia_20130304_03; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen: Kirenol und β -Sitosterol, jeweils 10 μ l; Bahn 3-5, 7-10: Siegesbeckiae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 10 μ l; Bahn 6, 8: Siegesbeckiae herba Extrakt aus deutscher Herkunft, 10 μ l; FM: Dichlormethan, Methanol, (4:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehyd, Weißlicht

Tabelle 73: Ergebnisse der Wiederholpräzision der Prüfung auf Identität von Siegesbeckiae herba durch HPTLC-Fingerprint

R_F	20130304_01	20130304_02	20130304_03	ΔR_F
Kirenol	0,28	0,27	0,27	0,01
β -Sitosterol	0,83	0,82	0,84	0,02

6.5.2.2.6 Laborpräzision

Zur Überprüfung der Laborpräzision wurden die acht verschiedenen Handelsproben an drei aufeinanderfolgen Tagen unabhängig voneinander eingewogen, extrahiert und mit frischem Fließmittel entwickelt. Der Test auf Laborpräzision wurde akzeptiert, da sich nach Derivatisierung mit Anisaldehyd keine Änderung der Intensität und Lage der Banden von Kirenol und β -Sitosterol (Abbildung 114) ergab, die mehr als 0,05 R_F -Einheiten (Tabelle 74) betrug.

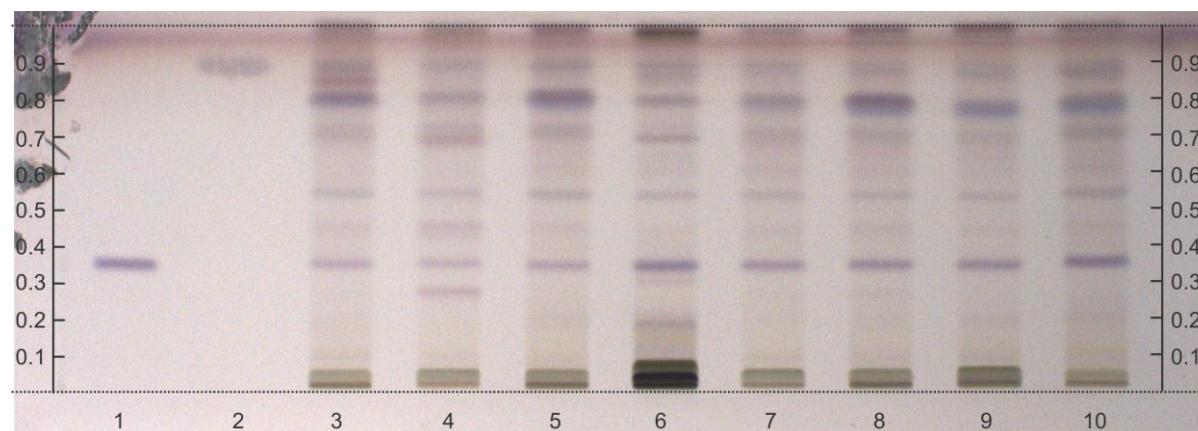


Abbildung 114: Laborpräzision, Platte Siegesbeckia_20130228_03; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen: Kirenol und β -Sitosterol, jeweils 10 μ l; Bahn 3-5, 7-10: Siegesbeckiae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 10 μ l; Bahn 6, 8: Siegesbeckiae herba Extrakt aus deutscher Herkunft, 10 μ l; FM: Dichlormethan, Methanol, (4:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehyd, Weißlicht

Tabelle 74: Ergebnisse der Laborpräzision der Prüfung auf Identität von Siegesbeckiae herba durch HPTLC-Fingerprint

R_F	20130228_03	20130301_01	20130304_01	ΔR_F
Kirenol	0,32	0,27	0,28	0,05
β -Sitosterol	0,84	0,82	0,83	0,02

6.5.2.2.7 Robustheit

6.5.2.2.7.1 Verschiedener Kammer-/Platten-Typ

Zur Robustheitsuntersuchung wurde die chromatographische Trennung auf einer DC-Platte in einer Flachbodenkammer bis zu einer Entwicklungsstrecke von 10 cm durchgeführt. Nach Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz (Abbildung 115) wurde die Lage der Banden und die Farbintensität mit der ersten Platte der Wiederholpräzision (Siegesbeckia_20130304_01) verglichen (Tabelle 75). Die R_F -Werte der Referenzsubstanzen Kirenol und β -Sitosterol zeigten eine Abweichung von weniger als 0,06 R_F -Einheiten. Damit kann die Methode sowohl mit HPTLC als auch mit DC-Platten in unterschiedlichen Kammern durchgeführt werden.

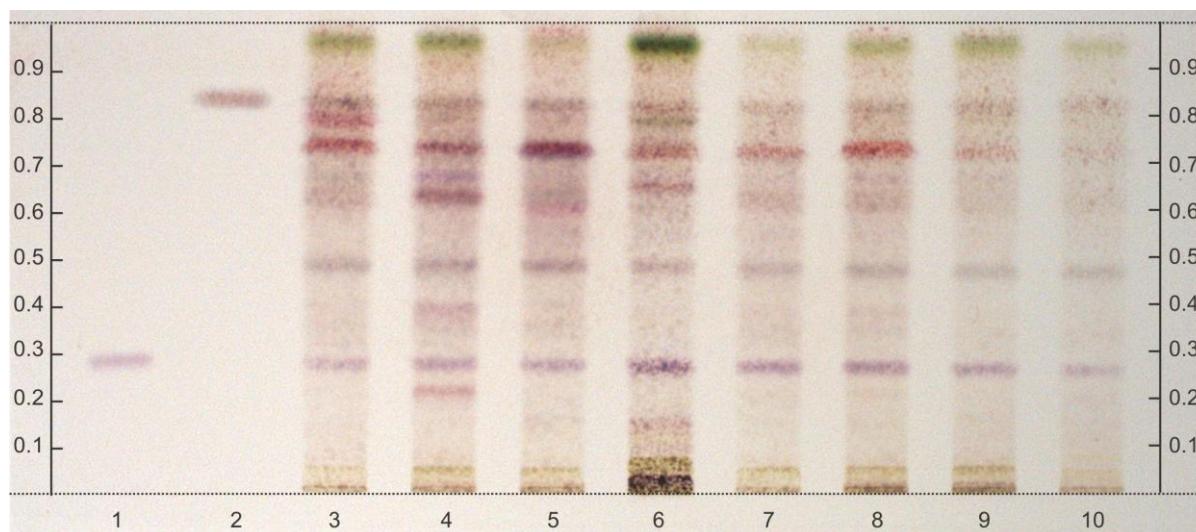


Abbildung 115: Robustheit Kammer/DC-Platte; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen: Kirenol und β -Sitosterol, jeweils 10 μ l, Bahn 2-5, 7-10: Siegesbeckiae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 10 μ l; Bahn 6: Siegesbeckiae herba aus deutscher Herkunft 10 μ l; FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 10 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, Weißlicht

Tabelle 75: Ergebnisse der Robustheitsprüfung mit verschiedenem Kammer- und Plattentyp

R_F	Flachbodenkammer DC-Platte	ADC 2 HPTLC-Platte	ΔR_F
Kirenol	0,27	0,28	0,01
β -Sitosterol	0,80	0,83	0,03

6.5.2.2.7.2 Verschiedene Entwicklungsdistanz

Um die Robustheit der neu entwickelten Methode zu untersuchen, wurde die Entwicklungsdistanz auf 5 cm verringert und auf 7 cm erhöht. Beide Chromatogramme (Abbildung 116) wurden mit der ersten Platte der Wiederholpräzision (Siegesbeckia_20130304_01) auf Lage und Intensität des Fingerprints verglichen (Tabelle 76). Die R_F -Werte der Referenzen Kirenol und β -Sitosterol zeigten eine Abweichung von weniger als 0,06 R_F -Einheiten.

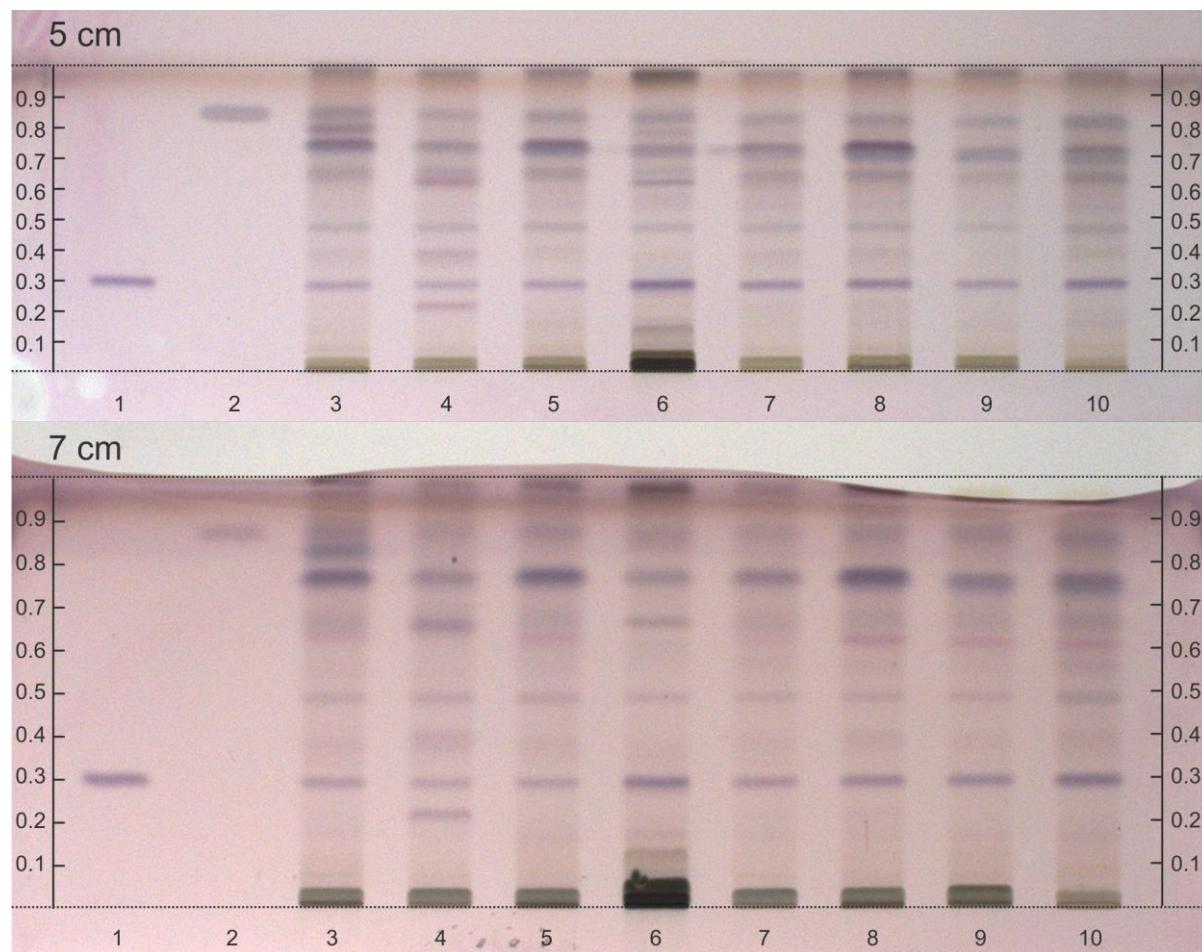


Abbildung 116: Robustheit Entwicklungsdistanz; Bahn 1, 2: Referenzsubstanzen: Kirenol und β -Sitosterol, jeweils 10 μ l, Bahn 2-5, 7-10: Siegesbeckiae herba Extrakt aus chinesischem Import jeweils 10 μ l; Bahn 6: Siegesbeckiae herba aus deutscher Herkunft 10 μ l; FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 5 bzw. 7 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreakenz, Weißlicht

Tabelle 76: Ergebnisse der Robustheitsuntersuchung mit verschiedenen Entwicklungsdistanzen

R_F	5 cm	6 cm	7 cm	ΔR_F
Kirenol	0,32	0,28	0,29	0,05
β -Sitosterol	0,86	0,83	0,87	0,04

6.5.3 Fingerprint unterschiedlicher Stammpflanzen

In der Siegesbeckiae herba Monographie des ChP 2010 sind 3 Stammpflanzen für die Droge zugelassen. Laut Literatur wurde in *Siegesbeckia glabrescens* [195], *Siegesbeckia orientalis* [178] und *Siegesbeckia pubescens* [173] Kirenol nachgewiesen. Daher sind alle drei Stammpflanzen gleichwertig verwendbar. Wie schon in 6.5.2.2.4.1 erläutert, war jedoch im Fingerprintchromatogramm (Abbildung 111) der chinesischen *S. glabrescens* und *S. orientalis* keine Kirenolbande zu erkennen. Um diese Ergebnisse zu evaluieren wurde Pflanzenmaterial von *S. orientalis* aus Vietnam und importierte Ware (Herkunft: E. Stöger), bei denen die Stampfblume nicht bekannt war, mit den beiden Markersubstanzen Kirenol und β -Sitosterol chromatographiert (Abbildung 117).

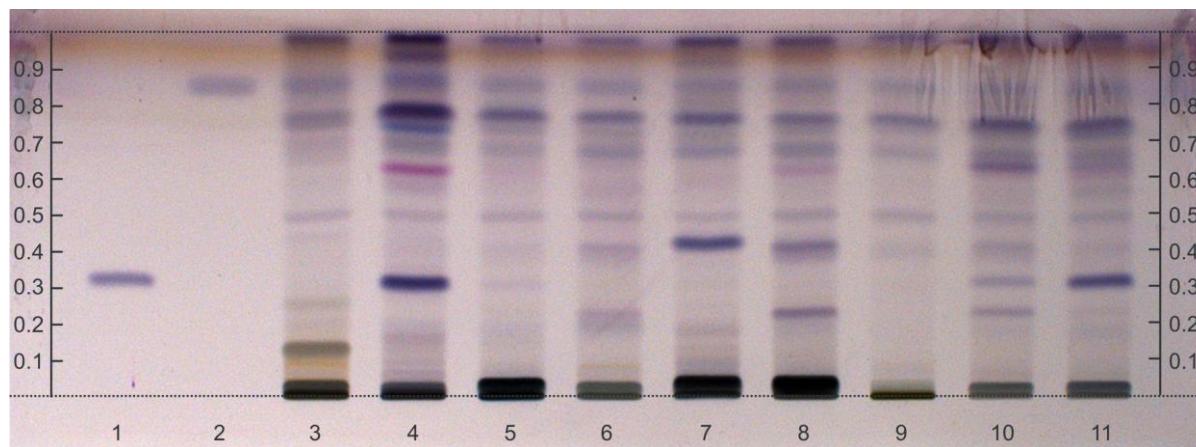


Abbildung 117: Fingerprint verschiedener Stammpflanzen; Bahn 1, 2: Referenzen Kirenol und β -Sitosterol, 10 µl; Bahn 3: *Siegesbeckia glabrescens* Extrakt, 10 µl; Bahn 4: *Siegesbeckia pubescens* Extrakt, 10 µl; Bahn 5-7: *Siegesbeckia orientalis* Extrakt aus China, „Wine-processed drug“ aus China, Vietnam, 10 µl; Bahn 8, 9: Siegesbeckiae herba Import durch E. Stöger, 10 µl; Bahn 10, 11: Siegesbeckiae herba aus chinesischem Anbau, 10 µl; FM: Dichlormethan, Methanol (5:1); Entwicklungsstrecke: 6 cm; derivatisiert mit Anisaldehydreakenz, Weißlicht

Im Chromatogramm wurden die zuvor gewonnenen Ergebnisse bestätigt, da weder der chinesische *S. glabrescens*-Extrakt (Bahn 3) noch die *S. orientalis*-Extrakte aus China (Xinmin City), weder die processed Droge (Bahn 5) noch die unprocessed Droge (Bahn 6) aus Vietnam (Bahn 7) Kirenolbanden enthielten. Auch bei den Siegesbeckiae herba Proben (Herkunft: E. Stöger) war keine Kirenolbande zu erkennen, obwohl es sich um eine Handelsprobe handelte. Eine mögliche Erklärung dafür könnten die unterschiedlichen Blatt-Stängel-Verhältnisse in den Proben sein. Laut Huo et al. [196] ist der Gehalt an Kirenol in den Blättern (0,18-0,23%) höher als in den Stängeln (0,006%). Die Proben, bei denen keine Kirenolbande im Fingerprint ersichtlich war, bestanden hauptsächlich aus Stängeln mit geringem Anteil an Blattmaterial. Außerdem zeigen Untersuchungen, dass die enthaltene

Menge Kirenol von der geographischen Herkunft abhängt. In Hebei (Nordchina) angebaute *Siegesbeckia pubescens* enthielt 1,1-1,3% Kirenol, während Material aus Henan (Nordostchina) nur 0,5% aufwies [186]. In derselben Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass weder *Siegesbeckia orientalis* noch *Siegesbeckia glabrescens* einen Gehalt über 0,6% zeigten. Ungeachtet der Tatsache, dass die „processed drug“ der ChP 2010 Monographie der unprocessed drug entsprechen sollte, könnte die Markersubstanz durch die vorgeschriebene Processingmethode (Kochen mit Reiswein) aus dem Pflanzenmaterial herausgelöst werden und somit nicht mehr nachweisbar sein. Da jedoch alle 3 Arten in der ChP 2010 Monographie zugelassen sind, werden sie im Punkt Definition der DAB Monographie als mögliche Stammpflanzen von Siegesbeckienkraut aufgelistet.

6.5.4 Analytik verschiedener *Siegesbeckiae herba* Granulate

Traditionell werden die TCM Arzneidrogen in China als Dekokt verabreicht. Bei der Herstellung des Dekoktes muss auf das verwendete Gefäß, Wasser und die Wärmezufuhr geachtet werden, was die fachgerechte Anwendung erschwert [16]. Zur Vereinfachung in der Praxis werden heute viele TCM-Drogen auch als Granulate angeboten, bei deren Herstellung die Drogen dekoktiert und die daraus resultierenden Extrakte mit Hilfsstoffen (Dextrin, Stärke) im Sprühturm versprüht und getrocknet werden. Eine Therapieäquivalenz von Dekokt und Granulat scheint jedoch nicht immer gegeben zu sein, da sich beide Zubereitungen in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden können [197], [198]. Um die verschiedenen Inhaltsstoffspektren von zwei auf dem Markt erhältlichen Granulaten zu testen, wurden sie mit der neu entwickelten Identitätsmethode extrahiert und mit methanolischen *Siegesbeckiae herba* Extrakten sowie einem selbsthergestellten Dekokt chromatographiert (Abbildung 118).

Siegesbeckienkraut 218

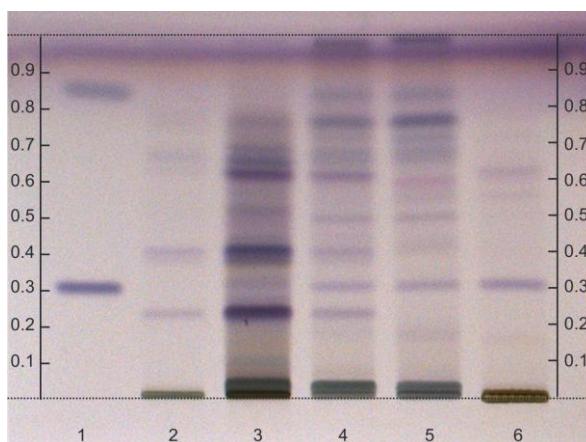


Abbildung 118: Fingerprint verschiedener Granulate: Bahn 1: Referenzen Kirenol und β -Sitosterol, jeweils 10 μ l; Bahn 2, 3: Extrakte zweier Siegesbeckia herba Granulate (Complemedis, Herbasinica) 10 μ l; Bahn 4, 5: Siegesbeckiae herba Extrakt aus China, 10 μ l; Bahn 6: Dekokt von Siegesbeckiae herba, 10 μ l, FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, Weißlicht

Während sich der Extrakt der Krautdroge und der Dekokt durch eine intensiv violette Kirenolbande auszeichnen, ist diese bei beiden Granulaten nicht nachweisbar. Um auszuschließen, dass durch den bestimmungsmäßigen Gebrauch des Granulats, das Auflösen und Abkochen in Wasser, vorhandene Inhaltsstoffe zu Kirenol abgebaut werden, wurden die Granulate analog der Dekoktherstellung mit Wasser extrahiert.

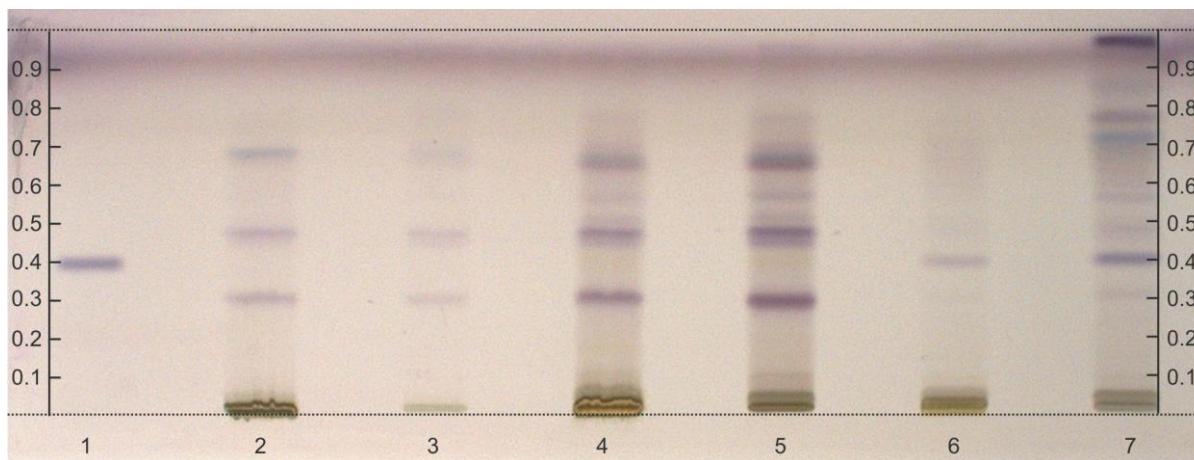


Abbildung 119: Granulate; Bahn 1: Referenz Kirenol, 10 μ l; Bahn 2, 3: Wasser-bzw. Methanol-Extrakt eines Siegesbeckiae herba Granulats (Complemedis), 10 μ l; Bahn 4, 5: Wasser-bzw. Methanol-Extrakt eines Siegesbeckiae herba Granulats (Herbasinica), 10 μ l; Bahn 6, 7: Wasser-bzw. Methanolextrakt von Siegesbeckiae herba, 10 μ l; FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke: 6 cm; derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, Weißlicht

Auch hier war die Kirenolbande im Bandenmuster der Granulate (Abbildung 119) nicht sichtbar. Die handelsüblichen Granulate entsprechen somit nicht den Anforderungen Monographie von Siegesbeckiae herba des ChP 2010 und dürfen daher nicht in die Erarbeitung der DAB Monographie einbezogen werden.

6.6 Reinheitsuntersuchungen

6.6.1 Trocknungsverlust

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes erfolgte entsprechend der Allgemeinen Methoden des Ph Eur. 7.0/2.2.32 [55]. Dazu wurde 1,0 g der pulverisierten Droge (355) 2 h im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet und gewogen.

Tabelle 77: Ergebnisse der Trocknungsverluste von Siegesbeckiae herba

	Arobemed		Chinamedica		Herbasinica		LfL 2011	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	32,8645	1,0001	32,7262	0,9975	34,5823	0,9985	31,7317	1,0035
2. Einwaage	32,7172	1,0075	31,7325	1,0048	34,6284	1,0020	31,7172	1,0021
3. Einwaage	31,7324	1,0099	34,6300	1,0023	33,2252	1,0056	34,5831	1,0018
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	33,7699	0,9054	33,6240	0,8978	35,4879	0,9056	32,6178	0,8861
2. Einwaage	33,6364	0,9192	32,6387	0,9062	35,5429	0,9145	32,6048	0,8876
3. Einwaage	32,6489	0,9165	35,5374	0,9074	34,1431	0,9179	35,4741	0,8910
1. Einwaage	Trock.verlust	9,47	Trock.verlust	9,99	Trock.verlust	9,30	Trock.verlust	11,70
2. Einwaage		8,76		9,81		8,73		11,43
3. Einwaage		9,25		9,47		8,72		11,06
	Mittelwert	9,16	Mittelwert	9,76	Mittelwert	8,92	Mittelwert	11,40
	%-STABW	3,94	%-STABW	2,74	%-STABW	3,74	%-STABW	2,81

	Pharmachin		Phytax		Sinophyto		Yong	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	34,2978	1,0018	33,2240	0,9985	31,7174	1,0019	34,6286	1,0034
2. Einwaage	32,8646	0,9956	34,5817	1,0072	34,2980	0,9973	33,2236	1,0004
3. Einwaage	32,8660	0,9968	32,7289	0,9998	34,2996	1,0007	31,7190	1,0069
	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz
1. Einwaage	35,2052	0,9074	34,1241	0,9001	32,6312	0,9138	35,5339	0,9053
2. Einwaage	33,7688	0,9042	35,4855	0,9038	35,2117	0,9137	34,1314	0,9078
3. Einwaage	33,7743	0,9083	33,6334	0,9045	35,2176	0,9180	32,6320	0,9130
1. Einwaage	Trock.verlust	9,42	Trock.verlust	9,85	Trock.verlust	8,79	Trock.verlust	9,78
2. Einwaage		9,18		10,27		8,38		9,26
3. Einwaage		8,88		9,53		8,26		9,33
	Mittelwert	9,16	Mittelwert	9,88	Mittelwert	8,48	Mittelwert	9,45
	%-STABW	2,98	%-STABW	3,72	%-STABW	3,27	%-STABW	2,99

Der prozentuelle Massenverlust bei der Trocknung zeigte homogene Ergebnisse von 8,48-11,40% (Tabelle 77). Das ChP 2010 setzt einen Trocknungsverlust von maximal 15,0% fest, der den hier gemessenen Ergebnissen entspricht und für die DAB Monographie Siegesbeckiae herba vorgeschlagen wurde.

Siegesbeckienkraut 220

6.6.2 Asche

Die Bestimmung der Asche erfolgte entsprechend der Allgemeinen Methoden des Ph. Eur 7.0/2.4.16 [56]. 1,0 g der pulverisierten Droge (355) wurden in einen Quarziegel eingewogen und bis zur Massenkonsistenz geglüht.

Tabelle 78: Ergebnisse der Aschebestimmungen von Siegesbeckiae herba

	Arobemed		Chinamedica		Herbasinica		LfL 2011	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	21,4090	1,0072	22,6866	0,9951	21,4679	1,0038	21,7644	1,0065
2. Einwaage	22,0929	1,0058	21,7072	1,0044	20,9600	0,9980	21,4774	0,9963
3. Einwaage	21,4707	1,0014	22,1694	1,0083	22,6144	1,0101	24,0288	1,0054
Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	
1. Einwaage	21,5243	0,1153	22,7725	0,0859	21,5443	0,0764	21,8637	0,0993
2. Einwaage	22,2054	0,1125	21,7911	0,0839	21,0358	0,0758	21,5740	0,0966
3. Einwaage	21,5806	0,1099	22,2520	0,0826	22,6887	0,0743	24,1257	0,0969
1. Einwaage	%-Asche	11,45	%-Asche	8,63	%-Asche	7,61	%-Asche	9,87
2. Einwaage		11,19		8,35		7,60		9,70
3. Einwaage		10,97		8,19		7,36		9,64
Mittelwert	11,20		Mittelwert	8,39	Mittelwert	7,52	Mittelwert	9,73
%-STABW	2,12		%-STABW	2,65	%-STABW	1,89	%-STABW	1,22

	Pharmachin		Phytax		Sinophyto		Yong	
	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage	Tara	Einwaage
1. Einwaage	22,1652	0,9971	20,8829	1,0023	23,0753	1,0051	20,7251	1,0042
2. Einwaage	21,7084	0,9981	23,2607	0,9985	21,5836	0,9928	21,4049	1,0055
3. Einwaage	20,9633	0,9955	20,3705	0,9966	21,7676	1,0069	20,8216	0,9994
Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	Auswaage	Differenz	
1. Einwaage	22,2529	0,0877	20,9731	0,0902	23,1691	0,0938	20,8168	0,0917
2. Einwaage	21,7952	0,0868	23,3463	0,0856	21,6716	0,0880	21,4945	0,0896
3. Einwaage	21,0521	0,0888	20,4604	0,0899	21,8593	0,0917	20,9085	0,0869
1. Einwaage	%-Asche	8,80	%-Asche	9,00	%-Asche	9,33	%-Asche	9,13
2. Einwaage		8,70		8,57		8,86		8,91
3. Einwaage		8,92		9,02		9,11		8,70
Mittelwert	8,80		Mittelwert	8,86	Mittelwert	9,10	Mittelwert	8,91
%-STABW	1,27		%-STABW	2,85	%-STABW	2,56	%-STABW	2,45

Die Ergebnisse der Aschewerte der einzelnen Drogenchargen verschiedener Anbieter zeigen keine größeren Abweichungen (Tabelle 78) oder Verfärbung des Ascherückstandes. Der von der ChP 2010 vorgeschlagenen Maximalwert von 12,0% wurde von keiner Probe überschritten und wird für die vorgeschlagene Monographie im DAB von Siegesbeckiae herba übernommen.

6.7 Gehaltsbestimmungen

6.7.1 HPLC

6.7.1.1 Vergleich verschiedener Detektoren

Für Substanzen ohne geeignetes Chromophor, das bei Wellenlängen von 190-200 nm absorbiert, kann der Evaporative-Light-Scattering-Detektor verwendet werden, da er nicht die Absorption eines Analyten, sondern die massenabhängige Lichtstreuung nach Verdampfen der mobilen Phase ermittelt [199]. Da Kirenol kein aromatisches oder konjugiertes System und somit auch kein ausgeprägtes Chromophor besitzt, (UV_{max} abgeschätzt nach Woodward-Fischer Regel 185 nm [200]) wurde die Substanz einerseits wie in der ChP 2005 Monographie [91] beschrieben bei 215 nm mit dem Diode-Array-Detektor und mit dem ELSD nach Chromatographie entsprechend der ChP 2005 Monographie (Tabelle 72) detektiert. Eine HPLC-ELSD Gehaltsbestimmungsmethode von Kirenol in Siegesbeckiae herba war früher publiziert worden [196] und bewies die Anwendbarkeit des Detektors.

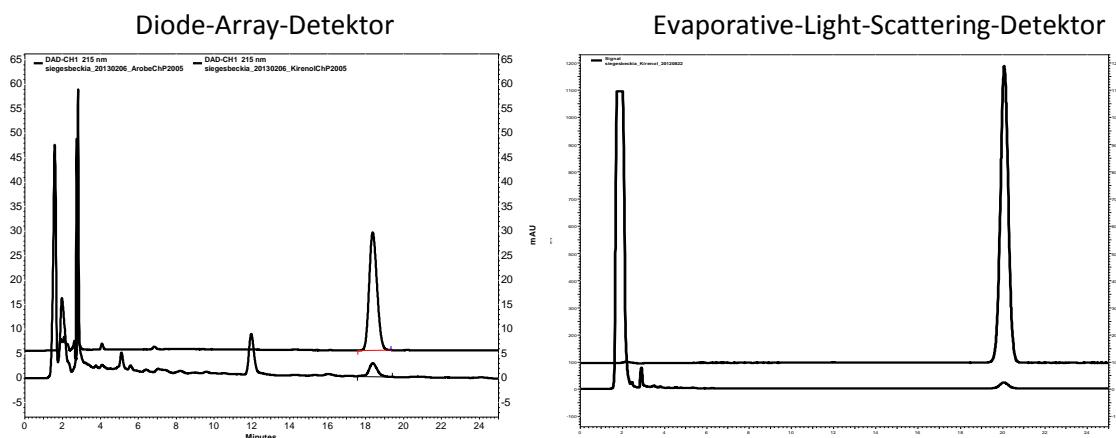


Abbildung 120 DAD-ELSD: HPLC-Chromatogramm von Siegesbeckiae herba aus China (Arobemed) und Kirenol (0,1 mg/ml Methanol) detektiert durch DAD (215 nm) und ELSD (N_2 -Flow 3,5 ml/min, drift-tube temperature 50 °C, Gain 10, Filter 6 s), 20 µl, 1,0 ml/min, 25 °C, Acetonitril, H₂O (25:75), isokratisch

Die Nettoretentionszeit war bei beiden Detektoren gleich ($R_t' = 17$ min), wenn auch die Totzeit bei der ELSD-Detektion größer war, da die Kapillare zwischen der Säule und dem Detektor länger ist als beim DAD. Während der Kirenolpeak im DAD-Chromatogramm eher breit und von geringer Höhe war, zeichnete sich der ELSD-Peak durch hohe Intensität und eine geringe Peakbreite aus. Durch die Art der Detektion im ELSD, dem Versprühen und anschließendem Verdampfen der mobilen Phase [201], war das Grundrauschen im DAD-Chromatogramm, bedingt durch die Eigenabsorption des Lösemittels (Cutoff ACN 190 nm [202]) bei 215 nm, deutlich höher. Ein limitierender Faktor beim Einsatz des ELSD war der

nicht lineare Zusammenhang zwischen vermessener Konzentration und erhaltenem Signal. Erst nach Logarithmierung beider Achsen ergab sich ein linearer Zusammenhang (Abbildung 121) [203].

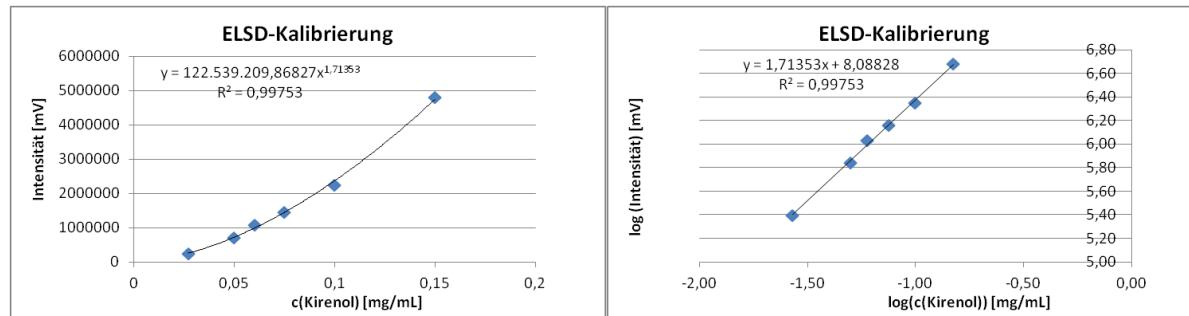


Abbildung 121: Kalibriergerade von Kireno nach ELSD-Detektion mit Potenzregression und nach doppellogarithmischer Auftragung mit linearer Regression

Tabelle 79: Ergebnisse der HPLC-ELSD Vermessung von verschiedenen Kirenolverdünnungen

Konzentration [mg/ml]	Intensität [mV]
0,150	4806887
0,100	2248308
0,075	1443784
0,060	1081927
0,050	696869
0,027	248416

Ein weiterer Vorteil des Diode-Array-Detektors in Vergleich zum ELSD ist die zusätzliche Information über die Reinheit des Peaks durch Vergleich des gemessenen UV-Spektrums am Anfang, in der Mitte und am Ende des Peaks. Somit kann eine Koelution eines Stoffes, der im selben UV-Bereich absorbiert und einen ähnlichen Extinktionskoeffizienten besitzt, nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist die UV-Detektion bei der Gehaltsbestimmung von Naturstoffen in pflanzlichen Proben die am häufigsten angewandte Methode im Ph. Eur und wurde deshalb zur Bestimmung von Kireno in Siegesbeckiae herba angewendet.

6.7.1.2 Optimierung der Gehaltsbestimmungsmethode

Wie Abbildung 120 zeigt, war das Fließmittelsystem der Monographie im ChP 2005 nicht optimal zur Bestimmung von Kirenol. Der Peak war gut getrennt von den restlichen Substanzen, jedoch aufgrund seiner hohen Retentionszeit von $R_t = 18,5$ min relativ klein und breit. In der überarbeiteten Monographie von Siegesbeckiae herba des ChP 2010 wird der Extrakt nicht mehr isokratisch, sondern mit einem Gradienten (Tabelle 72) chromatographiert. Durch die veränderten Bedingungen verschlechterte sich jedoch die Selektivität und Peakbeschaffenheit (Abbildung 122). Daher wurde die Fließmittelzusammensetzung überprüft.

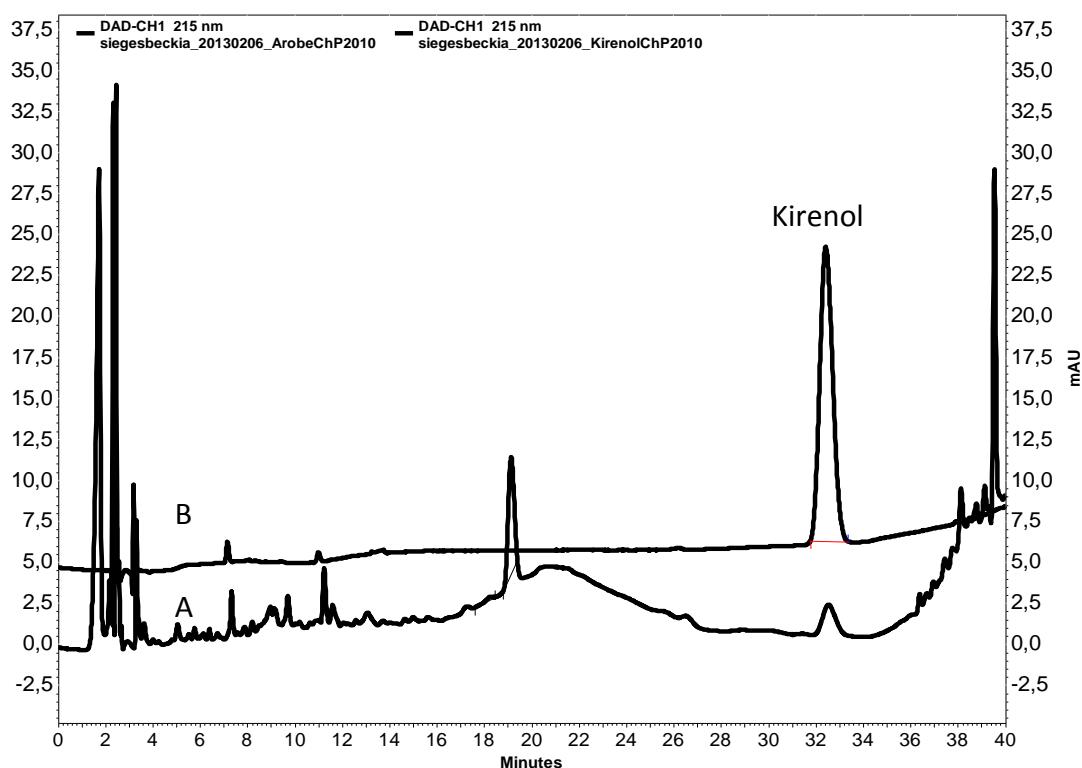


Abbildung 122: HPLC ChP 2010, HPLC-Chromatogramm von Siegesbeckiae herba aus China (Arobemed, A) und Kirenol (0,1 mg/ml Methanol, B), 20 µl, 215 nm, 1,0 ml/min, 25 °C, A: H₂O, B: Acetonitril, 0-5min: 5-24% A, 5-30 min: 24% A

Durch Vorversuche wurde das Fließmittelsystem zur Trennung von Kirenol und den restlichen Substanzen optimiert. Die Markersubstanz zeigte nun eine Auflösung > 1,0 zu den restlichen Peaks und bedingt durch die geringe Retentionszeit von $R_t = 11,5$ min einen scharfen symmetrischen Peak (Abbildung 123). Zudem konnte die lange Extraktionszeit von 5 h auf 30 min verkürzt werden, was keine Verluste an Peakfläche nach sich zog.

Siegesbeckienkraut 224

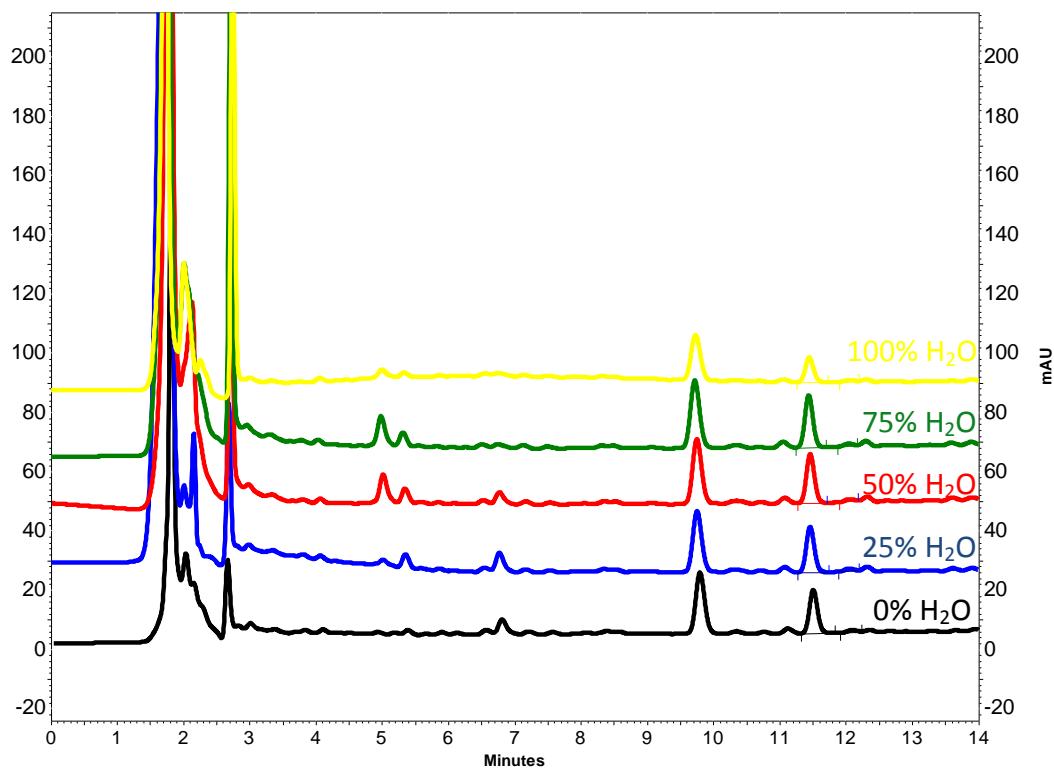


Abbildung 123: Variation der Methanol-Wasser-Zusammensetzung des Extraktionsmittels, HPLC-Chromatogramm einer Siegesbeckiae herba Probe aus chinesischem Anbau, 10 µl, 215 nm, 1,0 ml/min, 40 °C, A: H₂O, B: ACN; 0-15 min: 75-60% A, 15-20 min: 60-0% A

Tabelle 80: Ergebnisse der verschiedenen Extraktionsmittel-Zusammensetzungen

MeOH: H ₂ O (V/V)	Fläche Kirenol [mAU]
100:0	604486
75:25	566576
50:50	551017
25:75	524646
0:100	288845

Die Variation des Wasseranteils im Extraktionsmittel ergab, dass die gemessenen Fläche an Kirenol bei reinem MeOH am größten war (Tabelle 80), was die gewählten Bedingungen der ChP 2010 Monographie untermauert. Somit kann die Extraktionsmethode für die neue DAB-Monographie verwendet werden.

6.7.1.3 Validierung

Die neu entwickelte Methode zur Gehaltsbestimmung von Kirenol in Siegesbeckiae herba (Tabelle 72 Neu entwickelte Methode) wurde hinsichtlich Stabilität, Präzision, Robustheit und Richtigkeit mittels des Validierungsprotokolls (3.6.11) untersucht.

6.7.1.4 Stabilität des Extraktes

Der chinesische Siegesbeckiae herba Extrakt wurde zwanzigmal hintereinander in die HPLC injiziert und die Fläche an Kirenol miteinander verglichen. Der Test auf Stabilität konnte akzeptiert werden, da der Variationskoeffizient unter 5% lag (Tabelle 81).

Tabelle 81: Ergebnisse der Stabilität des Extraktes

Kirenol		
Zeit [min]	Messung	Fläche [mAU]
0-35	1	1289923
35-70	2	1285877
70-105	3	1289190
105-140	4	1290667
140-175	5	1300309
175-210	6	1308689
210-245	7	1285533
245-280	8	1283988
280-315	9	1284730
315-350	10	1279792
350-385	11	1277333
385-420	12	1288490
420-455	13	1286697
455-490	14	1282035
490-525	15	1281624
525-560	16	1304585
560-595	17	1297609
595-630	18	1286828
630-665	19	1284877
665-700	20	1285430
Σ 11 h 40 min	MW	1288710
	Stabw	8154
	V _K	0,63

6.7.1.5 Spezifität

In allen vermessenen Siegesbeckiae herba Proben war der Kirenolpeak bei $R_t = 11,7$ min mit einer Auflösung größer als 1 zu den benachbarten Peaks vorhanden. Zudem zeigte der Peak eine Reinheit von 0,99, was dafür spricht, dass sich unter dem Peak der Referenzsubstanz keine Verunreinigung mit demselben Absorptionskoeffizienten und –maximum befand.

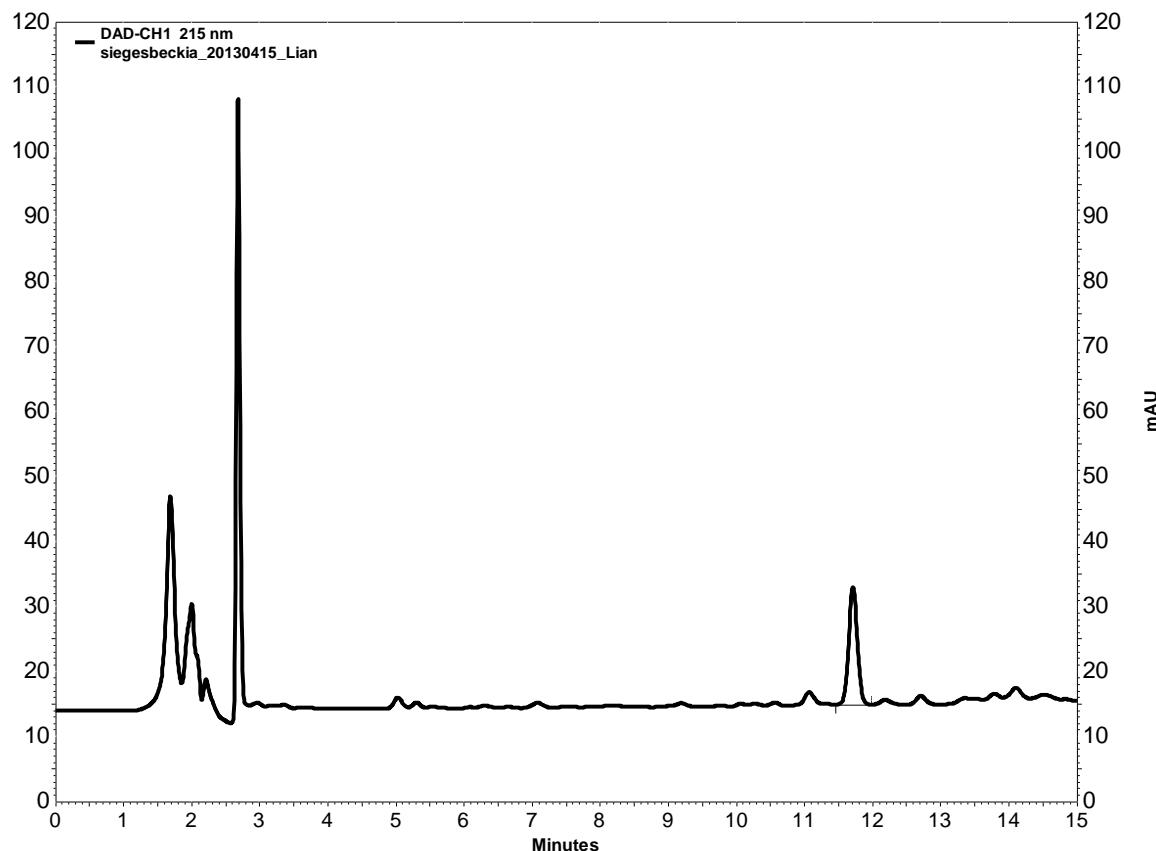


Abbildung 124: HPLC-Chromatogramm eines Siegesbeckiae herba Extraktes aus chinesischem Import, 10 µl, 215 nm, 1,0 ml/min, 40 °C, A: H₂O, B: ACN; 0-15 min: 75-60% A, 15-20 min 60-0% A

6.7.1.6 Kalibrierung

6.7.1.6.1 Messbereiches

Acht authentische Handelsproben aus chinesischer und deutscher Herkunft wurden nach Tabelle 72 (Neue Methode) extrahiert, chromatographiert und die Peakfläche bei 215 nm bestimmt (Tabelle 82). Zudem wurde eine Kirenollösung hergestellt, verdünnt und chromatographiert (Tabelle 83).

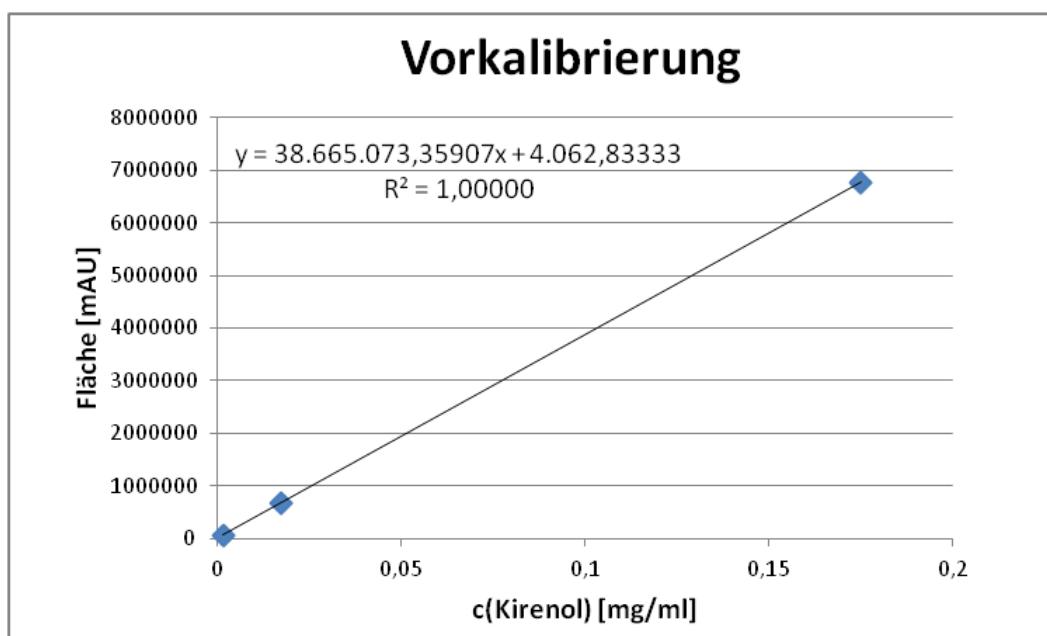
Tabelle 82: Wertetabelle zu den Vorversuchen der verwendeten Proben

Probe	Detektorsignal Kirenol [mAU]
Arobemed	397024
Chinamedica	272557
Herbasinica	340022
LfL	949994
Lian	1241136
Pharmachin	426647
Sinophyto	408041
Yong	387962

Tabelle 83: Wertetabelle zu den Vorversuchen der verschiedenen Kirenol-Konzentrationen

Konzentrationen (Kirenol) [mg/ml]	Detektorsignal [mAU]
0,175	6770287
0,0175	682502
0,00175	70090

Die Regressionsgerade lässt einen linearen Zusammenhang zwischen der vermessenen Konzentration an Kirenol und dem daraus resultierenden Detektorsignal erkennen (Abbildung 125). Der Mittelwert der Detektorsignale der Handelsproben wird als Mittelwert der Kalibriergerade definiert.

**Abbildung 125: Kalibriergerade der Vorversuche zur Festlegung des Messbereichs von Kirenol**

Siegesbeckienkraut 228

Der Messbereich wurde zwischen den Konzentrationen 0,006 mg/ml und 0,06 mg/ml für Kirenol festgelegt. Dafür wurden 7 Kalibrierlösungen gewählt, um den Konzentrationsbereich über eine Zehnerpotenz abzudecken.

Als Konzentrationen der einzelnen Kalibrierlösungen (Level 1-7) wurden festgelegt:

	Kirenol
Konzentration 1 (Level 1):	0,0060 mg/ml
Konzentration 2 (Level 2):	0,0120 mg/ml
Konzentration 3 (Level 3):	0,0180 mg/ml
Konzentration 4 (Level 4):	0,0240 mg/ml
Konzentration 5 (Level 5):	0,0360 mg/ml
Konzentration 6 (Level 6):	0,0480 mg/ml
Konzentration 7 (Level 7):	0,0600 mg/ml

6.7.1.6.2 Kalibrierfunktion

Die Kalibrierlösungen wurden aus frisch hergestellten Kirenol-Stammlösungen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen hergestellt und nach Tabelle 72 (Neu entwickelte Methode) chromatographiert.

Tabelle 84: Wertetabelle für die Kalibrierung von Kirenol in Siegesbeckiae herba

Level	1	2	3	4	5	6	7
c(Kirenol)	0,006	0,012	0,018	0,024	0,036	0,048	0,060
1. Messung [mAU]	171891	336017	504317	672132	1012309	1349509	1662789
2. Messung [mAU]	166481	327822	491849	658883	991888	1318546	1651304
3. Messung [mAU]	172347	341836	510574	681674	1028921	1375555	1686644
4. Messung [mAU]	163878	322654	487481	636561	963176	1286680	1600426
5. Messung [mAU]	169243	332374	496159	662105	989192	1332812	1630761
MW Fläche	168768	332141	498076	662271	997097	1332620	1646385
Stabw	3223	6599	8365	15141	22291	29790	29225
V _K	1,91	1,99	1,68	2,29	2,24	2,24	1,78

6.7.1.6.2.1 Lineare Regression

Eine Kalibrierfunktion wurde aus den Mittelwerten der Vermessung der Kalibrierlösungen durch lineare Regression erstellt. Dazu wurden die Formeln unter Punkt 3.6.11.2.5 verwendet um die Parameter m (Steigung der Gerade), b (Achsenabschnitt) und den Bestimmtheitsmaß r^2 zu berechnen.

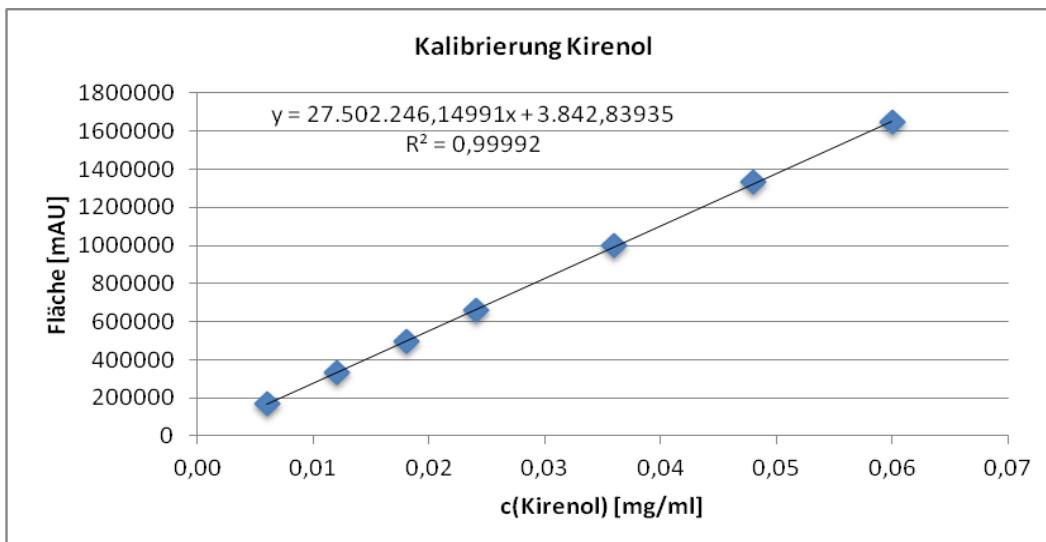


Abbildung 126: Kalibrierfunktion mit linearer Regression für Kirenol

Die Reststandardabweichung wurde mit Formel 10 berechnet und betrug 5462,18.

Die Verfahrensstandardabweichung, berechnet nach Formel 11 , betrug 0,0002.

Daraus ergab sich ein relative Verfahrensstandardabweichung von 0,68% (Formel 12)

6.7.1.6.2.2 Quadratische Regression

Eine Kalibrierfunktion wurde aus den Mittelwerten der Vermessung der Kalibrierlösungen durch quadratische Regression erstellt. Dazu wurden die Formeln unter Punkt 3.6.11.2.6 verwendet um die Parameter m, n, b und das Bestimmtheitsmaß r^2 zu berechnen.

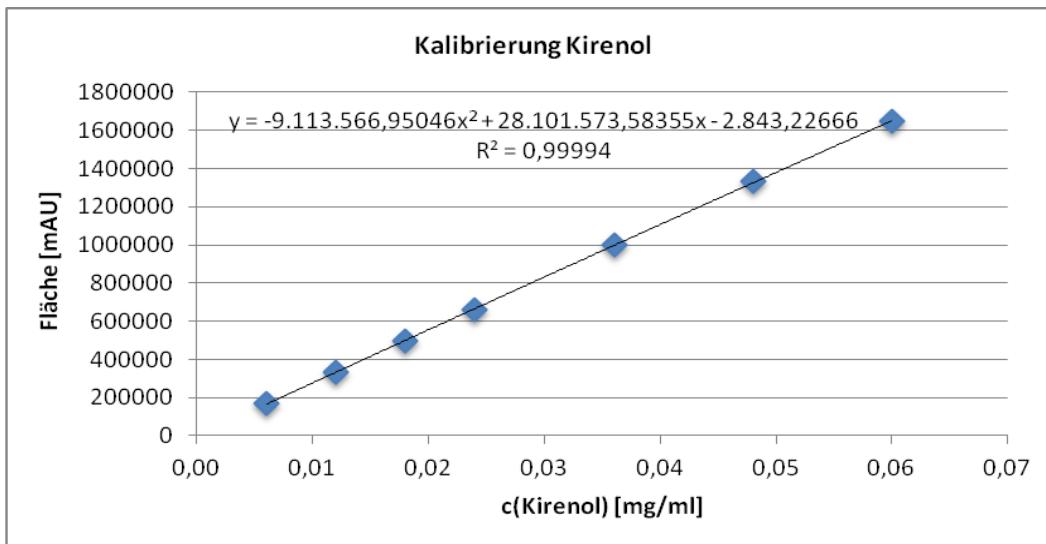


Abbildung 127: Kalibrierfunktion mit quadratischer Regression für Kirenol

Die Reststandardabweichung wurde mit Formel 22 berechnet und betrug 5156,96.

Die Verfahrensstandardabweichung, berechnet nach Formel 23 und Formel 24, war 0,0002.

Daraus ergab sich ein relative Verfahrensstandardabweichung von 0,64 % (Formel 12)

6.7.1.6.2.3 Anpassung nach Mandel

Für Kirenol musste ein Anpassungstest nach Mandel durchgeführt werden, da die relative Verfahrensstandardabweichung der quadratischen Regression geringer ist als bei der linearen Ausgleichsgerade.

$$PG = \frac{\Delta s_y^2}{s_{yQ}^2} = 1,61, \text{ tabellierter F-Wert } (f_1 = 1, f_2 = 4, P = 99\%) = 21,2$$

Die Nullhypothese ist anzunehmen, d. h. der Unterschied der beiden relativen Verfahrensstandardabweichungen war nicht signifikant unterschiedlich und eine lineare Regression für Kirenol wurde verwendet.

6.7.1.7 Wiederholpräzision

Zur Untersuchung der Wiederholpräzision wurde eine Probe aus chinesischem Import fünfmal an einem Tag unabhängig voneinander eingewogen und nach Tabelle 72 (Neu entwickelte Methode) extrahiert und chromatographiert. Die prozentuelle Standardabweichung der Proben lag bei 2,03% (Tabelle 85), somit unter 5% wodurch die Untersuchung der Wiederholpräzision akzeptiert werden konnte.

Tabelle 85: Ergebnisse der Wiederholpräzision

Kirenol					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	0,99999	0,99966	1,01621	1,00952	1,00729
Fläche [mAU]	1288710	1263465	1239173	1256820	1263703
Gehalt [%]	0,23360	0,22908	0,22100	0,22565	0,22739
MW Gehalt	0,22734				
Stabw	0,00461				
V _K	2,03				

6.7.1.8 Laborpräzision

Die Probe aus chinesischer Herkunft wurde an 4 weiteren Tagen unabhängig voneinander eingewogen, extrahiert und chromatographiert nach Tabelle 72 (Neu entwickelte Methode). Da der Variationskoeffizient (Tabelle 86) unter 5% lag, konnte der Test auf Laborpräzision akzeptiert werden.

Tabelle 86: Ergebnisse der Laborpräzision

Kirenol					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	1,0015	0,99801	1,00657	0,99267	0,99999
Fläche [mAU]	1289923	1311350	1279476	1241136	1288710
Gehalt [%]	0,23346	0,23818	0,23040	0,22661	0,23360
MW Gehalt	0,23245				
Stabw	0,00429				
V _K	1,85				

6.7.1.9 Probenauswertung und Prognoseintervall

Alle 8 authentischen Handelsproben wurden dreimal vermessen und der Gehalt durch Umstellen der Kalibriergerade berechnet (Tabelle 87).

Tabelle 87: Ergebnisse der Probenauswertung der Siegesbeckiae herba Proben

Kirenol	Arobemed	Chinamedica	Herbasinica	LfL	Lian	Pharmachin	Sinophyto	Yong
MW Gehalt [%]	0,06988	0,04900	0,06308	0,17136	0,23173	0,07557	0,07818	0,07086
Stabw	0,00129	0,00039	0,00229	0,00493	0,00590	0,00064	0,00384	0,00163
V_K	1,84	0,79	3,63	2,88	2,55	0,85	4,91	2,29

Der „wahre“ Wert der Probe liegt jedoch zwischen zwei Hyperbelästen (Abbildung 1) um die Kalibriergerade, da sich Fehler aus der Kalibriergerade und der Messung aufsummieren. Das Intervall (Tabelle 88), in dem sich die Konzentration an Kirenol in Siegesbeckiae herba befindet wurde nach Formel 38 berechnet.

Tabelle 88: Prognoseintervall der vermessenen Siegesbeckiae herba Proben

Kirenol	Arobemed	Chinamedica	Herbasinica	LfL	Lian	Pharmachin	Sinophyto	Yong
Prognose-intervall [mg/ml]	0,01398± 0,00036	0,00980± 0,00038	0,01262± 0,00037	0,03427± 0,00033	0,04635± 0,00037	0,01511± 0,00036	0,01564± 0,00035	0,01417± 0,00036

6.7.1.10 Robustheit

Eine Probe aus chinesischem Import wurde bei 35°C, 40°C und 30°C Säulenofentemperatur nach Tabelle 72 (Neu entwickelte Methode) chromatographiert. Die Temperatur wurde erhöht bzw. erniedrigt, um die Robustheit der Methode zu untersuchen. Der Variationskoeffizient der gemessenen Flächen lag unter 5% (Tabelle 89), die Methode wird als robust angesehen.

Tabelle 89: Ergebnisse der Robustheitsuntersuchung von Siegesbeckiae herba

	Kirenol
Fläche bei 40°C [mAU]	1276096
Fläche bei 30°C [mAU]	1262512
Fläche bei 35°C [mAU]	1241136
Mittelwert [mAU]	1259914
Stab	17624
V_K	1,40

6.7.1.11 Wiederfindung

Zu 1,00 g pulverisierte Droge (355) wurden 1,0 ml einer 3,55 µg/ml haltigen Referenzlösung, was ca. 10% Aufstockung entsprach, pipettiert und extrahiert und chromatographiert. Die Wiederfindung wurde nach Formel 39 berechnet (Tabelle 90) und lag in den vorgegebenen Grenzen von 95-105%.

Tabelle 90: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchung von Kirenol in Siegesbeckiae herba

	Einwaage [g]	Zugabe [mg]	Errechnete Konzentration [mg/ml]	Gefundene Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung [%]	Wiederfindung- Mittelwert [%]
Kirenol						
1. Messung	0,99843	0,00355	0,04945	0,04759	96,24	
2. Messung	0,98114	0,00355	0,04945	0,04656	94,15	95,19

6.7.1.12 Nachweisgrenze

Nachweisgrenze für Kirenol (berechnet nach Formel 40): 0,66 µg/ml

6.7.1.13 Quantifizierungsgrenze

Quantifizierungsgrenze für Kirenol (berechnet nach Formel 41): 1,99 µg/ml

6.7.2 HPTLC/Densitometrie

6.7.2.1 Optimierung

Das Fließmittelsystem der Identitätsprüfung C ergab eine gute Trennung zwischen der Referenzsubstanz Kirenol und den restlichen Banden des Fingerprints. Es konnte daher zur Gehaltsbestimmung mittels HPTLC/Densitometrie verwendet werden. Nach der densitometrischen Vermessung der Banden zeigten sich nur Peaks von geringer Intensität. Obwohl das Tauchen mit Anisaldehydreagenz und nachfolgendem Erhitzen auf der Heizplatte einen zusätzlichen Arbeitsschritt und eine mögliche Fehlerquelle darstellen, konnten scharfe, symmetrische Peaks (Abbildung 128) mit hoher Intensität erzeugt werden.

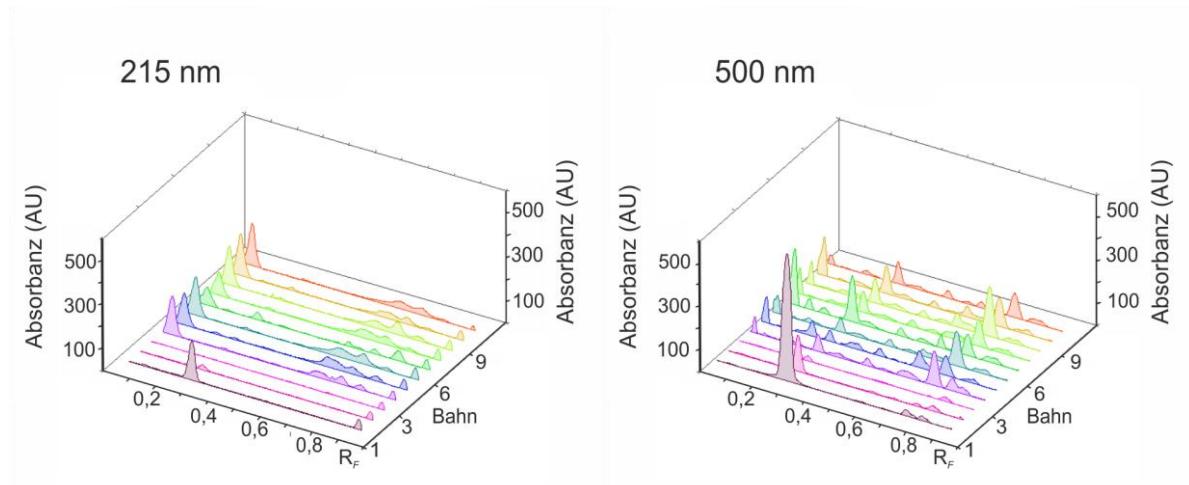


Abbildung 128: Densitogramm bei 215 nm und nach Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz bei 500 nm; Bahn 1-3: Kirenol-Kalibrierlösungen in absteigender Konzentration, jeweils 10 µl; Bahn 4-6, 8-11: Siegesbeckiae herba Extrakt aus chinesischer Herkunft 10 µl; Bahn 7: Siegesbeckiae herba Extrakt aus deutscher Herkunft 10 µl, FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm

6.7.2.2 Validierung

Die neu entwickelte Gehaltsbestimmungsmethode für Kirenol in Siegesbeckiae herba mittels HPTLC/Densitometrie wurde anhand des Protokolls (3.6.12) validiert.

6.7.2.2.1 Stabilität der Testlösung während der Chromatographie

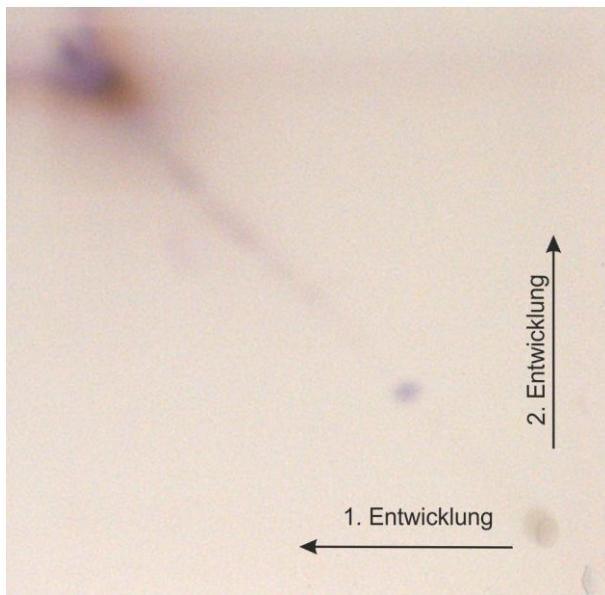


Abbildung 129: 2D-Chromatogramm von Siegesbeckiae herba, 5 µl, FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehyd, Weißlicht

Weder 5 µl einer Testlösung, noch einer Kirenollösung zeigten nach Derivatisierung im 2D Chromatogramm eine Bande, die nicht auf der Winkelhalbierenden der quadratischen HPTLC-Platte lag (Abbildung 129). Somit waren die Testlösung und die Markersubstanz während der Chromatographie stabil.

6.7.2.2.2 Stabilität der Testlösung in Lösung und auf der Platte

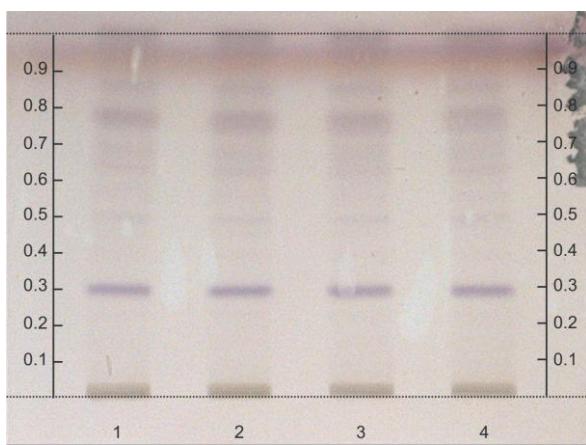


Abbildung 130: Stabilität auf der Platte und in Lösung, Bahn 1: Siegesbeckiae herba Extrakt 3 h auf der Platte, Bahn 2, 3: frischer Siegesbeckiae herba Extrakt, Bahn 4: Siegesbeckiae herba Extrakt 3 h in Lösung jeweils 10 µl, FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, Weißlicht

Wie in 4.5.3.2.2 beschrieben wurden die verschiedenen Extrakte hergestellt, jeweils 10 µl auf die Platte aufgetragen, nach Tabelle 71 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung)

chromatographiert und anschließend mit Anisaldehydreagenz derivatisiert (Abbildung 76). Die Flächen der beiden Referenzsubstanzen wurden densitometrisch bestimmt und miteinander verglichen. Die prozentuale Standardabweichung bei den Messungen betrug für Kirenol 3,2%. Die Extrakte waren also auf der HPTLC-Platte und in Lösung stabil.

6.7.2.2.3 Stabilität der Ergebnisse nach Derivatisierung

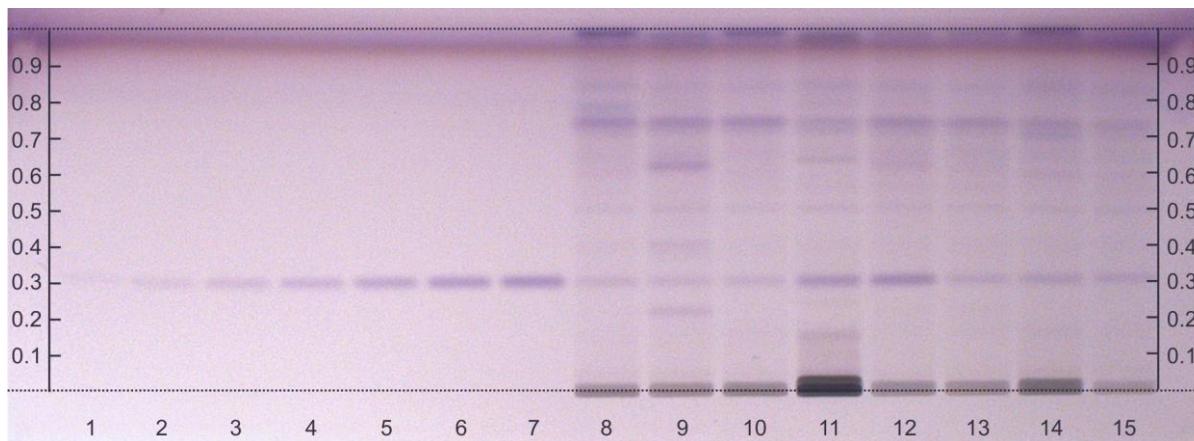


Abbildung 131: Stabilität der Derivatisierung nach $t = 5$ min; Bahn 1-7: Kalibrierlösungen von Kirenol in aufsteigender Konzentration jeweils 10 μ l; Bahn 8-10, 12-15: Siegesbeckiae herba aus chinesischem Anbau 10 μ l; Bahn 11: Siegesbeckiae herba aus deutschem Anbau 10 μ l FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreagenz, Weißlicht

Sieben Proben wurden nach Tabelle 37 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) extrahiert und chromatographiert. Die Flächen von Kirenol wurden nach densitometrischer Messung bei 500 nm direkt, 10, 30 und 60 min nach der Derivatisierung verglichen (Tabelle 91). Die gemessenen Flächen zeigten nach 60 min eine Abweichung von 8,01-9,00%, der Test auf Stabilität der Ergebnisse nach Derivatisierung konnte somit nicht akzeptiert werden. Jedoch lag die relative Standardabweichung nach 15 min unter 5%, d. h. die densitometrische Vermessung muss direkt nach der Derivatisierung innerhalb von 15 min ausgeführt werden, um stabile Werte zu erzielen.

Tabelle 91: Stabilität der Ergebnisse der Chromatographie

	0 min	5 min	15 min	30 min	60 min	MW	Stabw	V_K
Arobemed (AU)	1370,0	1338,4	1260,8	1188,3	1098,6	1251,2	110,7	8,85
Chinamedica (AU)	1187,9	1161,7	1098,0	1045,0	969,3	1092,4	88,5	8,10
Herbasinica (AU)	1334,9	1306,3	1235,4	1170,5	1080,2	1225,5	103,4	8,43
LfL (AU)	3089,5	3005,6	2828,6	2665,0	2481,7	2814,1	247,7	8,80
Lian (AU)	3932,2	3838,4	3610,9	3400,6	3141,7	3584,8	322,5	9,00
Pharmachin (AU)	1381,6	1356,3	1282,0	1218,4	1131,9	1274,0	102,1	8,01
Sinophyto (AU)	1809,5	1791,8	1701,3	1596,9	1455,2	1670,9	147,3	8,81
Yong (AU)	1421,3	1400,5	1327,6	1254,6	1146,9	1310,2	112,4	8,58
	MW 15 min	Stabw 15 min	V_K					
Arobemed (AU)	1323,1	56,2	4,25					
Chinamedica (AU)	1149,2	46,2	4,02					
Herbasinica (AU)	1292,2	51,2	3,96					
LfL (AU)	2974,6	133,2	4,48					
Lian (AU)	3793,8	165,2	4,35					
Pharmachin (AU)	1340,0	51,8	3,86					
Sinophyto (AU)	1767,5	58,0	3,28					
Yong (AU)	1383,1	49,2	3,56					

6.7.2.3 Spezifität

Die zu bestimmende Markersubstanz Kirenol ist in allen Proben, sowohl im Chromatogramm (Abbildung 131) als auch im Densitogramm (Abbildung 128), vorhanden ($R_f = 0,29$). Nach Derivatisierung war die Kirenolbande von weiteren Substanzen des Fingerprints ausreichend getrennt. Zudem zeigte der Kirenolpeak eine Reinheit von 0,99 durch den Vergleich des UV-Spektrums am Anfang, der Mitte und am Ende des Peaks. Der Test auf Spezifität konnte somit akzeptiert werden.

6.7.2.4 Kalibrierung

6.7.2.4.1 Messbereiches

Zur Gehaltsbestimmung von Kirenol in Siegesbeckiae herba mittels HPTLC/Densitometrie wurden die Konzentrationen der Kalibrierlösungen analog der Bestimmung durch Flüssigkeitschromatographie 6.7.1.6.1 verwendet. Um zu Überprüfen ob der gewählte Bereich alle Proben abdeckt, wurden 8 Proben wie in Tabelle 71 beschrieben, mit 3 Kalibrierstandards chromatographiert und bei 500 nm nach Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz densitometrisch ausgewertet.

Siegesbeckienkraut 238

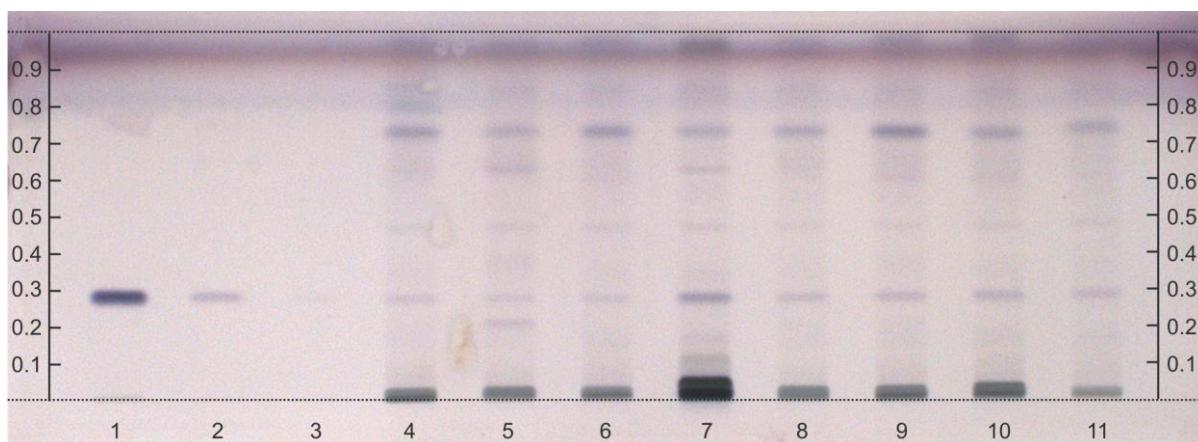


Abbildung 132: Messbereich; Bahn 1-3: Kalibrierlösungen von Kirenol in absteigender Konzentration jeweils 10 µl; Bahn 4-6, 8-11: Siegesbeckiae herba aus chinesischem Anbau 10 µl; Bahn 7: Siegesbeckiae herba aus deutschem Anbau 10 µl
FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehyd, Weißlicht

Tabelle 92: Wertetabelle zu den Vorversuchen der verwendeten Proben

Probe	Detektorsignal (AU)
Arobemed	1141,14
Baicheng	764,71
CaeLo	908,44
Chinamedica	3612,30
Herbasinica	1498,66
LfL	1780,44
Sinophyto	2064,74
Yong	1642,20

Tabelle 93: Wertetabelle zu den Vorversuchen der verschiedenen Kirenol-Konzentrationen

Konzentrationen (Kirenol) [mg/ml]	Detektorsignal (AU)
0,175	13261,37
0,0175	2838,52
0,00175	354,16

Aus der Regressionsgerade der Vorversuche zeigte sich eine quadratische Korrelation zwischen den vermessenen Konzentrationen und dem erhaltenen Detektorsignal (Abbildung 133).

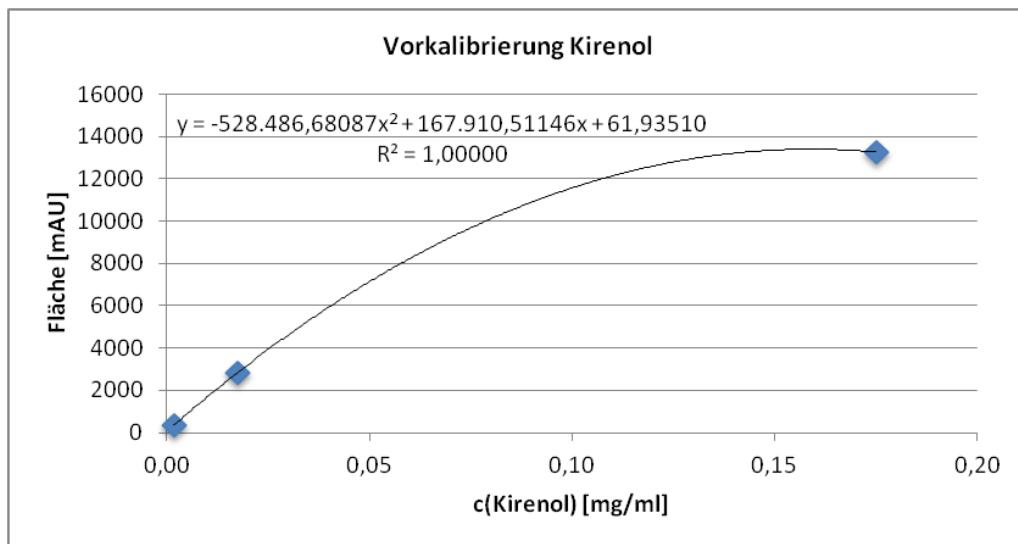


Abbildung 133: Kalibriergerade der Vorversuche zur Festlegung des Messbereichs von Kirenol

Als Konzentrationen der einzelnen Kalibrierlösungen (Level 1-7) wurden festgelegt:

	Kirenol
Konzentration 1 (Level 1):	0,0060 mg/ml
Konzentration 2 (Level 2):	0,0120 mg/ml
Konzentration 3 (Level 3):	0,0180 mg/ml
Konzentration 4 (Level 4):	0,0240 mg/ml
Konzentration 5 (Level 5):	0,0360 mg/ml
Konzentration 6 (Level 6):	0,0480 mg/ml
Konzentration 7 (Level 7):	0,0600 mg/ml

6.7.2.4.2 Kalibrierfunktion

Die Kalibrierlösungen wurde aus frisch hergestellten Kirenol-Stammlösungen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen hergestellt und nach Tabelle 71 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) mit jeweils 8 Proben auf einer Platte chromatographiert.

Tabelle 94: Wertetabelle für die Kalibrierung von Kirenol in Siegesbeckiae herba

Level	1	2	3	4	5
c(Kirenol)[mg/ml]	0,00600	0,01200	0,01800	0,02400	0,03600
1. Messung (AU)	582,36	1099,56	1805,57	2560,44	3386,66
2. Messung (AU)	740,27	1351,72	1955,07	2546,86	3540,00
3. Messung (AU)	720,71	1226,66	1884,22	2231,35	2973,24
4. Messung (AU)	705,96	1280,25	1813,61	2445,11	3451,07
5. Messung (AU)	609,61	1164,93	1718,35	2235,85	3173,87
MW Fläche	671,78	1224,62	1835,36	2403,92	3304,97
Stabw	70,91	98,05	89,12	161,75	229,39
V _K	10,56	8,01	4,86	6,73	6,94

6.7.2.4.2.1 Lineare Regression

Eine Kalibrierfunktion wurde aus den Mittelwerten der Vermessung der Kalibrierlösungen durch lineare Regression erstellt. Dazu wurden die Formeln unter Punkt 3.6.11.2.5 verwendet, um die Parameter m (Steigung der Gerade), b (Achsenabschnitt) und das Bestimmtheitsmaß r^2 zu berechnen.

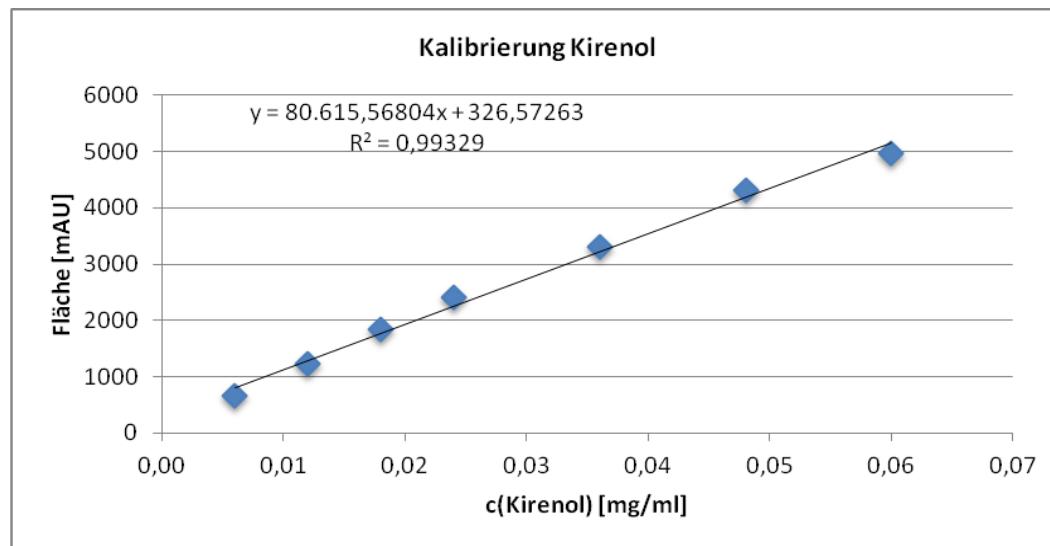


Abbildung 134: Kalibrierfunktion mit linearer Regression von Kirenol

Die Reststandardabweichung wurde mit Formel 10 berechnet und betrug 143,13.

Die Verfahrensstandardabweichung, berechnet nach Formel 11, war 0,002.

Daraus ergab sich eine relative Verfahrensstandardabweichung von 6,08% (Formel 12)

6.7.2.4.2.2 Quadratische Regression

Eine Kalibrierfunktion wurde aus den Mittelwerten der Vermessung der Kalibrierlösungen durch quadratische Regression erstellt. Dazu wurden die Formeln unter Punkt 3.6.11.2.6 verwendet, um die Parameter m, n, b und das Bestimmtheitsmaß r^2 zu berechnen.

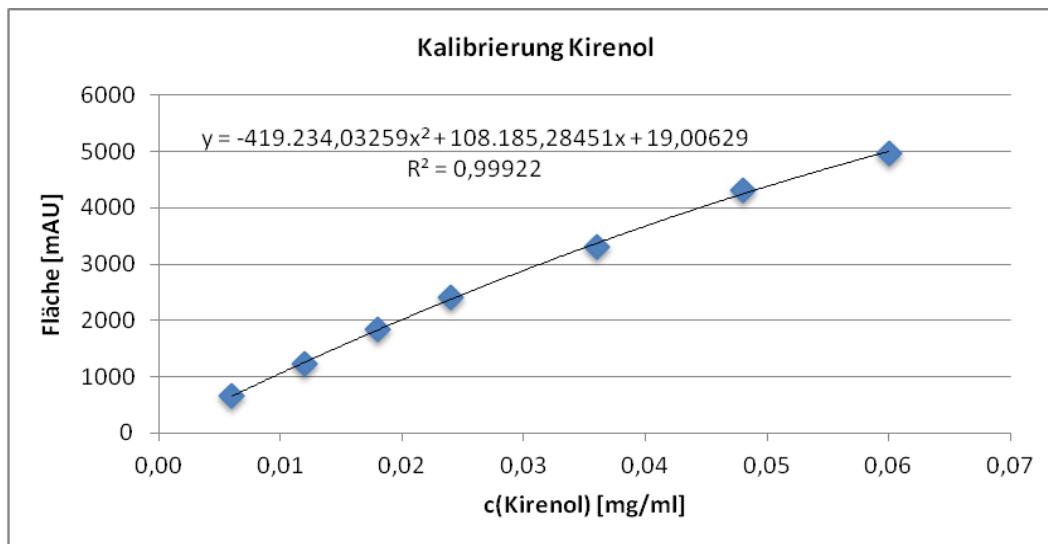


Abbildung 135: Kalibrierfunktion mit quadratischer Regression von Kirenol

Die Reststandardabweichung wurde mit Formel 22 berechnet und betrug 54,47.

Die Verfahrensstandardabweichung, berechnet nach Formel 23 und Formel 24, war 0,0007.

Daraus ergab sich eine relative Verfahrensstandardabweichung von 2,23% (Formel 12)

6.7.2.4.2.3 Anpassung nach Mandel

Ein Anpassungstest nach Mandel für die quadratische und lineare Regressionskurven entfiel für Kirenol, da die Verfahrensstandardabweichung der quadratischen Regression kleiner war als der lineare und somit die quadratische Regression akzeptiert werden kann.

6.7.2.5 Wiederholpräzision

Um die Wiederholpräzision zu evaluieren, wurde eine Probe aus chinesischem Import fünfmal an einem Tag unabhängig voneinander eingewogen und nach Tabelle 71 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) extrahiert und mit 7 Kirenolstandards auf einer HPTLC-Platte chromatographiert. Die prozentuelle Standardabweichung der Proben lag bei 5,31% (Tabelle 60), somit gerundet bei 5%, wodurch die Untersuchung der Wiederholpräzision akzeptiert werden konnte. Auffällig ist der große Unterschied der gemessenen Fläche der ersten (4002,47 AU) zur fünften Platte (3373,80 AU) an einem Tag.

Das entspricht einer relativen Standardabweichung von 6,9%. Durch die Umrechnung der Fläche mit der Kalibriergeraden auf den Gehalt an Kirenol in der Probe zeigt, dass auch die Flächen der Kalibrierstandards um einen gewissen Wert abnehmen. Das Derivatisierungsreagenz ist somit nur über einen Tag stabil und als wahrscheinlichste Fehlerquelle der Gehaltsbestimmungsmethode anzusehen.

Tabelle 95: Ergebnisse der Wiederholpräzision

Kirenol					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	1,01405	1,00211	1,00821	1,00114	1,00003
Fläche (AU)	4002,47	3518,38	3793,16	3537,97	3373,80
Gehalt [%]	0,23503	0,20986	0,21343	0,21355	0,20539
MW Gehalt			0,21545		
Stabw			0,01144		
V _K			5,31		

6.7.2.6 Laborpräzision

Die Probe aus chinesischer Herkunft wurde an 4 weiteren Tagen unabhängig voneinander eingewogen, extrahiert und mit 7 Kalibrierstandards auf einer HPTLC-Platte chromatographiert nach Tabelle 71 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung). Die erhaltenen Flächen nach der densitometrischen Vermessung wurden mit der ersten Platte der Wiederholpräzision verglichen. Da der Variationskoeffizient (Tabelle 96) unter 5% lag, konnte der Test auf Laborpräzision akzeptiert werden.

Tabelle 96: Ergebnisse der Laborpräzision

Kirenol					
Messung	1	2	3	4	5
Einwaage [g]	1,00001	0,99267	1,01999	0,99545	1,01405
Fläche (AU)	3717,5	3696,9	3874,1	3919,9	4058,7
Gehalt [%]	0,20281	0,20326	0,20828	0,21792	0,22246
MW Gehalt			0,21095		
Stabw			0,00885		
V _K			4,20		

6.7.2.7 Probenauswertung und Prognoseintervall

Um den Gehalt Kirenol in den verschiedene Proben abzuschätzen, wurden diese dreimal an aufeinanderfolgenden Tagen extrahiert, chromatographiert nach Methode Tabelle 71 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) und die Konzentration an Kirenol durch Umstellen der Kalibriergerade nach x berechnet.

Tabelle 97: Ergebnisse der Probenauswertung der Siegesbeckiae herba Proben

Kirenol	Arobemed	Chinamedica	Herbasinica	LfL	Lian	Pharmachin	Sinophyto	Yong
MW Gehalt [%]	0,06695	0,05198	0,06261	0,16473	0,20982	0,06389	0,08064	0,06774
Stabw	0,00119	0,00105	0,00240	0,00399	0,00745	0,00423	0,00598	0,00197
V _k	1,78	2,03	3,83	2,42	3,55	6,63	7,42	2,91

Da sich die Fehler beim Vermessen der Kalibriergerade aufsummieren, liegt der „wahre“ Wert der Probe zwischen zwei Hyperbelästen (Abbildung 1) um die Kalibriergerade. Das Intervall (Tabelle 98), in dem sich die Konzentration an Kirenol in Siegesbeckiae herba befindet wurde nach Formel 38 berechnet.

Tabelle 98: Prognoseintervall der vermessenen Siegesbeckiae herba Proben

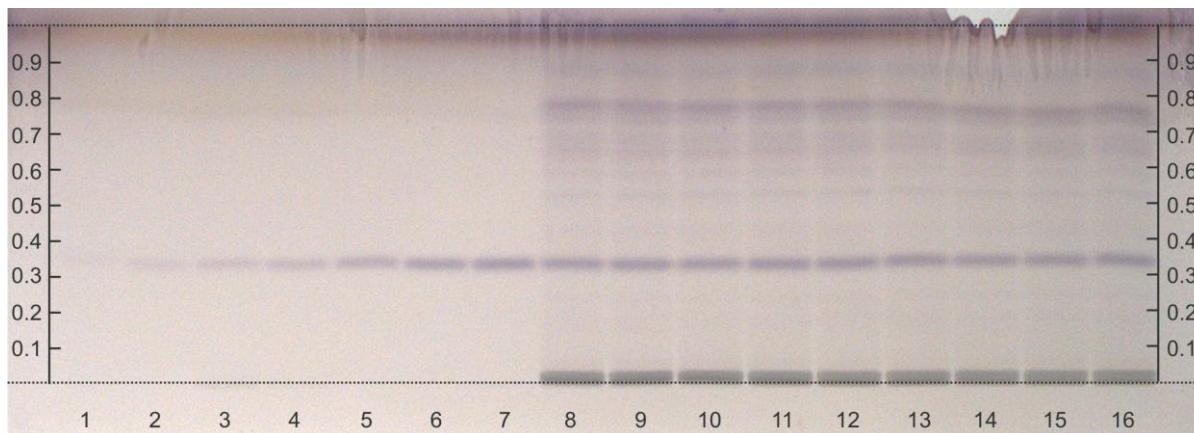
Kirenol	Arobemed	Chinamedica	Herbasinica	LfL	Lian	Pharmachin	Sinophyto	Yong
Prognose-intervall [mg/ml]	0,01339± 0,00326	0,01039± 0,00343	0,01252± 0,00330	0,03294± 0,00294	0,04196± 0,00318	0,01278± 0,00329	0,01612± 0,00313	0,01355± 0,00325

6.7.2.8 Robustheit

Zur Robustheitsuntersuchung der densitometrischen Gehaltsbestimmung von Kirenol in Siegesbeckiae herba zu untersuchen, wurde die Entwicklungsstrecke auf 5 cm erniedrigt bzw. auf 7 cm erhöht. Eine Probe aus chinesischem Import wurde nach Methode Tabelle 71 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) extrahiert, bis zu einer Strecke von 55, 60 und 65 mm entwickelt und mit Anisaldehydreagenz derivatisiert. Nach der densitometrischen Messung wurden die Flächen der Markersubstanz verglichen (Tabelle 99) und zeigten eine Abweichung von unter 5%. Die Methode kann als robust angesehen werden.

Tabelle 99: Ergebnisse der Robustheitsuntersuchung von Siegesbeckiae herba

	Kirenol
Gehalt bei 55 nm (AU)	0,20448
Gehalt bei 60 nm (AU)	0,21465
Gehalt bei 65 nm (AU)	0,22384
Mittelwert [%]	0,21433
Stabw	0,00968
V_K	4,52

6.7.2.9 Wiederfindung**Abbildung 136: Wiederfindung; Bahn 1-7: Kalibrierlösungen von Kirenol in aufsteigender Konzentration jeweils 10 µl; Bahn 8-10: Siegesbeckiae herba aus chinesischem Anbau, 10 µl; Bahn 11-13: Siegesbeckiae herba aus chinesischem Anbau + 10% Zusatz Kirenol, Einwaage 1, 10 µl; Bahn 14-16: Siegesbeckiae herba aus chinesischem Anbau + 10% Zusatz Kirenol, Einwaage 2, 10 µl; FM: Dichlormethan, Methanol (5:1), Entwicklungsstrecke 6 cm, derivatisiert mit Anisaldehydreakenz, Weißlicht**

Zu 1,00 g pulverisierter Droge (355) wurden 0,1 ml einer 0,0341 mg/ml haltigen Kirenollösung, was ca. 10% Aufstockung entsprach, pipettiert und wie unter Tabelle 71 (Neu entwickelte Methode-Gehaltsbestimmung) extrahiert und chromatographiert. Die Wiederfindung wurde nach Formel 39 berechnet (Tabelle 100) und lag in den vorgegebenen Grenzen von 95-105%.

Tabelle 100: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchung von Kirenol in Siegesbeckiae herba

	Einwaage [g]	Zugabe [mg]	Errechnete Konzentration [mg/ml]	Gefundene Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung [%]	Wiederfindung- Mittelwert [%]
Kirenol						
1. Messung	1,00336	0,00341	0,04663	0,04595	98,53	
2. Messung	0,98134	0,00341	0,04663	0,04235	90,81	94,67

6.7.2.10 Nachweisgrenze

Nachweisgrenze für Kirenol (berechnet nach Formel 40): 1,66 µg/ml

6.7.2.11 Quantifizierungsgrenze

Quantifizierungsgrenze für Kirenol (berechnet nach Formel 41): 5,04 µg/ml

6.8 Diskussion der Ergebnisse-Siegesbeckienkraut

Anders als bei den meisten Asteraceen, bei denen der Samen mit Hilfe eines Pappus durch Wind oder mit Hakenhaaren durch Tiere verbreitet wird, finden sich in der Gattung *Siegesbeckia* mehrzellige Klebehaare auf den inneren und äußeren Hüllblättern sowie an der Spitze der Spreublätter, jedoch nicht an der Achäne selbst, die der epizoischen Ausbreitung dienen [184]. Während bei *Siegesbeckia glabrescens* nur die äußeren Hüllblätter Klebehaare aufweisen sind sie bei *S. orientalis* zusätzlich an den inneren Hüllblättern und bei *S. pubescens* am Köpfchenstiel zu finden [204]. In der geschnittenen Droge sind sie allerdings nicht mehr zu erkennen und können somit nicht zur Unterscheidung der drei Stammpflanzen verwendet werden. Bei mikroskopischer Betrachtung waren die mehrzelligen Düsenhaare jedoch bei allen Proben vorhanden und konnten als Identitätsmerkmal beschrieben werden (6.4). Das makroskopische Bild der geschnittenen Droge war je nach Herkunft sehr unterschiedlich. Deutliche Variationen zeigten sich im Stängel-Blatt-Verhältnis. Beim Material aus deutschem Anbau fanden sich hauptsächlich Blätter und Blüten, während beim chinesischen Material die Stängelanteile überwiegten (6.3). In der Materia Medica [185] wird eine qualitativ hochwertige Droge durch einen hohen Blattanteil und wenig zarte Äste gefordert, was der bayerischen Droge am nächsten kommt.

Zu den in der Literatur beschriebenen Inhaltsstoffen von *Siegesbeckiae herba* gehören apolare methylierte Flavonoide [187] sowie Flavonoidglykoside [205]. Die Überprüfung dieser potentiellen Markersubstanzen zur Identitätsbestimmung mittels Dünnschichtchromatographie zeigte jedoch, dass weder apolare Flavonoide noch Flavonoidglykoside im Fingerprint aller vorhandenen Proben enthalten waren. Somit konnten sie nicht als Referenzsubstanzen verwendet werden, obwohl sie nachweislich isoliert wurden [187].

Interessant ist die Klasse der Diterpene, die anders als bei den meisten Asteraceen, in allen drei Arten der Gattung *Siegesbeckia* zu finden ist [206]. Dominierend sind hierbei Diterpene und deren Glykoside vom Pimarantyp und Kaurantyp. Während *ent*-Kaurane eher für die antidiabetische [183], antithrombotische [207] und wundheilungsfördernde [181] Wirkung der Droge verantwortlich gemacht werden, wird das Diterpen Kirenol vom *ent*-Pimarantyp als aktive Substanz zur Behandlung von rheumatoider Arthritis postuliert. Kirenol war in der

Lage, nach oraler Gabe das experimentelle Rattenpfotenödem im selben Ausmaß wie Prednisolon zu reduzieren und Entzündungsmediatoren wie NF- κ B zu inhibieren [179]. Auch die topische Applikation von Kirenolhaltigen Cremes zeigte antiinflammatorische und analgetische Wirkung in Ratten. Akute Toxizität nach oraler Gabe von 2g/kg in Ratten konnte dabei nicht beobachtet werden [178]. Pharmakokinetische Studien ergaben, dass Kirenol ca. 5 min nach oraler Gabe im Rattenplasma zu finden war und nach 20 min der höchste Plasmaspiegel erreicht wurde. Die Substanz wird demnach schnell resorbiert und nach ca. 120 min wieder ausgeschieden, d. h. toxische Effekte durch Akkumulation sind auszuschließen [188]. Laut Literatur ist Kirenol in *S. glabrescens* [195], *S. orientalis* [208] und *S. pubescens* [209] aber in keiner der beschriebenen Verfälschungen vorhanden [210], [211], [191], weshalb das Diterpen in der ChP 2005 und in der aktuellen Version ChP 2010 als Markersubstanz verwendet wird. Das Fließmittelsystem der chinesischen Monographie 2010 ergab scharfe Kirenolbanden mit guter Auflösung innerhalb des Fingerprintspektrums, wegen des verwendeten Chloroforms musste es optimiert werden. Durch den Einsatz von Dichlormethan konnte eine neue mobile Phase entwickelt werden, mit der Kirenol in allen vorhandenen Siegesbeckiae herba Proben nachgewiesen werden konnte. Lediglich im Pflanzenmaterial aus Xinmin City welches als *S. glabrescens*, *S. orientalis* und *S. orientalis* „Wine-processed“ deklariert waren, konnte die Markersubstanz nicht nachgewiesen werden. Jiang et al. [186] wiesen jedoch nach, dass Kirenol in allen drei Stammpflanzen vorhanden ist und bei *S. glabrescens* und *S. pubescens* das Hauptditerpen darstellt. Der Gehalt an Kirenol lag bei allen vermessenen Proben über den im ChP 2010 geforderten Mindestgehalt von 0,05%. Dabei scheint der Anteil des Diterpens vom Anbauort abzuhängen, da die in der Provinz Hebei kultivierte Droge einen Gehalt von 0,1% aufwies während beim Material aus der Provinz Henan nur 0,05% zu finden waren. Da die botanische Identität weder durch eine Prüfzertifikat bestätigt wurde, noch anhand des geschnittenen Drogenmaterial eindeutig feststellbar war, konnten die Xinmin City Proben nicht zur Erstellung der DAB-Monographie verwendet werden. Dasselbe galt für das als „Wine-processed drug“ gekennzeichnete Drogenmaterial. Es ist anzunehmen dass durch das Kochen mit Reiswein die Markersubstanz aus der Droge herausgelöst wird, da Kirenol sehr gut in alkoholischen Lösemitteln löslich ist.

Nachdem das neu entwickelte System mit allen authentischen Proben validiert wurde und präzise und robuste Ergebnisse produzierte, wurde es zur Fingerprintanalyse weiterer

Siegesbeckiae herba Drogenproben sowie unterschiedlicher Siegesbeckiae herba Granulate genutzt. Verschiedenen Handelsproben von Plantasia mit unbekannter Stammpflanze sowie eine Probe aus Vietnam, die eindeutig *S. orientalis* zugeordnet werden konnte, da nur diese Siegesbeckia-Art für Vietnam beschrieben wurde [205], konnten auf die Referenzsubstanz Kirenol untersucht werden. Weder das Probenmaterial aus Vietnam noch die importierte Ware von Plantasia enthielten Kirenol und entsprachen somit nicht den Anforderungen des DAB Monographieentwurfs. Die Proben entsprechen auch nicht den Anforderungen der Siegesbeckiae herba Monographie des ChP 2005 und 2010 [169]! Dasselbe gibt für zwei Siegesbeckiae herba Granulate (Firma Herbasinica, Complemedis), bei denen keine Kirenolbande im Fingerprint nach Derivatisierung mit Anisaldehyd reagenz erkennbar war. Granulate werden aufgrund ihrer einfachen Handhabung immer mehr eingesetzt, obwohl Fragen zur Qualität und Unbedenklichkeit nicht einfach zu beantworten sind, da häufig Angaben zum genauen DEV und Extraktionsmittel fehlen. Darüber hinaus zeigen Fingerprintanalysen mancher Granulate und Dekokte ein anderes Spektrum, was die Therapieäquivalenz infrage stellt [212]. Es wurden demnach weder die Granulate noch die Proben aus Vietnam und von Plantasia zur Erstellung der DAB Monographie miteinbezogen.

Zur Gehaltsbestimmung von Siegesbeckiae herba wurde analog der ChP 2010 Monographie Kirenol als Markersubstanz verwendet. Bedingt durch das Fehlen eines Chromophors und somit des geringen Absorptionsmaximums von Kirenol wurden zwei verschiedenen Detektoren nach der chromatographischen Trennung untersucht. Mit dem Evaporative-Light-Scattering-Detektor (ELSD), der massenabhängige Lichtstreuung misst, konnte ein Chromatogramm mit guter Auflösung und Peaksymmetrie erzielt werden. Die Vermessung mittels Diode-Array-Detektor (DAD) bei 215 nm analog des ChP 2010 erzielte einen Peak mit deutlich geringerer Intensität, wurde aber wegen seiner zusätzlichen Aussagekraft hinsichtlich Peakreinheit und der häufigen Verwendung im Ph. Eur zur Erstellung der DAB-Monographie von Siegesbeckiae herba verwendet. Nach Optimierung der Extraktion und des Fließmittelgemisches wurde die Methode mit einer authentischen Probe aus chinesischem Import (Lian) validiert. Der Gehalt an Kirenol in den acht Handelsproben lag immer über dem geforderten Mindestgehalt von 0,05% (ChP 2010) schwankte jedoch stark zwischen den einzelnen Proben (0,05-0,23%) was eventuell auf verschiedene Anbauorte, aber auch auf ein unterschiedliches Stängel-Blatt-Verhältnis der einzelnen Proben zurückzuführen sein könnte. Der Gehalt an Kirenol in den Blättern (1,8-2,3%) liegt um ein Vielfaches höher als in den

Stängelanteilen (0,06-0,07%) und könnte die Differenzen zwischen den Handelsproben erklären. Das Muster der Firma Chinamedica mit dem höchsten Stängelanteil wies den geringsten Gehalt an Kirenol auf (0,05%), was diese These unterstreicht [196].

Als Alternative zur HPLC Gehaltsbestimmung wurde die densitometrische Vermessung von Kirenol nach HPTLC untersucht. Dazu wurde das neue Fließmittelsystem der Prüfung Identität C verwendet. Die Derivatisierung mit Anisaldehydreakenz war nötig, da die Peaks im Densitogramm der Messung bei 215 nm teilweise nicht vom Grundrauschen unterscheidbar waren. Nach Derivatisierung konnten scharfe Signale bei 500 nm, dem Absorptionsmaximum des entstandenen Kirenoladduktes, gewonnen werden. Die Validierung der Methode erfolgte analog zur HPLC-Methode mit dem Material der Firma Lian. Der hergestellte Extrakt war während der Chromatographie und in Lösung stabil, die gemessenen Flächen an Kirenol wies sofort und 60 min nach der Derivatisierung eine relative Standardabweichung bis zu 9% auf. Diese hohe Abweichung lag nicht in den zuvor festgesetzten Grenzen, d. h. die Ergebnisse waren nicht über den Zeitraum von 60 min stabil. Folglich musste eine Messung innerhalb von 15 min nach der Derivatisierung erfolgen, da dort die Abweichungen unter 5% lagen. Die restlichen Validierungsparameter wie Präzision, Robustheit und Wiederfindung ergaben akzeptable Werte. Eine densitometrische Quantifizierung von Kirenol war folglich möglich und ergab für die acht vermessenen Muster einen Gehalt zwischen 0,05-0,21%. Beide Bestimmungsmethoden wurden analog den Methoden zu *Saposhnikoviae divaricatae radix* durch einen *t*-Test für unabhängige Stichproben verglichen und zeigten keine signifikanten Unterschiede. Allerdings ergab die HPTLC/Densitometrie deutlich höhere relative Standardabweichungen bei der Wiederhol- bzw. Laborpräzision und der Robustheit. Die Nachweisgrenze und respektive die Quantifizierungsgrenzen liegen bei der HPLC-Methode tiefer (LOD: 0,66 µg/ml; LOQ: 1,99 µg/ml) als bei der HPTLC-Methode (LOD: 1,66 µg/ml; LOQ: 5,04 µg/ml), d. h. mit der HPLC-Bestimmung lassen sich geringere Konzentrationen mit der geforderten Richtigkeit und Präzision quantifizieren. Eine mögliche Ursache für die relative Ungenauigkeit der HPTLC/Densitometriemethode ist die Derivatisierung mit Anisaldehydreakenz. Obwohl die Parameter der Derivatisierung wie Eintauchzeit, Temperatur der Heizplatte, Trocknungs- und Erhitzungsdauer sowie die Zeit von der Derivatisierung bis zum Scannvorgang immer gleichbleibend waren, zeigt gerade der große Unterschied zwischen den gemessenen Flächen der Wiederholpräzision (3373,8-4002,5 AU), dass die Qualität der Reagenzien

Siegesbeckienkraut 250

während 12 h abnimmt. Da die Mischung jeden Tag frisch hergestellt wurde, sind die Abweichungen der Laborpräzision an fünf aufeinanderfolgenden Tag geringer (3717,5-4058,7 AU). In der Literatur finden sich validierte HPTLC/Densitometriemethoden, die Anisaldehyd zur Derivatisierung verwenden, allerdings wurde dabei das Reagenz in seiner Zusammensetzung verändert [213]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nur die HPLC-Methode zur Gehaltsbestimmung von Kirenol in Siegesbeckiae herba für den DAB-Monographieentwurf verwendet.

7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aufgrund des wachsenden Interesses an pflanzlichen Drogen, insbesondere aus dem Bereich der Traditionellen Chinesischen Medizin in Europa, und der steigenden Anzahl an Meldungen über Verunreinigungen [19] sowie Verfälschungen und daraus resultierenden Folgeerkrankungen [12], entschied die Kommission des Deutschen Arzneibuchs 2005, dass Monographien für pflanzliche Drogen aus der Traditionellen Chinesischen Medizin entwickelt werden sollten. Die DAB Kommission erstellte eine Liste von sechs mit Vorrang zu bearbeitenden TCM-Drogenkandidaten, von denen drei in einer früheren Arbeit untersucht wurden [214]. Zur Erarbeitung der Monographien von *Artemisiae scopariae herba*, *Saposhnikoviae radix* und *Siegesbeckiae herab* wurden jeweils Handelsmuster bekannter TCM-Importeure sowie die im Zuge eines Pilotprojekts der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft kultivierten Drogen aus deutscher Herkunft untersucht.

Die Beschreibung der Droge im Abschnitt Definition im ChP 2010 wurde an die europäischen Standards angepasst, wobei z. B. Passagen wie „dried under the sun“ aufgrund fehlender standardisierbarer Möglichkeiten in Europa durch „getrocknet“ ersetzt wurden. Bei der makroskopischen und mikroskopischen Beschreibung der Droge wurden die Angaben der chinesischen Monographien aus der englischen Edition übersetzt, evaluiert und angepasst. Da in der Monographie des ChP 2010 von *Siegesbeckiae herba* keinerlei mikroskopische Untersuchungen vorhanden waren, mussten diese neu erstellt werden. Bei der Prüfung auf Identität C mittels Dünnschichtchromatographie wurden Methoden mit DC und HPTLC-Platten neu entwickelt, da die Fließmittelsysteme im ChP 2010 wegen toxikologischer Probleme (CHCl_3) nicht verwendbar waren. Die im ChP 2010 in den jeweiligen Monographien verwendeten Referenzsubstanzen wurden nach Untersuchung übernommen und die neu entwickelten Identitätmethoden hinsichtlich Stabilität, Spezifität, Präzision und Robustheit validiert. Reinheitsparameter, wie Trocknungsverlust, Aschebestimmung und Salzsäureunlösliche Asche wurden analog der Vorschriften des Ph. Eur 2012 durchgeführt und die Werte mit denen der ChP 2010 Monographie verglichen. Zur Gehaltsbestimmung der Markersubstanzen wurden die HPLC-Methoden aus der jeweiligen ChP 2010 Monographie evaluiert. Außer bei *Artemisiae scopariae herba*, bei der die bereits für *Cynarae folium* Ph. Eur. beschriebene Methode zur Gehaltsbestimmung verwendet wurde,

Zusammenfassung der Ergebnisse 252

wurden die Methoden hinsichtlich Trennzeit und Auflösung optimiert. Die Validierung der Gehaltsbestimmungen erfolgte nach ICH Guidelines und beinhaltete Stabilität, Spezifität, Präzision, Linearität, Robustheit und Wiederfindung.

Für *Saposhnikoviae radix* und *Siegesbeckiae herba* konnte eine alternative Gehaltsbestimmungsmethode durch dünnenschichtchromatographische Trennung (HPTLC) und anschließende densitometrische Vermessung etabliert werden. Für *Saposhnikoviae radix* wurde die äquivalente Verwendung zur HPLC-Bestimmung dokumentiert.

Bei der dünnenschichtchromatographischen Analyse (Identität C) fiel besonders im Fingerprint der phenolischen Inhaltsstoffe und des ätherischen Öls Unterschiede zwischen den chinesischen und den deutschen Mustern von *Artemisiae scopariae herba* auf, obwohl alle Proben genetisch zu *Artemisia scoparia* zugeordnet werden konnten. Ein in den bayerischen Proben auftretendes Flavonoid konnte isoliert und die Struktur als Quercitrin aufgeklärt werden. Nach Untersuchung des ätherischen Öls aus chinesischen und deutschen Herkünften konnte auch bei dieser Inhaltsstoffgruppe qualitative und quantitative Unterschiede aufgezeigt werden. Die bayerischen Muster von *Saposhnikoviae radix* und *Siegesbeckiae herba* zeigten indes keine Unterschiede zu den chinesischen Proben. Trotz teilweise verschiedenem Inhaltsstoffmuster sind die pflanzlichen Drogen aus deutschem Anbau uneingeschränkt verwendbar, da auch Unterschiede im Fingerprint zwischen Anbau und Wildsammlung der chinesischen Ware bekannt sind [215].

8 Summary

Due to the increasing interest in herbal drugs especially from Traditional Chinese Medicines, the German Pharmacopoeia Commission decided in 2005 to establish monographs for six TCM herbal drugs such as *Artemisiae scopariae herba*, *Saposhnikoviae radix* and *Siegesbeckiae herba*. In this study samples of Chinese origin and in Germany cultivated material deriving from a project initiated by the Bavarian State Research Center for Agriculture were analyzed to develop monographs for *Artemisiae scopariae herba*, *Saposhnikoviae radix* and *Siegesbeckiae herba*. To adapt the section “description or definition” from the Chinese Pharmacopoeia 2010 (ChP 2010) to European standards details like “dried in the sun” were generally changed into “dried” due to lacking practicability in Europe. For the section “microscopic and macroscopic identification (Identification A and B)” the texts from the Chinese monographs were evaluated and modified according to the “guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparations”. Due to the fact that the microscopic identification of *Siegesbeckiae herba* was missing in the ChP 2010, a completely new examination and description of the powdered drug had to be developed. Moreover, mobile phases for Identification C (TLC, HPTL) had to be updated due to toxicological reasons. Reference substances used in the ChP 2010 monographs for TLC were adopted after extensive inspection and the newly developed identification method was validated in view of stability, specificity, precision and robustness. Typical tests like loss of drying, total ash, ash insoluble in hydrochloric acid and foreign matter were performed according the regulations of the Ph. Eur and the results obtained were compared to the ChP 2010.

The HPLC quantification methods in the assay section for the three herbal drugs established in the ChP 2010 were reevaluated and except for *Artemisiae scopariae herba*, optimized for separation time and peak resolution. However, for the quantification of chlorogenic acid in *Artemisiae scopariae herba* the existing assay parameters form the *Cynarae folium* (Ph. Eur) monograph were applied. The HPLC quantification methods were validated according ICH guidelines concerning stability, specificity, precision, linearity, robustness and recovery. An alternative assay method using TLC-densitometry for *Saposhnikoviae radix* and

Summary 254

Siegesbeckiae herba was established and was shown to be equivalent and less time and solvent consuming to the HPLC method for Saponnikoviae radix.

The TLC fingerprint of phenolic compounds and essential oil showed remarkable differences between the German and the Chinese samples of Artemisiae scopariae herba despite all samples could be genetically assigned to the same species *Artemisia scoparia*. Furthermore, the flavonoid quercitrin was isolated from the samples of *Artemisia scoparia* originating from Germany. After analysis of the essential oil of Artemisiae scopariae herba significant qualitative and quantitative variations between the two geographical origins were demonstrated. Despite the *Artemisia scoparia* samples the specimens of German Saponnikoviae radix and Siegesbeckiae herba showed no differences in the chemical composition compared to the Chinese ones. Consequently, the German herbal drugs originating from Germany could be used in the practice of TCM since possible variation of chemical compounds between cultivated and wild collected herbs is known even for China.

9 Monographievorschläge für das DAB

9.1 Haariges Besenbeifußkraut

Haariges Besenbeifußkraut

Artemisiae scopariae herba

茵陈, Yinchen

Definition

Stammpflanze: *Artemisia scoparia* WALDST. ET KIT. oder *Artemisia capillaris* THUNB.

Droge: Die im Frühjahr gesammelten jungen Stängel mit Blättern

Gehalt: mindestens 0,2 Prozent Chlorogensäure ($C_{16}H_{18}O_9$; M_r 354,3), bezogen auf die getrocknete Droge.

Eigenschaften

Der Geruch ist aromatisch, der Geschmack ist schwach bitter.

Prüfung auf Identität

A. Großteils verknäult, grauweiß, weiß, graugrün oder grün gefärbt, samtig behaart bis fast kahl. Zarte, leicht brechbare Stängel, 1,5-2,5 cm lang, 0,1-0,2 cm im Durchmesser; nach Entfernung der Behaarung sind deutliche Längslinien an den Stängelseiten erkennbar. Gestielte Blätter, die ausgebreiteten Blattspreiten sind einfach oder dreizählig gefiedert, die Blätter sind 1-3 cm lang und bis zu 1 cm breit; die Fiederblättchen sind eiförmig, spatelförmig oder lineal geformt und am vorderen Ende zugespitzt.

B. Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat- Lösung R verwendet wird. Die Droge wird pulverisiert (500). Epidermiszellen mit wellig gekrümmten Antiklinalwänden und einem Längsdurchmesser von 30-100 µm; leicht aus der Oberfläche herausragende, anomocytische Stomata; viele T-Haare, die aus einem Stiel und einem Querbalken bestehen. Die Zelle des Querbalkens verläuft gerade oder ist an der Übergangsstelle zur Basis V-förmig geknickt. Die beiden Äste der T-Haare sind

Monographievorschläge für das DAB 256

unterschiedlich lang (Gesamtlänge von 600-1000 µm) und sitzen auf 1-2 Stielzellen. Gelegentlich finden sich Asteraceen-Drüsenhaare mit ovalen aus 2 halbrunden Drüsenzellen aufgebauten Drüsen, die mit gelbem Öl gefüllt sind.

C. Die Prüfung erfolgt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (2.2.27).

Untersuchungslösung: 0,1 g pulverisierte Droge (500) werden 30 min mit 10 ml Methanol 50% R im Ultraschallbad extrahiert. Die erhaltene Lösung wird filtriert, das Filtrat ist als Untersuchungslösung zu verwenden.

Referenzlösungen: 2,5 mg Rutin RN und 1,0 mg Chlorogensäure RN werden zu 10,0 ml in Methanol R gelöst.

Untersuchungsbedingungen

Stationäre Phase: DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (5 bis 40 µm) (oder DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (2 bis 10 µm))

Auftragen: 8 µl (4 µl) Referenzlösung und 8 µl (4 µl) Untersuchungslösung,

bandenförmig 1 cm (8 mm), getrennt auftragen

Fließmittel: Wasserfreie Ameisensäure R: Essigsäure 99% R: Wasser: Ethylacetat R (11:11:27:100, V/V/V/V)

Laufstrecke: 13 cm (6 cm)

Detektion und Auswertung

Nach 10 min langem Trocknen im Kaltluftstrom wird die Platte 5 min lang bei 100 °C erhitzt. Die noch warme Platte wird mit einer Lösung von Diphenylboryloxyethylamin R (10g l⁻¹) in Methanol R und anschließend mit einer Lösung von Macrogol 400 R (50g l⁻¹) in Methanol R besprüht. Die Auswertung erfolgt im ultravioletten Licht bei 365 nm. Die Zonenfolge von Referenzlösung und Untersuchungslösung in den Chromatogrammen ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich.

Oberer Plattenrand	
	eine blau fluoreszierende Zone
Chlorogensäure: eine hell-blau fluoreszierende Zone	Eine hell-blau fluoreszierende Zone (Chlorogensäure)
Rutin: eine gelb fluoreszierende Zone	
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (2.8.2): Höchstens 3 Prozent fremde Bestandteile

Trocknungsverlust (2.2.32): Höchstens 11,0 Prozent, mit 1,000 g pulverisierter Droge (500) durch 2 h langes Trocknen im Trockenschrank bei 105 °C bestimmt

Asche (2.4.16): Höchstens 14,0 Prozent

Salzsäureunlösliche Asche (2.8.1) Höchstens 5,0 Prozent

Gehaltsbestimmung

Die Bestimmung erfolgt mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie (2.2.29)

Untersuchungslösung: 0,500 g pulverisierte Droge (500) werden mit 50,0 ml Methanol 50% *R* versetzt. Die Mischung wird 1 h lang im Wasserbad von 70 °C unter Rückflusskühlung erhitzt. Die Lösung in einen 100-ml-Messkolben filtriert und mit Wasser *R* zu 100,0 ml aufgefüllt.

Referenzlösung: 0,3 mg Chlorogensäure *RN* werden in Methanol 50% *R* zu 10,0 ml gelöst

Säule:

Material: Rostfreier Stahl

Abmessungen: Länge 0,250 m, innerer Durchmesser 0,46 mm

Monographievorschläge für das DAB 258

Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R (5 µm)

Säulentemperatur: 40 °C

Elution:

Mobile Phase:

Fließmittel A: Eine Mischung von Wasser R mit 0,5% Phosphorsäure 85% R

Fließmittel B: Eine Mischung von Acetonitril R mit 0,5% Phosphorsäure 85% R

Durchflussrate: 1,2 ml min⁻¹

Typ: Gradientenelution

Zeit [min]	Mobile Phase A [% V/V]	Mobile Phase B [% V/V]
0 – 1	92	8
1 – 20	92→75	8→25
20 – 33	75	25
33 – 35	75→0	25→100
35 – 40	0	100

Detektor: Spektrometer bei einer Wellenlänge von 330 nm.

Untersuchungsbedingungen:

Injektionsvolumen: Je 25 µl, getrennt eingespritzt

Auflösung: Mindestens 1,5 zwischen den Peaks von Chlorogensäure und dem folgenden Peak

Aufzeichnungsdauer: 40 min

Auswertung:

Anhand der Retentionszeiten in dem Chromatogramm der Referenzlösung wird der Peak der Chlorogensäure gekennzeichnet. Die Flächen der Chlorogensäure in den Chromatogrammen der Referenzlösung und Untersuchungslösung werden ermittelt.

Der Prozentgehalt an Chlorogensäure, bezogen auf die getrocknete Droge, wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{m_1 * F_2 * p}{m_2 * F_1 * 100}$$

F_1 = Peakfläche Chlorogensäure im Chromatogramm der Referenzlösung

F_2 = Peakfläche Chlorogensäure im Chromatogramm der Untersuchungslösung

m_1 = Einwaage der Chlorogensäure in Milligramm

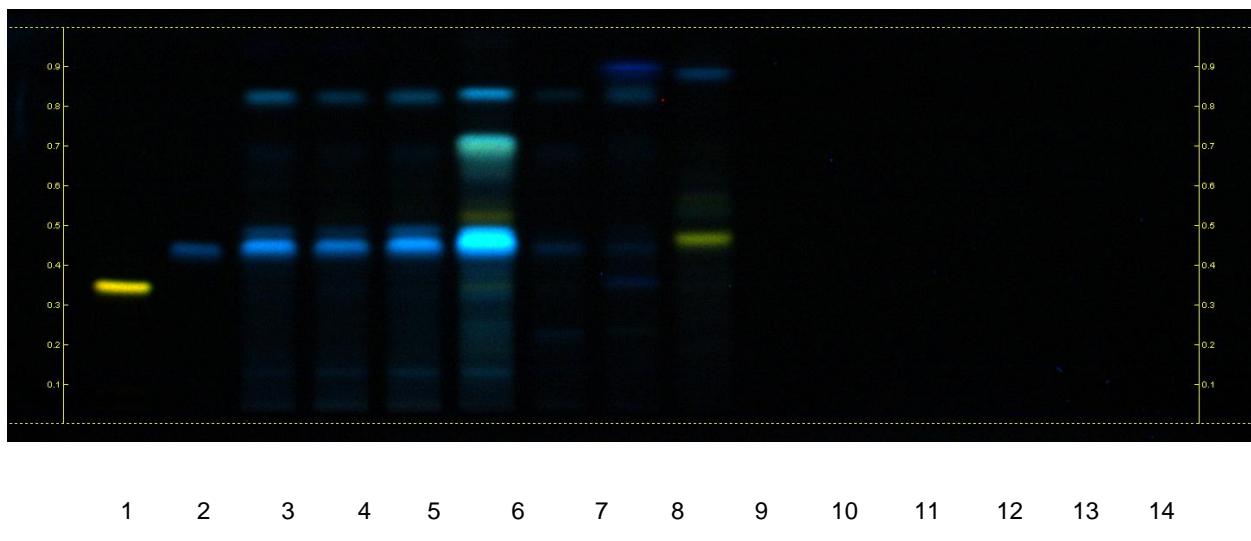
m_2 = Einwaage der Droge in Gramm

p = Prozentgehalt an Chlorogensäure in Chlorogensäure *RN*

Monographievorschläge für das DAB 260

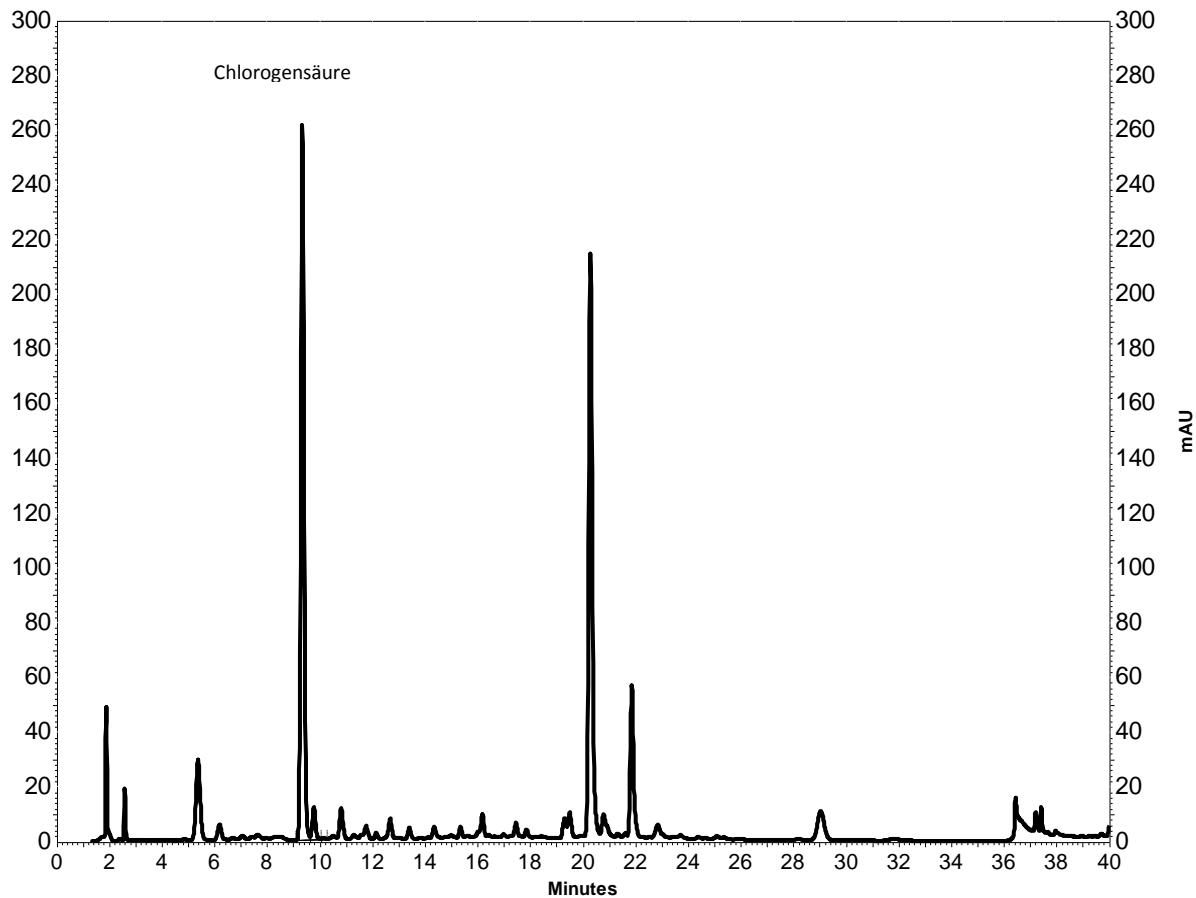
Anhang:

Bild nach Derivatisierung bei 366nm:



Bahn	Probe	Bahn	Probe
1	Rutin	9	<i>Origanum vulgare</i>
2	Chlorogensäure	10	-
3	<i>Artemisia scoparia</i> , China #1	11	-
4	<i>Artemisia scoparia</i> , China #2	12	-
5	<i>Artemisia scoparia</i> , China #3	13	-
6	<i>Artemisia scoparia</i> , Deutschland	14	-
7	<i>Artemisia absinthium</i>	15	-
8	<i>Artemisia annua</i>		

Chromatogramm bei 330 nm:



Monographievorschläge für das DAB 262

9.2 Saponikoviawurzel

Saponikoviawurzel

Saponikoviae radix

 防风, Fangfeng

Definition

Stammpflanze: *Saposhnikovia divaricata* (TURCZ.) SCHISCHK.

Droge: Die im Frühjahr oder im Herbst gesammelten Wurzeln, befreit von kleinen Wurzeln, Erde und getrocknet.

Gehalt: mindestens 0,24 Prozent Gesamtgehalt an Prim-O-glucosylcimifugin ($C_{22}H_{27}O_{11}$; M_r 468,46) und 4'-O- β -D-Glucosyl-5-O-methylvisamminol ($C_{22}H_{28}O_{10}$; M_r 452,46), bezogen auf die getrocknete Droge

Eigenschaften

Geruch: charakteristisch, Geschmack: schwach süßlich.

Prüfung auf Identität

A. Die langgestreckten spindelförmigen oder rundzyndrischen Wurzeln sind gegen den unteren Teil allmählich verjüngend, gelegentlich auch gekrümmmt, 15-30 cm lang, 0,5-2 cm im Durchmesser. Die raue graubraune Oberfläche weist längs verlaufende Furchen, zahlreiche quer gestellt, lang gestreckte Poren und erhabene Wurzelnarben auf. Am Wurzelkopf sind deutlich ausgeprägte, konzentrische Ringe erkennbar. Auf diesen Ringen sitzen häufig haarförmige, dunkelbraune Blattscheidenreste. Hellbrauner rissiger Rindenteil und blassgelbem Holzkörper.

B. Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat- Lösung R verwendet wird. Die Droge wird pulverisiert (355). Das hellbraune Pulver weist Korkfragmente auf. Gelbe Ölräume mit Durchmesser von 17-60 μm , von goldgelben Substanzen erfüllt. Die Gefäßbündel sind häufig von Faserbündeln begleitet. Netztracheiden mit Durchmesser von

Monographievorschläge für das DAB 264

14-85 µm. Vereinzelte gelb, lange, gestreckte rundliche oder rechteckige Sklereiden mit mäßig verdickter Zellwand.

C. Die Prüfung erfolgt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (2.2.27).

Untersuchungslösung: 1,0 g pulverisierte Droge (355) werden 30 min lang mit 10 ml Methanol R im Ultraschallbad extrahiert. Die erhaltene Lösung wird filtriert, das Filtrat ist als Untersuchungslösung zu verwenden.

Referenzlösungen: 1,0 mg Prim-O-glucosylcimifugin RN und 1,0 mg 4'-O- β -D-Glucosyl-5-O-methylvisamminol RN werden zu 1,0 ml in Methanol R gelöst.

Untersuchungsbedingungen

Stationäre Phase: DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (5 bis 40 µm) (oder DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (2 bis 10 µm))

Auftragsvolumen: 10 µl (7,0 µl) Referenzlösung und 10 µl (7,0 µl) Untersuchungslösung, bandförmig 1 cm (8 mm), getrennt aufgetragen

Fließmittel: Eine Mischung von Dichlormethan R: Methanol R: Acetonitril R 4:2:1 (V/V/V)

Laufstrecke: 10 cm (6 cm)

Detektion und Auswertung

Die Auswertung erfolgt im ultravioletten Licht bei 365 nm. Die Zonenfolge von Referenzlösung und Untersuchungslösung in den Chromatogrammen ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich.

Oberer Plattenrand	
	Eine blau fluoreszierende Zone Eine blau fluoreszierende Zone Eine blau fluoreszierende Zone
4'- <i>O</i> - β -D-Glucosyl-5'- <i>O</i> -methylvisamminol: eine blau fluoreszierende Zone	Eine blau fluoreszierende Zone Eine blau fluoreszierende Zone (4'- <i>O</i> - β -D-Glucosyl-5'- <i>O</i> -methylvisamminol)
Prim- <i>O</i> -glucosylcimifugin: eine blau fluoreszierende Zone	Eine blau fluoreszierende Zone (Prim- <i>O</i> -glucosylcimifugin) Eine blau fluoreszierende Zone
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (2.8.2): Höchstens 3 Prozent fremde Bestandteile

Trocknungsverlust (2.2.32): Höchstens 10,0 Prozent, mit 1,000 g pulverisierter Droge (355) durch 2 h langes Trocknen im Trockenschrank bei 100-105 °C bestimmt

Asche (2.4.16): Höchstens 6,5 Prozent

Salzsäureunlösliche Asche (2.8.1) Höchstens 1,5 Prozent

Gehaltsbestimmung

Vorschlag 1:

Die Bestimmung erfolgt mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie (2.2.29)

Untersuchungslösung: 0,500 g pulverisierte Droge (355) werden mit 10,0 ml Methanol *R* versetzt. Die Mischung wird 30 min lang im Wasserbad von 70 °C unter Rückflusskühlung erhitzt. Die Lösung in einen 10-ml-Messkolben filtriert und mit Methanol *R* zu 10,0 ml aufgefüllt.

Referenzlösungen: 2,5 mg Prim-O-glucosylcimifugin *RN* und 1,6 mg 4'-O-β-D-Glucosyl-5-O-methylvisamminol *RN* werden jeweils in Methanol *R* zu 10,0 ml gelöst

Säule:

Material: Rostfreier Stahl

Abmessungen: Länge 0,250 m, innerer Durchmesser 0,4 mm

Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie *R* (5 µm)

Säulentemperatur: 35 °C

Elution:

Mobile Phase:

Fließmittel A: Wasser *R*

Fließmittel B: Methanol *R*

Durchflussrate: 1,0 ml min⁻¹

Typ: Gradientenelution

Zeit [min]	Mobile Phase A [% V/V]	Mobile Phase B [% V/V]
0 – 5	60 → 45	40 → 55
5 – 10	45 → 40	55 → 40
10 – 15	40 → 0	40 → 0
15 – 20	0	100

Detektor: Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 300 nm.

Untersuchungsbedingungen:

Injektionsvolumen: Je 10 µl, getrennt eingespritzt

Aufzeichnungsdauer: 20 min

Auflösung: Mindestens 8,0 zwischen den Peaks von Prim-*O*-glucosylcimifugin und dem nachfolgendem Peak (Cimifugin) und 1,0 zwischen 4'-*O*-β-D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol und dem nachfolgendem Peak.

Auswertung:

Anhand der Retentionszeiten in den Chromatogramm der Referenzlösungen werden die Peaks von Prim-*O*-glucosylcimifugin und 4'-*O*-β-D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol gekennzeichnet. Die Flächen von Prim-*O*-glucosylcimifugin und 4'-*O*-β-D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol in den Chromatogrammen der Referenzlösung und Untersuchungslösung werden ermittelt.

Monographievorschläge für das DAB 268

Der Gesamtprozentgehalt an Prim-*O*-glucosylcimifugin und 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol, bezogen auf die getrocknete Droge, wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{m_1 * F_3 * p_1}{m_3 * F_1 * 1000} + \frac{m_2 * F_4 * p_2}{m_3 * F_2 * 1000}$$

F_1 = Peakfläche Prim-*O*-glucosylcimifugin im Chromatogramm der Referenzlösung

F_2 = Peakfläche 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol im Chromatogramm der Referenzlösung

F_3 = Peakfläche Prim-*O*-glucosylcimifugin im Chromatogramm der Untersuchungslösung

F_4 = Peakfläche 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol im Chromatogramm der Untersuchungslösung

m_1 = Einwaage der Prim-*O*-glucosylcimifugin in Milligramm

m_2 = Einwaage der 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol in Milligramm

m_3 = Einwaage der Droge in Gramm

p_1 = Prozentgehalt an Prim-*O*-glucosylcimifugin in Prim-*O*-glucosylcimifugin *RN*

p_2 = Prozentgehalt an 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol in 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol *RN*

Vorschlag 2:

Die Bestimmung erfolgt mit Hilfe der Densitometrie:

Untersuchungslösung: 0,500 g pulverisierte Droge (355) werden mit 10,0 ml Methanol *R* versetzt. Die Mischung wird 30 min lang im Wasserbad von 70 °C unter Rückflusskühlung erhitzt. Die Lösung wird in einen 10-ml-Messkolben filtriert und mit Methanol *R* zu 10,0 ml aufgefüllt.

Referenzlösungen:

Kalibrierlösung	Prim- <i>O</i> -glucosylcimifugin	4'- <i>O</i> - β -D-Glucosyl-5- <i>O</i> -methylvisamminol
Level 1	Stammlösung 1:5 mit Methanol verdünnt	Stammlösung 1:10 mit Methanol verdünnt
Level 2	Stammlösung 2:5 mit Methanol verdünnt	Stammlösung 1:5 mit Methanol verdünnt
Level 3	Stammlösung 3:5 mit Methanol verdünnt	Stammlösung 2:5 mit Methanol verdünnt
Level 4	Stammlösung 4:5 mit Methanol verdünnt	Stammlösung 3:5 mit Methanol verdünnt
Level 5	Stammlösung	Stammlösung 4:5 mit Methanol verdünnt
Stammlösung	5 mg in 20 ml Methanol lösen	4 mg in 20 ml Methanol lösen

Untersuchungsbedingungen

Stationäre Phase: HPTLC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ *R*

Auftragen: 4 µl Referenzlösung und 4 µl Untersuchungslösung, bandenförmig 1 cm, getrennt auftragen

Fließmittel: Dichlormethan *R*: Wasser *R*: Acetonitril *R* 4:2:1 (V/V/V)

Laufstrecke: 6 cm

Detektion: Deuteriumlampe bei einer Wellenlänge von 300 nm.

Auswertung:

Anhand der Retentionswerte der Peaks der Referenzlösungen im Densitogramm werden die Peaks von Prim-*O*-glucosylcimifugin und 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol gekennzeichnet. Die Flächen von Prim-*O*-glucosylcimifugin und 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol in den Densitogrammen der Referenzlösung und Untersuchungslösung werden ermittelt und die Konzentration wird aus der Kalibrierkurve errechnet.

Monographievorschläge für das DAB 270

Der Gesamtprozentgehalt an Prim-*O*-glucosylcimifugin und 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol, bezogen auf die getrocknete Droge, wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(c_1 * p_1) + (c_2 * p_2)}{m * 100}$$

c₁ = Konzentration an Prim-*O*-glucosylcimifugin in der Untersuchungslösung

c₂ = Konzentration an 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol in der Untersuchungslösung

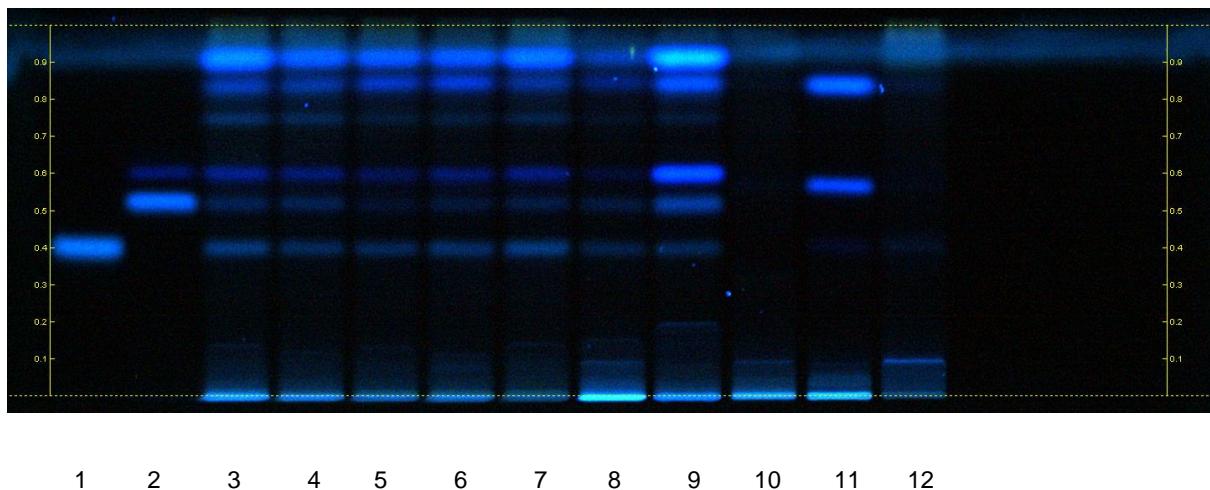
m = Einwaage der Droge in Gramm

p₁ = Prozentgehalt an Prim-*O*-glucosylcimifugin in Prim-*O*-glucosylcimifugin *RN*

p₂ = Prozentgehalt an 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol in 4'-*O*- β -D-Glucosyl-5-*O*-methylvisamminol *RN*

Anhang:

Bild bei 365 nm (Identität C):



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Bahn	Probe	Bahn	Probe
1	Prim-O-glucosylcimifugin	9	<i>Saposhnikovia divaricata</i>
2	4'-O- β -D-Glucosyl-5-O-methylvisamminol	10	<i>Carum carvi</i> Wurzel
3	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #1	11	<i>Daucus carota</i> Wurzel
4	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #2	12	<i>Seseli mairei</i> Wurzel
5	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #3	13	-
6	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #4	14	-
7	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #5	15	-
8	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #6		

Monographievorschläge für das DAB 272

Chromatogramm bei 300 nm (Bestimmung mit Flüssigkeitschromatographie):

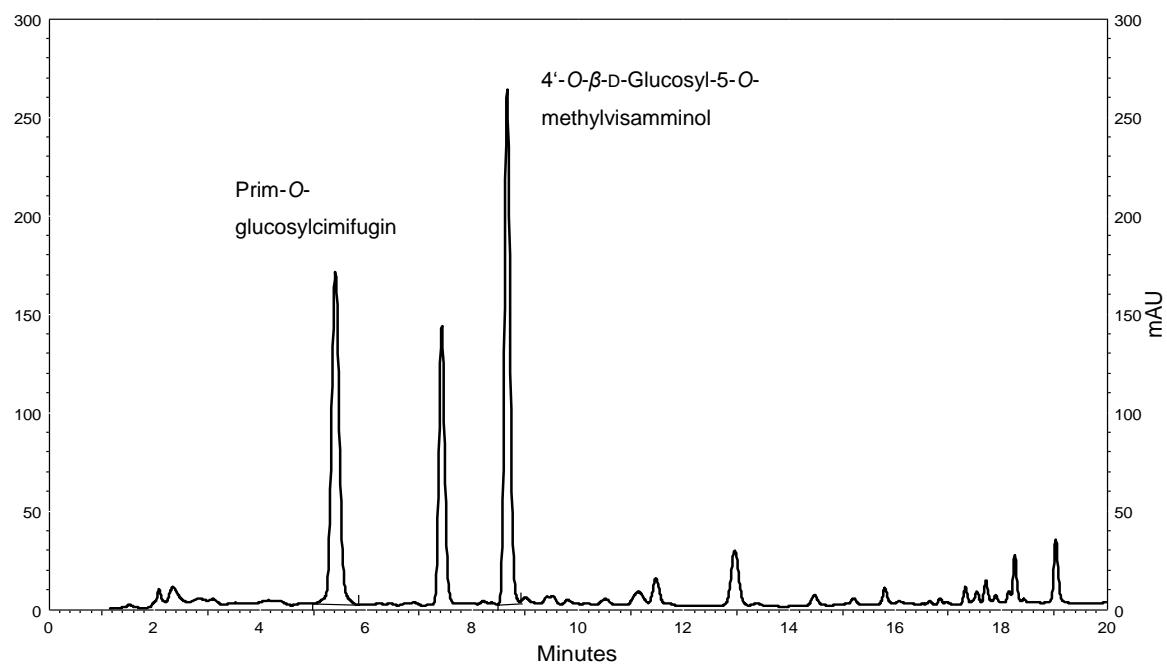
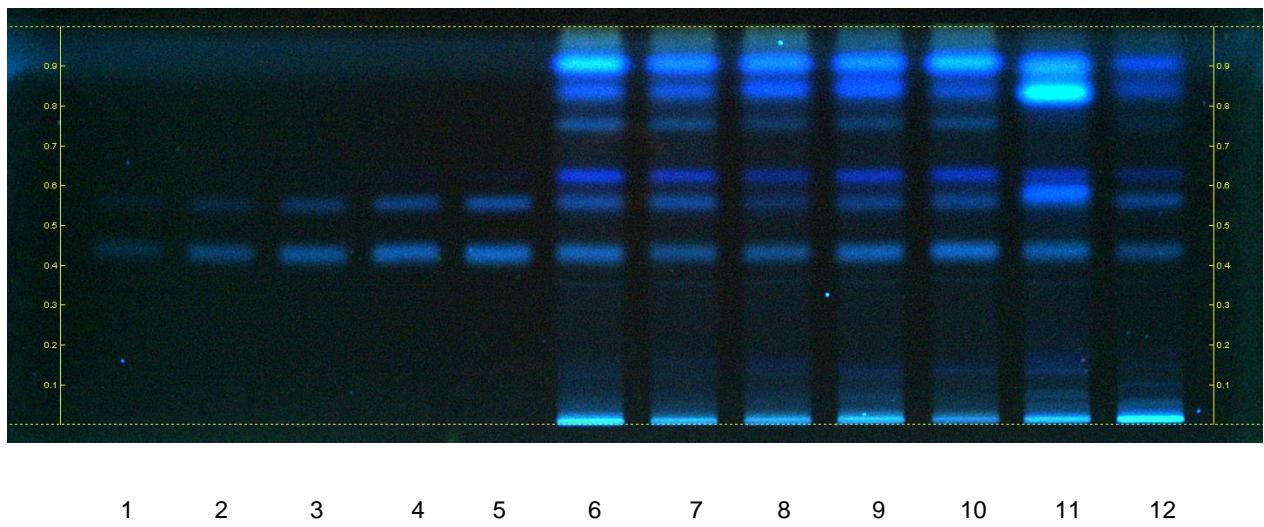


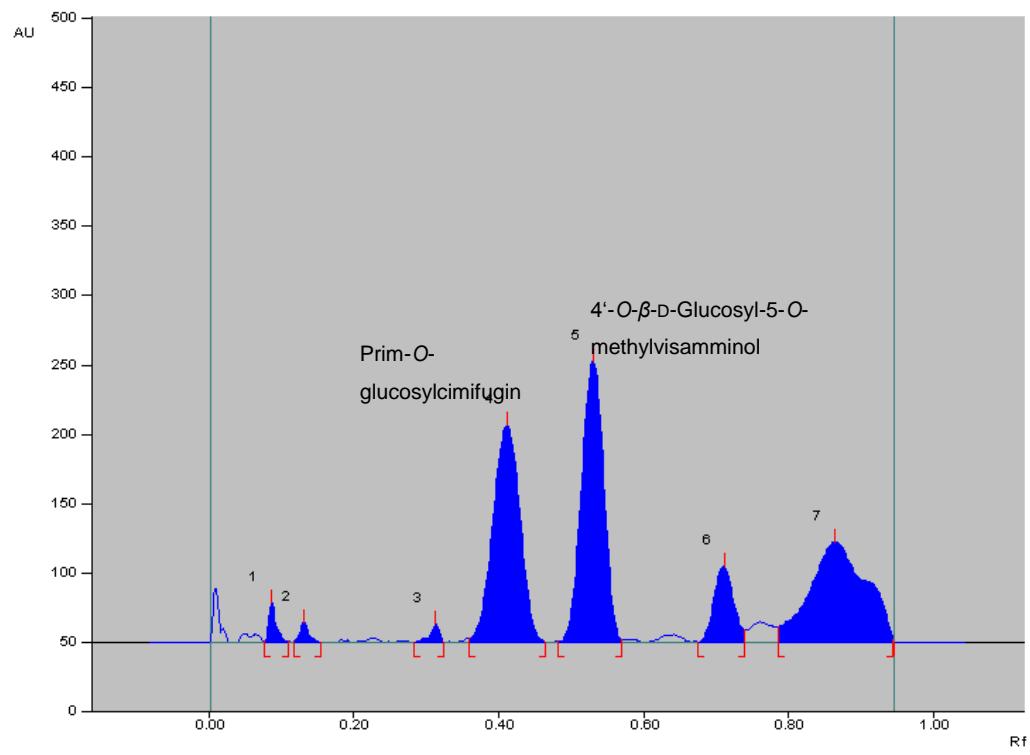
Bild bei 365nm (Bestimmung mit Densitometrie):



Bahn	Probe	Bahn	Probe
1	Referenzlösungen Level 1	9	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #4
2	Referenzlösungen Level 2	10	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #5
3	Referenzlösungen Level 3	11	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Deutschland
4	Referenzlösungen Level 4	12	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #6
5	Referenzlösungen Level 5		
6	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #1		
7	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #2		
8	<i>Saposhnikovia divaricata</i> China #3		

Monographievorschläge für das DAB 274

Densitogramm bei 300 nm:



9.3 Siegesbeckienkraut

Siegesbeckienkraut

Siegesbeckiae herba

豨莶草, Xixiancao

Definition

Stammpflanze: *Siegesbeckia glabrescens* MAKINO, *Siegesbeckia orientalis* L. und *Siegesbeckia pubescens* MAKINO.

Droge: Die im Sommer oder Herbst vor bzw. während der Blüte gesammelten, getrockneten oberirdischen Teile

Gehalt: mindestens 0,05 Prozent Kirenol ($C_{20}H_{34}O_4$; M_r 338,49), bezogen auf die getrocknete Droge

Eigenschaften

Geruch: schwach, Geschmack: schwach bitter.

Prüfung auf Identität

A. Das Kraut besteht aus 0,3-3,5 cm langen, 0,3-1,5 cm breiten grau-grün bis braun-violetten Stängel mit längsverlaufenden Furchen und weißer Behaarung. An den Bruchstellen findet sich weißes Mark, teilweise ist der Stängel hohl. Die grau-grünen, eiförmigen, gegenständigen Blätter zeigen leichte Behaarung auf Ober- und Unterseite. Die Blattspreite ist häufig zusammengerollt, unregelmäßig gezähnt und 3-nervig. Teilweise finden sich Blütenköpfchen mit gelben Zungen- und Röhrenblüten und lanzettlichen Hüllblättern.

B. Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat- Lösung R verwendet wird. Die Droge wird pulverisiert (355). Das Pulver ist graugrün oder graubraun und zeigt folgende Merkmale:

Monographievorschläge für das DAB 276

Spaltöffnungen vom anomocytischen Typ (2.8.3), Leitgewebragmente aus Stängel und Blattnerv, kugelförmige, etwa 25 µm große Pollenkörner mit stacheliger Exine und 3 Keimporen. Verschiedene Haartypen sind feststellbar: 2-reihige, mehrzellige Drüsenhaare; einreihige, vielzellige Deckhaare, spitz und gekrümmmt zulaufend, 200-400 µm lang; Drüsenhaare mit vielzelligem Stiel und vielzelligem Köpfchen 200-800 µm lang, wobei das Köpfchen abgebrochen sein kann.

C. Die Prüfung erfolgt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (2.2.27).

Untersuchungslösung: 1,5 g pulverisierte Droge (355) wird 30 min lang mit 10 ml Methanol R im Ultraschallbad extrahiert. Die erhaltene Lösung wird filtriert, das Filtrat ist als Untersuchungslösung zu verwenden.

Referenzlösungen: 1,0 mg Kirenol RN und 1,0 mg β -Sitosterol RN werden zu 10,0 ml in Methanol R gelöst.

Untersuchungsbedingungen

Stationäre Phase: DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (5 bis 40 µm) (oder DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (2 bis 10 µm))

Auftragsvolumen: 15 µl (10 µl) Referenzlösung und 15 µl (10 µl) Untersuchungslösung, bandförmig 1 cm (8 mm), getrennt aufgetragen

Fließmittel: Eine Mischung von Dichlormethan R: Methanol R 5:1 (V/V)

Laufstrecke: 10 cm (6 cm)

Detektion und Auswertung

Nach Verdunsten der mobilen Phase wird die Platte mit Anisaldehydreagenz R besprüht und 3 min bei 100 °C erhitzt. Die Auswertung erfolgt bei Tageslicht nach Derivatisierung. Die Zonenfolge von Referenzlösung und Untersuchungslösung in den Chromatogrammen ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich.

Oberer Plattenrand	
β-Sitosterol	Eine violette Zone Eine violette Zone (β-Sitosterol) Eine violette Zone
	Eine violette Zone Eine violette Zone
Kirenol	Eine violette Zone (Kirenol) (Eine violette Zone)
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (2.8.2): Höchstens 3 Prozent fremde Bestandteile

Trocknungsverlust (2.2.32): Höchstens 12,0 Prozent, mit 1,000 g pulverisierter Droge (355) durch 2 h langes Trocknen im Trockenschrank bei 100-105 °C bestimmt

Asche (2.4.16): Höchstens 12,0 Prozent

Gehaltsbestimmung

Die Bestimmung erfolgt mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie (2.2.29)

Untersuchungslösung: 1,00 g pulverisierte Droge (355) werden mit 50,0 ml Methanol R versetzt. Die Mischung wird 30 min lang im Wasserbad von 70 °C unter Rückflusskühlung erhitzt. Die Lösung wird in einen 50-ml-Messkolben filtriert und mit Methanol R zu 50,0 ml aufgefüllt.

Monographievorschläge für das DAB 278

Referenzlösungen: 0,2 mg Kirenol *RN* und in Methanol *R* zu 10,0 ml gelöst

Säule:

Material: Rostfreier Stahl

Abmessungen: Länge 0,250 m, innerer Durchmesser 0,4 mm

Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie *R* (5 µm)

Säulentemperatur: 40 °C

Elution:

Mobile Phase:

Fließmittel A: Wasser *R*

Fließmittel B: Acetonitril *R* 95%

Durchflussrate: 1,0 ml min⁻¹

Typ: Gradientenelution

Zeit [min]	Mobile Phase A [% V/V]	Mobile Phase B [% V/V]
0 – 15	75 → 60	25 → 40
15 – 20	60 → 0	40 → 100
20 – 25	0	100
25 – 30	0 → 75	100 → 25
30 – 35	75	25

Detektor: Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 215 nm

Untersuchungsbedingungen:

Injektionsvolumen: Je 10 µl, getrennt eingespritzt

Aufzeichnungsdauer: 20 min

Auswertung:

Anhand der Retentionszeit im Chromatogramm der Referenzlösung wird der Peak von Kirenol gekennzeichnet. Die Flächen von Kirenol in den Chromatogramme der Referenzlösung und Untersuchungslösung werden ermittelt.

Der Prozentgehalt an Kirenol, bezogen auf die getrocknete Droge, wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{m_1 * F_2 * p}{m_2 * F_1 * 200}$$

F_1 = Peakfläche Kirenol im Chromatogramm der Referenzlösung

F_2 = Peakfläche Kirenol im Chromatogramm der Untersuchungslösung

m_1 = Einwaage an Kirenol *RN* in Milligramm

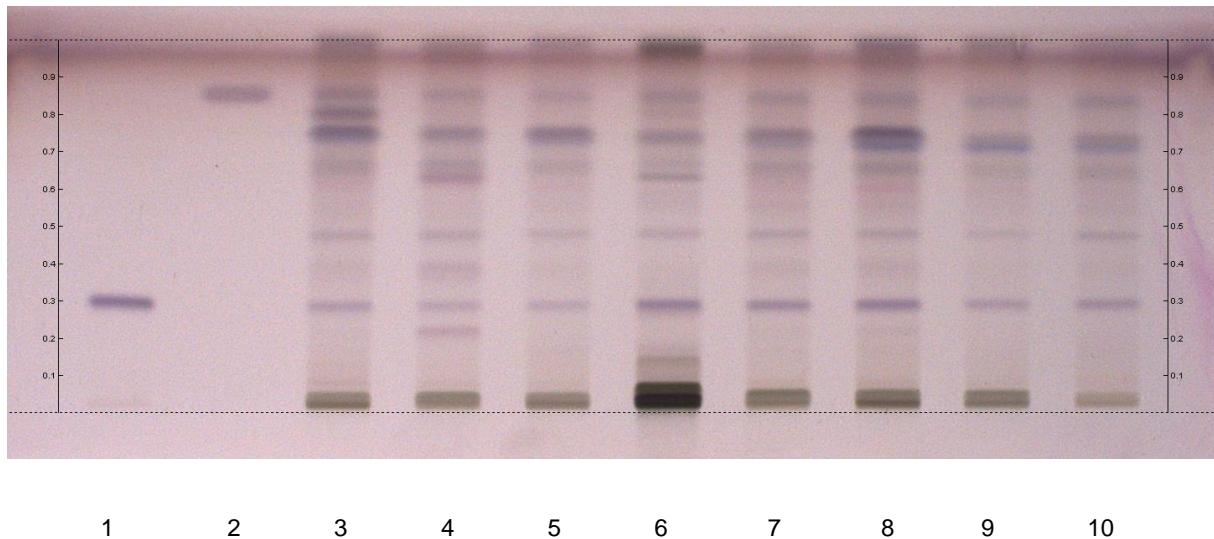
m_2 = Einwaage der Droge in Gramm

p = Prozentgehalt an Kirenol in Kirenol *RN*

Monographievorschläge für das DAB 280

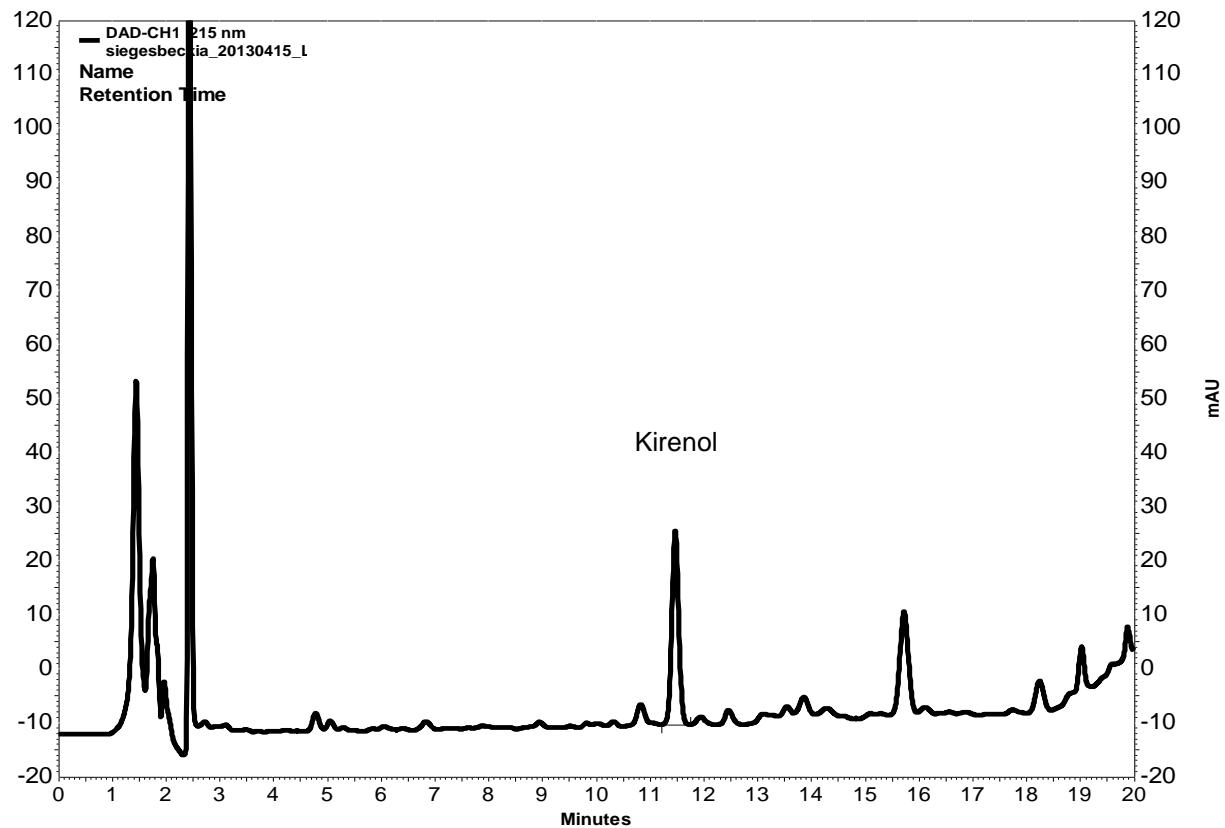
Anhang:

Bild bei Tageslicht nach Derivatisierung (Identität C):



Bahn	Probe	Bahn	Probe
1	Kirenol	6	Siegesbeckiae herba Deutschland
2	β -Sitosterol	7	Siegesbeckiae herba China #4
3	Siegesbeckiae herba China #1	8	Siegesbeckiae herba China #5
4	Siegesbeckiae herba China #2	9	Siegesbeckiae herba China #6
5	Siegesbeckiae herba China #3	10	Siegesbeckiae herba China #7

Chromatogramm bei 215 nm (Bestimmung mit Flüssigkeitschromatographie):



10 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AMG	Arzneimittelgesetz
ApBertO	Apothekenbetriebsordnung
APCI	atmospheric pressure chemical ionization (Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck)
CHCl ₃	Chloroform
ChP	Chinesisches Arzneibuch
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Diode-Array-Detector (Diodenarraydetektor)
DC	Dünnschichtchromatographie
DEV	Droge-Extraktverhältnis
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (Europäisches Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln)
ELSD	Evaporative-Light-Scattering Detector (Lichtstreuendetektor)
ESI	Elektrospray-Ionisation
FID	Flammenionisationsdetektor
GACP	Good Agricultural and Collection Practice (Gute landwirtschaftliche Praxis)
GC	Gaschromatographie
H ₂ O	Wasser
H ₃ PO ₄	ortho-Phosphorsäure
HKCMMS	Hong Kong Chinese Materia Medica Standards
HCl	Salzsäure
HPLC	High-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPTLC	High-performance thin-layer chromatography (Hochleistungsdünnschichtchromatographie)
HR	High-resolution
ITS	internal transcribed spacer
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
LOD	Limit of detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of quantification (Bestimmungsgrenze)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MV	4'- <i>O</i> -β-D-Glucosyl-5'- <i>O</i> -methylvisamminol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (Kernspinresonanzspektroskopie)
NOESY	nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy
PC	Prim- <i>O</i> -glucosylcimifugin
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Ph. Eur	Europäisches Arzneibuch
R _f	Retardationsfaktor
R _t	Retentionszeit
Stabw	Standardabweichung
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TLC	Thin-layer chromatography
V _K	Variationskoeffizient

11 Literatur

- [1] A. Körfers, Y. Sun, Traditionelle Chinesische Medizin: Arzneidrogen und Therapie, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart (2009)
- [2] F. Cheung. TCM: Made in China, Nature 480 (2011) 82.
- [3] D. Graham-Rowe. Biodiversity: Endangered and in demand, Nature 480 (2011) 101.
- [4] E. Stöger. Drogen der Traditionellen Chinesischen Medizin in westlichen Ländern in: R. Hänsel, O. Sticher (Eds.), Pharmakognosie — Phytopharmazie, Springer Berlin Heidelberg (2007) 431–461.
- [5] L. Huang, L. Guo, C. Ma, W. Gao, Q. Yuan. Top-geoherbs of traditional Chinese medicine: common traits, quality characteristics and formation, Front Med 5 (2011) 185–194.
- [6] Y. Tu. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine, Nat Med 17 (2011) 1217–1220.
- [7] N.J. White. Qinghaosu (Artemisinin): The Price of Success, Science 320 (2008) 330–334.
- [8] G.-Q. Chen, X.-G. Shi, W. Tang, S.-M. Xiong, J. Zhu, X. Cai, Z.-G. Han, J.-H. Ni, G.-Y. Shi, P.-M. Jia, M.-M. Liu, K.-L. He, C. Niu, J. Ma, P. Zhang, T.-D. Zhang, P. Paul, T. Naoe, K. Kitamura, W. Miller, S. Waxman, Z.-Y. Wang, H. de The, S.-J. Chen, Z. Chen. Use of Arsenic Trioxide (As_2O_3) in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia (APL): I. As_2O_3 Exerts Dose-Dependent Dual Effects on APL Cells, Blood 89 (1997) 3345–3353.
- [9] X. C. Tang, Y.F. Han. Pharmacological Profile of Huperzine A, a Novel Acetylcholinesterase Inhibitor from Chinese Herb, CNS Drug Rev 5 (1999) 281–300.
- [10] CBG-MEB - First Authorisation of Traditional Herbal Medicine from outside the European Union. (2013) http://www.cbg-meb.nl/CBG/en/human-medicines/actueel/First_Authorisation_of_Traditional_Herbal_Medicine_from_outside_the_European_Union/default.htm. Access on 25 November.
- [11] Z. Zhao, Y. Hu, Z. Liang, J. Yuen, Z. Jiang, K. Leung. Authentication is Fundamental for Standardization of Chinese Medicines, Planta Med 72 (2006) 865–874.
- [12a] J. L. Nortier, J. L. Vanherwegen. Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (Aristolochia fangchi), Toxicology 181–182 (2002) 577–580.
- [13] Z. Zhao, J. P Yuen, J. Wu, T. Yu, W. Huang. A systematic study on confused species of Chinese materia medica in the Hong Kong market, Ann Acad Med Singap 35 (2006) 764–769.
- [14] Chinese herbal medicine: Materia medica, 3rd ed., Eastland Press, Seattle (2004)
- [15] Z. Zhao, Z. Liang, K. Chan, G. Lu, E. L. Lee, H. Chen, L. Li. A Unique Issue in the Standardization of Chinese Materia Medica: Processing, Planta Med 76 (2010) 1975–1986.
- [16] J.K. Chen, T. T. Chen, Chinesische Pharmakologie I: 523 Arzneimonographien, 1. Aufl ed., Verl. Systemische Medizin, Bad Kötzting (2012)
- [17] G. Lu, Z. Dong, Q. Wang, G. Qian, W. Huang, Z. Jiang, K. Leung, Z. Zhao. Toxicity Assessment of Nine Types of Decoction Pieces from the Daughter Root of Aconitum carmichaeli (Fuzi) Based on the Chemical Analysis of their Diester Diterpenoid Alkaloids, Planta Med 76 (2010) 825–830.

- [18] T.-N. Wu, K.-C. Yang, C.-M. Wang, J.-S. Lai, K.-N. Ko, P.-Y. Chang, S.-H. Liou. Lead poisoning caused by contaminated *Cordyceps*, a Chinese herbal medicine: two case reports, *Sci Total Environ* 182 (1996) 193–195.
- [19] E.O. Espinoza, M.-J. Mann, B. Bleasdell. Arsenic and Mercury in Traditional Chinese Herbal Balls, *New Engl J Med* 333 (1995) 803–804.
- [20] M.-S. Wu, J.-J. Hong, J.-L. Lin, C.-W. Yang, H.-C. Chien. Multiple tubular dysfunction induced by mixed Chinese herbal medicines containing cadmium, *Nephrol Dial Transpl* 11 (1996) 867–870.
- [21] E. Ernst. Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines, *Trends Pharmacol Sci* 23 (2002) 136–139.
- [22] J. Zhang, B. Wider, H. Shang, X. Li, E. Ernst. Quality of herbal medicines: Challenges and solutions, *Complement Ther Medicine* 20 (2012) 100–106.
- [23] E. S. Harris., S. Cao, B. A. Littlefield, J. A. Craycroft, R. Scholten, T. Kaptchuk, Y. Fu, W. Wang, Y. Liu, H. Chen, Z. Zhao, J. Clardy, A. D. Woolf, D. M. Eisenberg. Heavy metal and pesticide content in commonly prescribed individual raw Chinese Herbal Medicines, *Sci Total Environ* 409 (2011) 4297–4305.
- [24] J. R. Hughes, E. M. Higgins, A. C. Pembroke. Oral dexamethasone masquerading as a Chinese herbal remedy, *Brit J Dermatol* 130 (1994) 261.
- [25] F. M. Keane, S. E. Munn, A. W. P. du Vivier, N. F. Taylor, E. M. Higgins. Analysis of Chinese herbal creams prescribed for dermatological conditions, *BMJ* 318 (1999) 563–564.
- [26] E. Ernst. Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review, *J Intern Med* 252 (2002) 107–113.
- [27] H. Doyle, M. Kargin. Herbal stimulant containing ephedrine has also caused psychosis, *BMJ* 313 (1996) 756.
- [28] M. Ihrig, A. Kaunzinger, J. Baumann, H. Orbig, K. Reising, R. Schäfer, C. Scholl. Qualitätsmängel bei TCM-Drogen, *Pharmazeutische Zeitung* (2004) 3776–3783.
- [29] J. Reichling, W.-D. Müller-Jahncke, A. Borchardt, *Arzneimittel der komplementären Medizin*, Govi, Eschborn (2001)
- [30] Aflatoxin VerbotsV - Verordnung über das Verbot der Verwendung von mit Aflatoxinen kontaminierten Stoffen bei der Herstellung von Arzneimitteln (2013) <http://www.gesetze-im-internet.de/aflatoxinverbotsv/BJNR108100000.html>, accessed 4 November 2013.
- [31] D. Shaw. Toxicological Risks of Chinese Herbs, *Planta Med* 76 (2010) 2012–2018.
- [32] I. R. Edwards, J. K. Aronson. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management, *Lancet* 356 (2000) 1255–1259.
- [33] K. Chan. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines, *Chemosphere* 52 (2003) 1361–1371.
- [34] Center for Food Safety and Applied Nutrition, Safety Alerts & Advisories - Aristolochic Acid: Listing of Botanical Ingredients of Concern, <http://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies/SafetyAlertsAdvisories/ucm095283.htm>, accessed 4 November 2013.
- [35] P. P. Fu, H.-M. Chiang, Q. Xia, T. A. Chen, B. H. Chen, J.-J. Yin, K.-C. Wen, G. E. Lin, H. Yu. Quality Assurance and Safety of Herbal Dietary Supplements, *J Environ Sci Heal, Part C* 27 (2009) 91–119.
- [36] P. P. Fu, Q. Xia, M. W. Chou, G. Lin. Detection, hepatotoxicity, and tumorigenicity and pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal plants and herbal dietary supplements, *Yaowu Shipin Fenxi* 15 (2007) 400–415.

- [37] S.-L. Li, G. Lin, P. P. FU, C.-L. Chan, M. Li, Z.-H. Jiang, Z.-Z. Zhao. Identification of five hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in a commonly used traditional Chinese medicinal herb, *Herba Senecionis scandentis* (*Qianliguang*), *Rapid Commun Mass Sp* 22 (2008) 591–602.
- [38] Pyrrolizidinalkaloide in Kräutertees und Tees - Stellungnahme 018/2013 des BfR vom 5. Juli 2013 - pyrrolizidinalkaloide-in-kraeutertees-und-tees.pdf (2013)
<http://www.bfr.bund.de/cm/343/pyrrolizidinalkaloide-in-kraeutertees-und-tees.pdf>, accessed 5 November 2013.
- [39] G. Valli, E.-G. V. Giardina. Benefits, adverse effects and drug interactions of herbal therapies with cardiovascular effects, *J Am Coll Cardiol* 39 (2002) 1083–1095.
- [40] Niedersächsisches OVG, Urteil vom 24. Oktober 2002 - Az. 11 LC 207/02,
<http://openjur.de/u/314076.html>, accessed 7 November 2013.
- [41] TCM und Kampo-Kräuter - Bayerische Landesapothekerkammer (2010)
<http://www.blak.de/d/items/tcm-und-kampo-kraeuter.html>, accessed 7 November 2013.
- [42] Übersicht über stark wirksame TCM - Drogen sowie deren mögliche Risiken bei der Anwendung - Bayerische Landesapothekerkammer (2011)
<http://www.blak.de/d/items/uebersicht-ueber-stark-wirksame-tcm-drogen-sowie-deren-moegliche.html>, accessed 7 November 2013.
- [43] Einleitung, in: *Europäisches Arzneibuch Allgemeiner Teil*, 7. Ausg., Grundwerk, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2011)
- [44] ICH, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), International Conference of Harmonisation, Genf (2005)
- [45] A. Artiges. The role of pharmacopoeias in international harmonisation, *J Pharmaceut Biomed* 24 (2001) 769–772.
- [46] Bericht zur Rechtsstellung der nichtkonventionellen Medizinrichtungen - Ausschuß für Umweltfragen, Volksgesundheit und Verbraucherschutz - A4-0075/1997,
<http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//TEXT+REPORT+A4-1997-0075+0+DOC+XML+V0//DE>, accessed 5 November 2013.
- [47] R. Bauer, G. Franz. Modern European Monographs for Quality Control of Chinese Herbs, *Planta Med* 76 (2010) 2004–2011.
- [48] H. Wagner, R. Bauer, D. Melchart, P.-G. Xiao, A. Staudinger (Eds.), *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines*, Springer Vienna, Vienna (2011)
- [49] H. Heuberger, R. Bauer, F. Friedl, G. Heubl, J. Hummelsberger, R. Nögel, R. Seidenberger, P. Torres-Londoño. Cultivation and Breeding of Chinese Medicinal Plants in Germany, *Planta Med* 76 (2010) 1956–1962.
- [50] EDQM, Technical Guide for the Elaboration of Monographs on herbal drugs and herbal drug preparations (2007) accessed 22 October 2013.
- [51] E. Reich, A. Schibli, *High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants*, Thieme, New York (2007)
- [52] 2.8.23 Mikroskopische Prüfung pflanzlicher Drogen, in: *Europäisches Arzneibuch Allgemeiner Teil*, 7. Ausg., Grundwerk, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2011) 356–357.
- [53] 2.1.4 Siebe, in: *Europäisches Arzneibuch Allgemeiner Teil*, 7. Ausg., Grundwerk, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2011) 22.
- [54] 2.2.27 Dünnschichtchromatographie, in: *Europäisches Arzneibuch Allgemeiner Teil*, 7. Ausg., Grundwerk, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2011) 55–57.
- [55] 2.2.32 Trocknungsverlust, in: *Europäisches Arzneibuch Allgemeiner Teil*, 7. Ausg., Grundwerk, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2011) 70.

- [56] 2.4.16 Asche, in: Europäisches Arzneibuch Allgemeiner Teil, 7. Ausg., Grundwerk, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2011) 165.
- [57] 2.8.1 Salzsäureunlösliche Asche, in: Europäisches Arzneibuch Allgemeiner Teil, 7. Ausg., Grundwerk, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2011) 341.
- [58] 2.8.12 Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls in Drogen, in: Europäisches Arzneibuch Allgemeiner Teil, 7. Ausg., Grundwerk, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2011) 343–344.
- [59] S. Jingbo, L. Xin, Y. He, Z. Lianxue. Comparative analysis of components in the volatile oil of *Saposhnikovia divaricata* collected from different areas at two different harvest times, International Conference on Human Health and Biomedical Engineering (2011) 1030–1033.
- [60] B. Demirci, F. Demirci, K. H. C. Başer. Headspace-SPME and hydrodistillation of two fragrant *Artemisia* sp., Flavour Fragr J 20 (2005) 395–398.
- [61] A. R. Hasler, Flavonoide aus *Ginkgo biloba* L. und HPLC-Analytik von Flavonoiden in verschiedenen Arzneipflanzen, Zürich (1990)
- [62] W. Gottwald, Statistik für Anwender, Wiley-VCH, Weinheim, (2000)
- [63] 2.2.46 Chromatographische Trennmethoden, in:Europäisches Arzneibuch Allgemeiner Teil, 7. Ausg., Grundwerk, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2011) 97–105.
- [64] T.A. Geissman, M. A. Irwin. Chemical contributions to taxonomy and phylogeny in the genus *Artemisia*, Pure Appl Chem 21 (1970) 167–180.
- [65] J. Vallès, M. Torrell, T. Garnatje, N. Garcia-Jacas, R. Vilatersana, A. Susanna. The Genus *Artemisia* and its Allies: Phylogeny of the Subtribe Artemisiinae (Asteraceae, Anthemideae) Based on Nucleotide Sequences of Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers (ITS), Plant Biology 5 (2003) 274–284.
- [66] D. Lopes-Lutz, D. S. Alviano, C. S. Alviano, P.P . Kolodziejczyk. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils, Phytochemistry 69 (2008) 1732–1738.
- [67] R. Tan, W. Zheng, H. Tang. Biologically Active Substances from the Genus *Artemisia*, Planta Med 64 (1998) 295–302.
- [68] Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2010th ed., China Medical science Press, Beijing, 2010.
- [69] R. Bauer, G. Franz. Modern European Monographs for Quality Control of Chinese Herbs, Planta Med 76 (2010) 2004–2011.
- [70] Flora of China Editorial Committee (Ed.), Flora of China, Vol. 20-21 Asteraceae, Science Press (2011)
- [71] Illustration: *Artemisia scoparia*,
http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=120510&flora_id=2, accessed 27 September 2013.
- [72] R. G. Kelsey, F. Shafizadeh. Sesquiterpene lactones and systematics of the genus *Artemisia*, Phytochemistry 18 (1979) 1591–1611.
- [73] C. H. Ma, W. Ke, Z.L. Sun, J. Y. Peng, Z. X. Li, X. Zhou, G. R. Fan, C. G. Huang. Large-Scale Isolation and Purification of Scoparone from Herba Artemisiae scopariae by High-Speed Counter-Current Chromatography, Chromatographia 64 (2006) 83–87.
- [74] Y. Kimura, H. Okuda, T. Okuda, T. Hatano, I. Agata, S. Arichi. Studies on the activities of tannins and related compounds; V. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver, Planta Med 50 (1984) 473–477.
- [75] X.-j. Tan, Q. Li, X.-h. Chen, Z.-w. Wang, Z.-y. Shi, K.-s. Bi, Y. Jia. Simultaneous determination of 13 bioactive compounds in Herba Artemisiae Scopariae (Yin Chen) from

- different harvest seasons by HPLC–DAD, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 47 (2008) 847–853.
- [76] T. Xie, J. Liu, J.-Y. Liang, Z.-M. Zhang, X.-L. Wei. Acetylenes and flavonoids from *Artemisia scoparia* Ll, Zhongguo Tianran Yaowu 3 (2005) 86–89.
- [77] J.-D. Cha, M.-R. Jeong, S.-I. Jeong, S.-E. Moon, J.-Y. Kim, B.-S. Kil, Y.-H. Song. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia scoparia* and *A. capillaris*, Planta Med 71 (2005) 186–190.
- [78] Artemisiae scopariae herba, in: Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2010th ed., China Medical science Press, Beijing (2010) 52–53.
- [79] S.-H. Kim, J.-H. Lim, I.-S. Shin, C. Moon, S.-H. Park, S.-H. Kim, J.-S. Lee, E.-H. Kwon, J.-C. Kim. Evaluation of the toxicological properties and hepatoprotective effects of PAI-N002, a mixture of herbal extracts, in rats, Mol Cell Toxicol 6 (2010) 239–246.
- [80] I. Okuno, K. Uchida, M. Kadokawa, A. Akahori. Choleretic effect of *Artemisia capillaris* extract in rats, Jpn J Pharmacol 31 (1981) 835–838.
- [81] H.-N. Koo, S.-H. Hong, H.-J. Jeong, E.-H. Lee, N.-G. Kim, S.-D. Choi, K.-W. Ra, K.-S. Kim, B.-K. Kang, J.-J. Kim, J.G. Oh, H.-M. Kim. Inhibitory effect of *Artemisia capillaris* on ethanol-induced cytokines (TNF- α , IL-1 α) secretion in Hep G2 cells, Immunopharmacol Immunotoxicol 24 (2002) 441–453.
- [82] M. Nurul Islam, H. A. Jung, H. S. Sohn, H. M. Kim, J. S. Choi. Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*, Arch Pharm Res 36 (2013) 542–552.
- [83] M. Habib, I. Waheed. Evaluation of anti-nociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities of *Artemisia scoparia* hydromethanolic extract, J Ethnopharmacol 145 (2013) 18–24.
- [84] T.-S. Wu, Z.-J. Tsang, P.-L. Wu, F.-W. Lin, C.-Y. Li, C.-M. Teng, K.-H. Lee. New constituents and antiplatelet aggregation and anti-HIV principles of *Artemisia capillaris*, Bioorgan Med Chem 9 (2001) 77–83.
- [85] C.-X. Liu, G.-Z. Ye. Choleretic activity of p-hydroxyacetophenone isolated from *Artemisia scoparia* WALDST. ET KIT. in the rat, Phytother Res 5 (1991) 182–184.
- [86] S. I. Jang, Y.-J. Kim, H. J. Kim, J.-C. Lee, H.-Y. Kim, Y.-C. Kim, Y.-G. Yun, H.-H. Yu, Y.-O. You. Scoparone inhibits PMA-induced IL-8 and MCP-1 production through suppression of NF- κ B activation in U937 cells, Life Sci 78 (2006) 2937–2943.
- [87] S. Jang II, Y.-J. Kim, W.-Y. Lee, K. C. Kwak, S. H. Baek, G. B. Kwak, Y.-G. Yun, T.-O. Kwon, H. T. Chung, K.-Y. Chai. Scoparone from *Artemisia capillaris* inhibits the release of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells upon stimulation cells by interferon- γ plus LPS, Arch Pharm Res 28 (2005) 203–208.
- [88] Y. L. Chen, H. C. Huang, Y. I. Weng, Y. J. Yu, Y. T. Lee. Morphological evidence for the antiatherogenic effect of scoparone in hyperlipidaemic diabetic rabbits, Cardiovasc Res 28 (1994) 1679–1685.
- [89] Y. Kiso, S. Ogasawara, K. Hirota, N. Watanabe, Y. Oshima, C. Konno, H. Hikino. Antihepatotoxic principles of *Artemisia capillaris* buds, Planta Med 50 (1984) 81–85.
- [90] 2.8.3 Spaltöffnung und Spaltöffnungsindex, in: Europäisches Arzneibuch Allgemeiner Teil, 7. Ausg., Grundwerk, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2011) 341.
- [91] Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2005th ed., China Medical science Press, Beijing (2005)
- [92] I. Chandrasekharan, H. Khan, A. Ghani. Flavonoids from *Artemisia scoparia*, Planta Med 43 (1981) 310–311.

- [93] K. R. Markham. Flavones, Flavonols and their Glycosides, Methods in Plant Biochemistry 1 (1989) 197–235.
- [94] R. Neu. Aromatische Borsäuren als bathochrome Reagentien für Flavone, Z Anal Chem Freseniu 151 (1956) 328–332.
- [95] *Artemisia*, in: F. von Bruchhausen, H. Hager (Eds.), Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Springer (1949) 357–377.
- [96] Wermutkraut, in: Deutsches Arzneibuch, 9. Ausg., Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (1986)
- [97] Wermutkraut, in: Europäisches Arzneibuch, 7. Ausg., 1. Nachtrag, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2012) 4938–4939.
- [98] Yin Chen, in: Chinese herbal medicine: Materia medica, 3rd ed., Eastland Press, Seattle (2004) 310–312.
- [99] Arnikablüten, in: Europäisches Arzneibuch, 7. Ausg., 1. Nachtrag, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2012) 5602–5604.
- [100] Artischockenblätter, in: Europäisches Arzneibuch, 7. Ausg., 1. Nachtrag, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2012) 5604–5606.
- [101] Brennesselblätter, in: Europäisches Arzneibuch, 7. Ausg., Grundwerk, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart (2011) 1669–1671.
- [102] Herba Artemisiae scopariae, in: Easily Confused Chinese Medicines in Hong Kong, Chinese Medicine Merchants Association (2007) 150–151.
- [103] R. Harada, M. Iwasaki. Volatile components of *Artemisia capillaris*, Phytochemistry 21 (1982) 2009–2011.
- [104] J. Safaei-Ghomí, A. Bamoniri, M. B. Sarafraz, H. Batooli. Volatile components from *Artemisia scoparia* WALDST ET KIT growing in central Iran, Flavour Fragr J 20 (2005) 650–652.
- [105] C. Deng, Y. Mao, F. Hu, X. Zhang. Development of gas chromatography–mass spectrometry following microwave distillation and simultaneous headspace single-drop microextraction for fast determination of volatile fraction in Chinese herb, J Chromatogr A 1152 (2007) 193–198.
- [106] K. E. Hendrycy. Effect of trichomes on transpiration and ion uptake in *Verbascum thapsus*, Bios (Madison, N. J.) 39 (1968) 21–26.
- [107] I. Álvarez, J. F. Wendel. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference, Mol Phylogenet Evol 29 (2003) 417–434.
- [108] G. Heubl. New Aspects of DNA-based Authentication of Chinese Medicinal Plants by Molecular Biological Techniques, Planta Med 76 (2010) 1963–1974.
- [109] C. R. Hobbs, B.G. Baldwin, M. Carine. Asian origin and upslope migration of Hawaiian *Artemisia* (Compositae-Anthemideae), J Biogeogr 40 (2013) 442–454.
- [110] S. E. Sultan. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history, Trends Plant Sci 5 (2000) 537–542.
- [111] R. M. Callaway, S. C. Pennings, C. L. Richards. Phenotypic plasticity and interaction among plants, Ecology 84 (2003) 1115–1128.
- [112] A. Monty, J.-P. Bizoux, J. Escarré, G. Mahy. Rapid Plant Invasion in Distinct Climates Involves Different Sources of Phenotypic Variation, PLoS ONE 8 (2013) e55627.
- [113] S. Nautiyal. Altitudinal effects on the leaf morphology of four *Artemisia* species, Indian J Plant Physiol 35 (1992) 1–6.
- [114] J. N. Barney, A. DiTommaso. The biology of Canadian weeds. 118. *Artemisia vulgaris* L., Can J Plant Sci 83 (2003) 205–215.

- [115] M. Ali, A. Chaudhari, A. Velasco-Negueruela, M.J. Pérez-Alonso. Volatile Constituents of *Artemisia scoparia* WALDST ET KIT. Leaves, J Essent Oil Res 12 (2000) 64–66.
- [116] H. P. Singh, S. Kaur, S. Mittal, D. R. Batish, R. K. Kohli. Phytotoxicity of major constituents of the volatile oil from leaves of *Artemisia scoparia* WALDST. ET KIT, Z. Naturforsch., C 63 (2008) 663–666.
- [117] R. Kapoor, M. Ali, S. R. Mir, M. R. M. Rafiullah. Essential oil constituents of aerial parts of *Artemisia scoparia* WALDST. ET KIT, Flavour Fragr J 19 (2004) 109–111.
- [118] H. P. Singh, S. Kaur, S. Mittal, D. R. Batish, R. K. Kohli. Essential Oil of *Artemisia scoparia* Inhibits Plant Growth by Generating Reactive Oxygen Species and Causing Oxidative Damage, J Chem Ecol 35 (2009) 154–162.
- [119] K. Morteza-Semnani, M. Akbarzadeh. Essential Oils Composition of Iranian *Artemisia absinthium* L. and *Artemisia scoparia* WALDST. ET KIT, J Essent Oil Res 17 (2005) 321–322.
- [120] M. H. Mirjalili, S. M. Tabatabaei, J. Hadian, S. N. Ebrahimi, A. Sonboli. Phenological Variation of the Essential Oil of *Artemisia scoparia* WALDST. ET KIT from Iran, J Essent Oil Res 19 (2007) 326–329.
- [121] J. Safaei-Ghomí, A. Bamóniri, M. B. Sarafraz, H. Batooli. Volatile components from *Artemisia scoparia* WALDST ET KIT growing in central Iran, Flavour Fragr J 20 (2005) 650–652.
- [122] K. Yano. Variation in acetylene content of different ecotypes of *Artemisia capillaris*, Phytochemistry 14 (1975) 1783–1784.
- [123] M. Miyazawa, H. Kameoka. The essential oil of *Artemisia capillaris*, Phytochemistry 16 (1977) 1054–1057.
- [124] C. Deng, Y. Mao, F. Hu, X. Zhang. Development of gas chromatography–mass spectrometry following microwave distillation and simultaneous headspace single-drop microextraction for fast determination of volatile fraction in Chinese herb, J Chromatogr A 1152 (2007) 193–198.
- [125] F.-Q. Guo, Y.-Z. Liang, C.-J. Xu, X.-N. Li, L.-F. Huang. Analyzing of the volatile chemical constituents in *Artemisia capillaris* herba by GC–MS and correlative chemometric resolution methods, J Pharmaceut Biomed 35 (2004) 469–478.
- [126] S. Jiang, P. Lai, J. Li, G. Wang. Antioxidant Activities and Essential Oil Composition of Herba Artemisiae Scopariae from China, J Oleo Sci 61 (2012) 291–295.
- [127] F.-Q. Guo, Y.-Z. Liang, C.-J. Xu, L.-F. Huang, X.-N. Li. Comparison of the volatile constituents of *Artemisia capillaris* from different locations by gas chromatography–mass spectrometry and projection method, J Chromatogr A 1054 (2004) 73–79.
- [128] G. V. Khodakov, I. V. Kotikov. Component composition of essential oil from *Artemisia annua* and *A. scoparia*, Chem Nat Compd 45 (2009) 909–912.
- [129] I. Jerkovic, J. Mastelic, M. Milos, F. Juteau, V. Masotti, J. Viano. Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia, Flavour Fragr J 18 (2003) 436–440.
- [130] T. E. Wallaart, N. Pras, A.C. Beekman, W. J. Quax. Seasonal Variation of Artemisinin and its Biosynthetic Precursors in Plants of *Artemisia annua* of Different Geographical Origin: Proof for the Existence of Chemotypes, Planta Med 66 (2000) 57–62.
- [131] K. M. Park, Y. Li, B. Kim, H. Zhang, K. Hwangbo, D. G. Piao, M. J. Chi, M.-H. Woo, J. S. Choi, J.-H. Lee, D.-C. Moon, H. W. Chang, J.-R. Kim, J. K. Son. High-performance liquid chromatographic analysis for quantitation of marker compounds of *Artemisia capillaris* THUNB., Arch Pharm Res 35 (2012) 2153–2162.
- [132] Artemisia-Flora of Pakistan. <http://www.tropicos.org/Name/40020036?projectId=32>. Access on 20 November 2013.

- [133] Artemisia capillaris-Checklist of the Flowering Plants of Nepal.
http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=110&taxon_id=200023185. Access on 20 November 2013.
- [134] Flora of China, Vol. 14 Apiaceae through Ericaceae, Science Press, Beijing (2005)
- [135] Fang feng, in: Chinese herbal medicine: Materia medica, 3rd ed., Eastland Press, Seattle (2004) 234–235.
- [136] Saposhnikoviae radix, in: Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2010th ed., China Medical science Press, Beijing (2010) 386–387.
- [137] W. Li, Z. Wang, Y.-s. Sun, L. Chen, L.-k. Han, Y.-n. Zheng. Application of response surface methodology to optimise ultrasonic-assisted extraction of four chromones in Radix Saposhnikoviae, *Phytochem Analysis* 22 (2011) 313–321.
- [138] B. Zhao, X.-B. Yang, X.-W. Yang, Q. Wu, Y. Wang, L.-X. Zhang, W. Xu. Intestinal Permeability of the Constituents from the Roots of *Saposhnikovia divaricata* in the Human Caco-2 Cell Monolayer Model, *Planta Med* 77 (2011) 1531–1535.
- [139] J. Kang, J.-H. Sun, L. Zhou, M. Ye, J. Han, B.-R. Wang, D.-A. Guo. Characterization of compounds from the roots of *Saposhnikovia divaricata* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Sp* 22 (2008) 1899–1911.
- [140] H. Sasaki, H. Taguchi, T. Endo, I. Yosioka. The constituents of *Ledebouriella seseloides* WOLFF. L. Structures of three new chromones, *Chem Pharm Bull* 30 (1982) 3555–3562.
- [141] Illustration: Saposhnikovia divaricata,
<http://www.tropicos.org/ImageFullView.aspx?imageid=73161>, accessed 27 September 2013.
- [142] E. Okuyama, T. Hasegawa, T. Matsushita, H. Fujimoto, M. Ishibashi, M. Yamazaki. Analgesic components of Saposhnikovia root (*Saposhnikovia divaricata*), *Chem Pharm Bull* 49 (2001) 154–160.
- [143] B. Xue, W. Li, L. Li, Y. Xiao. Pharmacodynamic study on chromone glucosides of *Saposhnikovia divaricata*, *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 25 (2000) 297–299.
- [144] J. Dai, X. Chen, W. Cheng, X. Liu, X. Fan, Z. Shen, K. Bi. A sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method for simultaneous determination of two active chromones from Saposhnikovia root in rat plasma and urine, *J Chromatogr B* 868 (2008) 13–19.
- [145] N. Shimizu, M. Tomoda, R. Gonda, M. Kanari, N. Takanashi, N. Takahashi. The major pectic arabinogalactan having activity on the reticuloendothelial system from the roots and rhizomes of *Saposhnikovia divaricata*, *Chem Pharm Bull* 37 (1989) 1329–1332.
- [146] L.-F. Yu, X.-R. Li, S.-Y. Liu, G.-W. Xu, Y.-Z. Liang. Comparative analysis of essential components between the herbal pair Radix Saposhnikoviae–Rhizoma seu Radix Notopterygii and its single herbs by GC-MS combined with a chemometric resolution method, *Anal Methods* 1 (2009) 45–51.
- [147] K. Baba, Y. Tabata, M. Kozawa, Y. Kimura, S. Arichi. Studies on Chinese traditional medicine Fang-feng (I). Structures and physiological activities of polyacetylene compounds from Saposhnikoviae radix, *Shoyakugaku Zasshi* 41 (1987) 189–194.
- [148] Y.-C. Kuo, Y.-L. Lin, C.-P. Huang, J.-W. Shu, W.-J. Tsai. A tumor cell growth inhibitor from *Saposhnikoviae divaricata*, *Cancer Invest* 20 (2002) 955–964.
- [149] Y.-Y. Xin, A.-J. Deng, G.-H. Du, J.-L. Zhang, H.-L. Qin. Fingerprinting Analysis of *Saposhnikovia divaricata* using ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and High Performance Liquid Chromatography, *J Integr Plant Biol* 52 (2010) 782–792.

- [150] L.P. Christensen, K. Brandt. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis, *J Pharmaceut and Biomed* 41 (2006) 683–693.
- [151] C. Deng, X. Yang, X. Zhang. Rapid determination of panaxynol in a traditional Chinese medicine by pressurized hot water extraction followed by liquid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Talanta* 68 (2005) 6–11.
- [152] ICH, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities: Guideline for Residual Solvents, Q3C(R5), International Conference of Harmonisation, Genf (1997)
- [153] Z. Yan, R. Yang, Y. Jiang, Z. Yang, J. Yang, Q. Zhao, Y. Lu. Induction of Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia HL60 Cells by Panaxynol and Panaxydol, *Molecules* 16 (2011) 5561–5573.
- [154] H. Heuberger, mündliche Mitteilung (2013)
- [155] B. Rahfeld, *Mikroskopischer Farbatlas pflanzlicher Drogen*, 2. Aufl, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg (2011)
- [156] C.-N. Wang, Y.-J. Shiao, Y.-H. Kuo, C.-C. Chen, Y.-L. Lin. Inducible nitric oxide synthase inhibitors from *Saposhnikovia divaricata* and *Panax quinquefolium*, *Planta Med* 66 (2000) 644–647.
- [157] Y. Yan, H. Zhang, G. Jin, F. Zhang, X. Liang, A Comparative Study of *Saposhnikovia divaricata* Volatile Oils, http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-SJKX200903015.htm, accessed 8 October 2013.
- [158] J. Alanko, Y. Kurahashi, T. Yoshimoto, S. Yamamoto, K. Baba. Panaxynol, a polyacetylene compound isolated from oriental medicines, inhibits mammalian lipoxygenases, *Biochem Pharmacol* 48 (1994) 1979–1981.
- [159] X. Kong, C. Liu, C. Zhang, J. Zhao, J. Wang, H. Wan, H. Zhu, P. Zhang, W. Chen, Y. Xiao, N. Lin. The suppressive effects of *Saposhnikovia divaricata* (Fangfeng) chromone extract on rheumatoid arthritis via inhibition of nuclear factor- κ B and mitogen activated protein kinases activation on collagen-induced arthritis model, *J Ethnopharmacol* 148 (2013) 842–850.
- [160] B. Zhao, X.-B. Yang, X.-W. Yang, J.-X. Liu. Biotransformation of prim-O - glucosylcimifugin by human intestinal flora and its inhibition on NO production and DPPH free radical, *J Asian Nat Prod Res* 14 (2012) 886–896.
- [161] L.-Q. Guo, M. Taniguchi, Q.-Y. Chen, K. Baba, Y. Yamazoe. Inhibitory Potential of Herbal Medicines on Human Cytochrome P450-Mediated Oxidation: Properties of Umbelliferous or Citrus Crude Drugs and Their Relative Prescriptions, *Jpn. J Pharmacol* 85 (2001) 399–408.
- [162] Q. Chen, P. Li, B. Li, H. He, H. Yang, J. Zhu. Characterization and quantification of prim-O-glucosylcimifugin in the roots of *Saposhnikovia divaricata* and its medicinal preparations by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry, *J Liq Chromatogr R T* 36 (2013) 1586–1596.
- [163] Z. Yan, X. Yang, J. Wu, H. Su, C. Chen, Y. Chen. Qualitative and quantitative analysis of chemical constituents in traditional Chinese medicinal formula Tong-Xie-Yao-Fang by high-performance liquid chromatography/diode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal Chim Acta* 691 (2011) 110–118.
- [164] M.K. Kim, D.-H. Yang, M. Jung, E.H. Jung, H.Y. Eom, J.H. Suh, J.W. Min, U. Kim, H. Min, J. Kim, S.B. Han. Simultaneous determination of chromones and coumarins in *Radix Saposhnikoviae* by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors, *J Chromatogr A* 1218 (2011) 6319–6330.

- [165] Y.-Y. Li, X.-X. Wang, L. Zhao, H. Zhang, L. Lv, G.-c. Zhou, Y.-F. Chai, G.-Q. Zhang. High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis of Radix Saponariae for Metabolomic Research, *J Chromatogr Sci* 51 (2013) 99–106.
- [166] C.v. Linné, *Hortus Cliffortianus plantas quas in hortis tam vivis quam siccis, Hartecampi in Hollandia, coluit vir nobilissimus et generosissimus Georgius Clifford, juris utriusque doctor, reductis varietatibus ad species, speciebus ad genera, generibus ad classes, adjectis locis plantarum natalibus differentiisque specierum: Cum tabulis aeneis, Amstelaedami, (1737)*
- [167] W. Irsch. Carl von Linné, *Biol Unserer Zeit* 37 (2007) 406.
- [168] *Sigesbeckia pubescens*, in: Flora of China Editorial Committee (Ed.), *Flora of China*, Vol. 20-21 Asteraceae, Science Press (2011) 866.
- [169] Siegesbeckiae herba, in: *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, 2010th ed., China Medical science Press, Beijing (2010) 407–408.
- [170] B.K. Kang, E.H. Lee, H.M. Kim. Inhibitory effects of Korean folk medicine 'Hi-Chum' on histamine release from mast cells in vivo and in vitro, *J Ethnopharmacol* 57 (1997) 73–79.
- [171] R. Wang, W.-H. Chen, Y.-P. Shi. ent -Kaurane and ent -Pimarane Diterpenoids from *Sigesbeckia pubescens*, *J Nat Prod* 73 (2010) 17–21.
- [172] R. N. Barua, R.P. Sharma, G. Thyagarajan, W. Herz, S. V. Govindan. New melampolides and darutigenol from *Sigesbeckia orientalis*, *Phytochemistry* 19 (1980) 323–325.
- [173] J. Xiong, Y. Ma, Y. Xu. Diterpenoids from *Sigesbeckia pubescens*, *Phytochemistry* 31 (1992) 917–921.
- [174] Y.-S. Kim, H. Kim, E. Jung, J.-H. Kim, W. Hwang, E.-J. Kang, S. Lee, B.-J. Ha, J. Lee, D. Park. A Novel Antibacterial Compound from *Sigesbeckia glabrescens*, *Molecules* 17 (2012) 12469–12477.
- [175] H.-J. Lim, H. Li, J.-Y. Kim, J.-H. Ryu. Quercetin Derivatives from *Sigesbeckia glabrescens* Inhibit the Expression of COX-2 Through the Suppression of NF-κB Activation in Microglia, *Biomol and Ther* 19 (2011) 27–32.
- [176] Illustration: *Sigesbeckia orientalis*,
http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=121100&flora_id=2, accessed 27 September 2013.
- [177] J.-E. Huh, Y.-H. Baek, J.-D. Lee, D.-Y. Choi, D.-S. Park. Therapeutic Effect of *Sigesbeckia pubescens* on Cartilage Protection in a Rabbit Collagenase-Induced Model of Osteoarthritis, *J Pharmacol Sci* 107 (2008) 317–328.
- [178] J.-P. Wang, Y.-M. Zhou, Y.-J. Ye, X.-M. Shang, Y.-L. Cai, C.-M. Xiong, Y.-X. Wu, H.-X. Xu. Topical anti-inflammatory and analgesic activity of kirenol isolated from *Sigesbeckia orientalis*, *J Ethnopharmacol* 137 (2011) 1089–1094.
- [179] Z.-M. Wang, S.-G. Zhu, Z.-W. Wu, Y. Lu, H.-Z. Fu, R.-Q. Qian. Kirenol upregulates nuclear Annexin-1 which interacts with NF-κB to attenuate synovial inflammation of collagen-induced arthritis in rats, *J Ethnopharmacol* 137 (2011) 774–782.
- [180] J.-p. Wang, J.-l. Ruan, Y.-l. Cai, Q. Luo, H.-x. Xu, Y.-X. Wu. In vitro and in vivo evaluation of the wound healing properties of *Sigesbeckia pubescens*, *J Ethnopharmacol* 134 (2011) 1033–1038.
- [181] S.-H. Sung, S.-H. Park, S.-Y. Song, S.-J. Lee, H.-W. Lee, S.-H. Kim, M. A Lee, I.-S. Yoon, D.-D. Kim, S. Kang, J.-H. Sung. Epidermal regeneration by ent-16α, 17-dihydroxy-kauran-19-oic acid isolated from *Sigesbeckia pubescens*, *Cell Proliferat* 44 (2011) 527–536.

- [182] H.-M. Kim, J.-H. Lee, J.-H. Won, E.-J. Park, H.-J. Chae, H.-R. Kim, C.-H. Kim, S.-H. Baek. Inhibitory effect on immunoglobulin E production in vivo and in vitro by *Siegesbeckia glabrescens*, *Phytother Res* 15 (2001) 572–576.
- [183] S. Kim, M. Na, H. Oh, J. Jang, C. B. Sohn, B. Y. Kim, W. K. Oh, J. S. Ahn. PTP1B inhibitory activity of kaurane diterpenes isolated from *Siegesbeckia glabrescens*, *J Enzym Inhib Med Chem* 21 (2006) 379–383.
- [184] G. Heinrich. Glandular Hairs of *Sigesbeckia jorullensis* KUNTH (Asteraceae): Morphology, Histochemistry and Composition of Essential Oil, *Ann Bot London* 89 (2002) 459–469.
- [185] Xi xian cao, in: Chinese herbal medicine: *Materia medica*, 3rd ed., Eastland Press, Seattle (2004) 357–359.
- [186] Z. Jiang, Q.-H. Yu, Y. Cheng, X.-J. Guo. Simultaneous quantification of eight major constituents in Herba Siegesbeckiae by liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight tandem mass spectrometry, *J Pharmaceut Biomed* 55 (2011) 452–457.
- [187] J.Y. Kim, H.J. Lim, J.-H. Ryu. In vitro anti-inflammatory activity of 3-O-methyl-flavones isolated from *Siegesbeckia glabrescens*, *Bioorg Med Chem Lett* 18 (2008) 1511–1514.
- [188] X.-L. Song, Q.-Y. Zhang, Z.-M. Wang, H.-Z. Fu, R.-Q. Qian. A rapid and simple RP-HPLC method for quantification of kiremol in rat plasma after oral administration and its application to pharmacokinetic study, *Biomed Chromatogr* 25 (2011) 542–546.
- [189] Herba Siegesbeckiae Xixiancao, in: H. Wagner, R. Bauer, D. Melchart, P.-G. Xiao, A. Staudinger (Eds.), *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines*, Springer Vienna, Vienna (2011) 893–902.
- [190] S. Li, H.-X. Kuang, Y. Okada, T. Okuyama. New flavanone and chalcone glucosides from *Bidens bipinnata* LINN, *J Asian Nat Prod Res* 7 (2005) 67–70.
- [191] Y.K. Rao, S.-H. Fang, S.-C. Hsieh, T.-H. Yeh, Y.-M. Tzeng. The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities, *J Ethnopharmacol* 121 (2009) 292–296.
- [192] I.L.-B. Amor, J. Boubaker, M.B. Sgaier, I. Skandrani, W. Bouri, A. Neffati, S. Kilani, I. Bouhlel, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira. Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species, *J Ethnopharmacol* 125 (2009) 183–202.
- [193] Siegesbeckiae herba, in: *Easily Confused Chinese Medicines in Hong Kong*, Chinese Medicine Merchants Association (2007), 168–169.
- [194] X. Pudan, Z. Zhaoxiang. Lingnan cai yao lu- Record of medicinal plants in Kwangtung and Kwangsi Provinces, Xian dai Zhong yi yao xue yuan, Xianggang, (1964)
- [195] K. Liu, E. Roder. Diterpenes from *Siegesbeckia glabrescens*, *Planta Med* 57 (1991) 395–396.
- [196] L. Huo, Z. Jiang, H. Li, M. Wang, X. Ye, B. Ji, X. Guo. Simultaneous determination of seven major diterpenoids in *Siegesbeckia pubescens* MAKINO by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection, *J Sep Sci* 35 (2012) 2585–2591.
- [197] L. Chen, J. Liu, Q. Wang, J. Chen. Fingerprint Comparison Between Gegen Qinlian Preparations of Three Different Pharmaceutical Forms Including Decoction, Dispensing Granule and Pill, *Chromatographia* 69 (2009) 123–127.
- [198] S.-L. Li, J.-Z. Song, C.-F. Qiao, Y. Zhou, H.-X. Xu. UPLC-PDA-TOFMS based chemical profiling approach to rapidly evaluate chemical consistency between traditional and dispensing granule decoctions of traditional medicine combinatorial formulae, *J Pharmaceut Biomed* 52 (2010) 468–478.

- [199] C.S. Young, J.W. Dolan. Success with evaporative light-scattering detection. Part 2. Tips and techniques, LC GC N Am 22 (2004) 244,246-250.
- [200] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 7 ed., Thieme, Stuttgart (2011)
- [201] R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel. Evaporative light scattering detection: trends in its analytical uses, Anal Bioanal Chem 388 (2007) 1663–1672.
- [202] C.J. Welch, T. Brkovic, W. Schafer, X. Gong. Performance to burn? Re-evaluating the choice of acetonitrile as the platform solvent for analytical HPLC, Green Chem 11 (2009) 1232–1238.
- [203] W.O. Aruda, S. Walfish, I.S. Krull. Review and optimization of linearity and precision in quantitative HPLC-ELSD with chemometrics, LC GC N Am 26 (2008) 1032-1042.
- [204] *Sigesbeckia*, in: W. Blaschek, H. Hager. Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, 6 ed., Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart (2007) 550–555.
- [205] P.M. Giang, P.T. Son, H. Otsuka. ent-Pimarane-Type Diterpenoids from *Siegesbeckia orientalis* L., Chem Pharm Bull 53 (2005) 232–234.
- [206] S. V. Alvarenga, M. J. P. Ferreira, G. V. Rodrigues, V. P. Emeranciano. A general survey and some taxonomic implications of diterpenes in the Asteraceae, Bot J Linn Soc 147 (2005) 291–308.
- [207] J. Wang, H. Xu, Y. Wu, Y. Ye, J. Ruan, C. Xiong, Y. Cai. Ent-16 β ,17-dihydroxy-kauran-19-oic acid, a kaurane diterpene acid from *Siegesbeckia pubescens*, presents antiplatelet and antithrombotic effects in rats, Phytomedicine 18 (2011) 873–878.
- [208] F. Wang, X.-L. Cheng, Y.-J. Li, S. Shi, J.-K. Liu. ent -Pimarane Diterpenoids from *Siegesbeckia orientalis* and Structure Revision of a Related Compound, J Nat Prod 72 (2009) 2005–2008.
- [209] T. Murakami, T. Isa, T. Satake. Eine Neuuntersuchung der Inhaltsstoffe von *Siegesbeckia pubescens* MAKINO, Tetrahedron Lett 14 (1973) 4491–4494.
- [210] X.-W. Yang, M.-Z. Huang, W.-Q. Zhao, Y.-S. Jin, H.-S. Chen. Studies on chemical constituents of *Bidens bipinnata*, Jiefangjun Yaoxue Xuebao 25 (2009) 283–286.
- [211] G.-H. Tian, C.-F. Liu. Study on chemical constituents of wild *Phlomis umbrosa* obtained from Qinba Mountain, Anhui Nongye Kexue 36 (2008) 5047–5049.
- [212] E. Shang, Z. Zhu, L. Liu, Y. Tang, J.-a. Duan. UPLC-QTOF-MS with chemical profiling approach for rapidly evaluating chemical consistency between traditional and dispensing granule decoctions of Tao-Hong-Si-Wu decoction, Chem Cent J 6 (2012) 143.
- [213a] V. Widmer, D. Handloser, E. Reich. Quantitative HPTLC Analysis of Artemisinin in Dried *Artemisia annua* L.: A Practical Approach, J Liq Chromatogr R T 30 (2007) 2209–2219.
- [214] T. Brem, Untersuchungen zur pharmazeutischen Qualität pflanzlicher Drogen aus der Traditionellen Chinesischen Medizin an den Beispielen von *Astragalus membranaceus*, *Coptis spec.*, *Forsythia suspensa* und *Leonurus japonicus* (2009)
- [215] S. Yang, C. Chen, Y. Zhao, W. Xi, X. Zhou, B. Chen, C. Fu. Association between Chemical and Genetic Variation of Wild and Cultivated Populations of *Scrophularia ningpoensis* HEMSL., Planta Med 77 (2011) 865–871