

Analytische, phytochemische und zellbiologische Untersuchungen
zu *Scrophulariae radix* (*Scrophularia ningpoensis* HEMSL.) und
Xanthii fructus (*Xanthium sibiricum* PATR.)



Dissertation

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

vorgelegt von

Katharina Schiller

aus Ingolstadt

2018

Für meine Eltern, meine Brüder und meinen Mann, Florian.

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von August 2014 bis September 2018 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann und Herrn Prof. Dr. em. Gerhard Franz am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 17.10.2018

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2018

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Stefan Dove	(Vorsitzender)
Prof. Dr. Jörg Heilmann	(Erstgutachter)
Prof. Dr. em. Gerhard Franz	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Joachim Wegener	(dritter Prüfer)

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Heilmann und Prof. Dr. em. Gerhard Franz bedanken für die Vergabe dieses interessanten Themas, die hilfreichen und konstruktiven Gespräche und vor allem das stets, auch für persönliche Gespräche, offene Ohr. Danke, für die schönen vier Jahre und das Vergnügen, von zwei herzlichen Doktorvätern betreut zu werden, die immer an mich und meine Arbeit glaubten.

Darüber hinaus geht mein Dank an das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, vor allem an PD Dr. Detlef Manns, für die Finanzierung und das Interesse am Fortschritt des Projektes.

Mein Dank geht weiterhin an PD Dr. Birgit Kraus, deren Zusammenarbeit während des Praktikums PB1 sehr intensiv und humorvoll war. Liebe Birgit, danke für deine Unterstützung in allen Belangen und deine herzliche Art.

Lieben Dank PD Dr. Guido Jürgenliemk für die Annahme als Wahlpflichtpraktikantin am Lehrstuhl und der immer netten und lustigen Zusammenarbeit. Lieber Guido, danke, dass du mir das Promovieren schmackhaft gemacht hast, mir jedes Praktikum gezeigt hast und mir stets mit hilfreichen Tipps zur Seite gestanden bist.

Mein Dank geht weiterhin an die massenspektroskopische Abteilung der Universität Regensburg, insbesondere an Josef Kiermeier für die Aufnahmen der MS-Spektren und an Herrn Kastner der NMR-spektroskopischen Abteilung. Zudem möchte ich mich bei Philipp Nitschke (Arbeitskreis Prof. Dr. Gschwind) für die Durchführung des selektiven NOESY-Experimentes danken.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Gabriele Brunner. Liebe Gabi, ohne dich wäre die Promotionszeit sicher ein gutes Stück länger geworden. Danke für deine Hilfsbereitschaft, deine äußerst strapazierfähige Geduld, die Einarbeitung in die Geheimnisse der Zellkultur und zu guter Letzt, meine „last-minute-Testungen“.

Bedanken möchte ich mich auch bei Anne Grashuber für die Unterstützung während des PB1-Praktikums, die unzähligen Leihgaben und die Bereitstellung diverser Chemikalien.

Frau Ohli und Frau Wolf, gilt ebenso ein herzlicher Dank für die stetige Hilfe bei allem was die Bürokratie und Verwaltung betraf.

Frau Dr. Heidi Heuberger von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung) möchte ich herzlich danken für die sehr hilfreichen und informativen Gespräche, die Möglichkeit Einblicke in den Pflanzenanbau und die Ernte zu erlangen und vor allem für die großzügige Bereitstellung der Pflanzenproben. Auch bei Herrn Kainz möchte ich mich für die *Xanthium* Pflanzenproben bedanken.

Dr. Eike Eich, Dr. Anita Ankli, Ilona Trettin und Débora Frommenwiler möchte ich für die Betreuung und fachlichen Diskussionen während des Aufenthaltes bei der Firma CAMAG in Muttenz (Schweiz) danken.

An die „alte Riege“ des Lehrstuhls, die mir im Wahlpflichtpraktikum und während des praktischen Jahres mit großer Hilfsbereitschaft zur Seite standen und mir auch die schönen Seiten des Promovierens gezeigt haben. Danke, Dr. Daniel „Muffelkopf“ Bücherl, Dr. Marcel „n=6, je mehr desto besser“ Flemming, Dr. Sebastian „Schnibböse“ Schmidt und Dr. Petr „Tom-Mandl-Fan“ Jirásek.

Dr. Beata Hobelsberger, Dr. Rosmarie Scherübl und Dr. Monika Schwindl für die Aufnahme, auch als unpromoviertes Huhn, in den elitären Kreis der Hühner-Pro-Pro-Bewegung. Danke für die unterhaltsamen Sitzungen und das stetige Mutzusprechen. Rosi, danke dir vor allem für die telephonische Seelsorge, das Korrekturlesen unzähliger Manuskripte und deinen Zuspruch. Moni, danke, dass du mich, nachdem ich mit freundlichen Grüßen verblieben bin, so nett im Wahlpflichtpraktikum betreut hast, mir die verantwortungsvolle Aufgabe der „Wolffi-Betreuung“ überlassen hast und vor allem für ein einfaches Post-it, das mich durch die ganze Promotion begleitet hat („Get robust“).

Und nun der Dank an „meine Riege“ der Promotionskollegen:

Liebe Eva Lotter, lieber Dr. Ilya Volkov, danke für das stets schwuffige Laborklima, die vielen Insider, das Lachen und dafür, dass ich jeden Tag gerne den Raum 13.1.39 aufgesperrt habe. Ilya, du warst mein bester Bayrisch-Sprachkurs-Schüler, danke für deine Hilfestellungen im wissenschaftlichen Alltag, deine Begleitung nach Budapest und schön, dass jemand Katzen genauso liebt wie ich. Liebe Eva, danke für deine Freundschaft, deinen unentwegten Willen mich lachend, glücklich und motiviert zu sehen, die mentale Unterstützung, gerade am Anfang und während der kleinen und großen Krisen zwischendurch und die regelmäßigen Sauna-/Kino- oder Dinnerbegleitungen.

Lieber Sebastian Schwindl, Mitstreiter im Kampf gegen die Missverständnisse was das Plattenkollenchym und die Plasmolyse betrifft. Danke für die lustige „Kellerzeit“, das ein oder andere Bier, den leckeren Omma-Kekschen und deinen Humor. Ich werde dich auch weiterhin beim Schuh-Shopping unterstützen.

Julianna „Julischka“ Ziegler, lieben Dank für die wunderschöne gemeinsame Zeit am Lehrstuhl, das ständige Mitfiebern in allen Lebens- und Laborlagen, die unzähligen außerberuflichen (niveaullollen und weniger niveaullollen) Events und dass du weitaus mehr als „nur“ eine Kollegin gewesen bist und das auch hoffentlich noch lange sein wirst.

Dir, lieber Christian Zeh, ein herzliches Dankeschön für die Lektion bayrische Gelassenheit und die netten Momente während unserer Fachapotheker-Ausbildung. Dir die Nägel zu lackieren war mir eine besondere Ehre.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Stefan Wiesneth, den Meister der Definitionen, für die vielen Hilfestellungen und die mehr oder weniger nervenaufreibenden Diskussionen.

Außerdem ein großes Dankeschön an meine derzeitigen und „frischen“ Kolleginnen und Kollegen Sina Malenke, Katrin Kuck, Dr. Filip Šibul, Bernhard Kram und Thomas Gruber für das nette, heitere und erfrischende Arbeitsklima.

Mirjam Abu Salah, Elisabeth Grünstein und Martina Tremmel, euch einen lieben Dank für die zahlreichen „außerlaborlichen“ Unternehmungen und die ein oder andere Lachfalte. Liebe Martina, dir zudem ein maunziges Merci für deine große Hilfsbereitschaft und die Testungen in der Zellkultur. Mit dir Worte zu verunstalten macht am meisten Spass, auch wenn es manchmal etwas overtrifft ist.

Dr. Steffen Pockes, danke für die Formatierungshilfe, dem ein oder anderen niveaувollen TV-Abend und zur Beihilfe zu meinem größten fußballerischen Erfolg.

Vielen Dank an meine Wahlpflichtpraktikanten, Ralf Meinl, Lena Bierwirth und Matthias Feldtenzer für die fleißige und interessierte Mitarbeit an meinem Projekt.

Meinen Freunden, „zu Hause“ in Ingolstadt, möchte ich auch Danke sagen. Ohne es wahrscheinlich zu bemerken, habt ihr mir mehr geholfen als gedacht und den Blick immer wieder aufs Wesentliche gelenkt.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinen Brüdern, für die unentwegt bedingungslose und vertrauensvolle Unterstützung, den ständigen Glauben an mich und die nötige Erdung.

Zu guter Letzt, möchte ich meinem Mann Florian danken, ohne dessen ständigen Zuspruch ich sicherlich nicht so weit gekommen wäre. Flo, danke für deine grenzenlose Geduld, deine Liebe, dein Verständnis für meine kleinen und großen Macken und danke, dass du immer an mich und das Gelingen der Promotion geglaubt hast. Dir, meinen Eltern und meinen Brüdern widme ich diese Arbeit.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikation

Schiller K, Heilmann J, Manns D, Franz G. Comparison of granules for prescription and classical decoctions by high-performance thin-layer chromatography analysis. *World J Tradit Chin Med* 2018; 4:1-7.

Konferenzbeiträge

Poster

63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). 2015, Budapest, Hungary

Schiller K, Reich E, Heilmann J, Manns D, Franz G. Development of an HPTLC-method for identification of *Scrophulariae radix* and quantification of the two main iridoids, harpagide and harpagoside

The 5th Annual Meeting of GP-TCM Research Association-cum-Summit on Compendium of Materia Medica and Innovative Drug Discovery in Chinese Medicine. 2016, Hongkong, China

Schiller K, Heilmann J, Manns D, Franz G. A new HPLC method for the quantitative analysis of harpagide and harpagoside in *Scrophulariae Radix*: Monograph proposal for the German Pharmacopoeia

→ *Ausgezeichnet mit einem Travel Award*

65rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). 2017, Basel, Switzerland.

Schiller K, Heilmann J, Manns D, Franz G. Isolation of atractyloside from *Xanthium sibiricum* PATR. and evaluation of its *in vitro* cytotoxicity with carboxyatractyloside and decoctions

66rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA)/11th Shanghai International Conference on Traditional Chinese Medicine and Natural Medicines (S-TCM) 2018, Shanghai, China.

Schiller K, Heilmann J, Manns D, Franz G. A new method for the quantification of two diterpenes, carboxyatractyloside and atractyloside, via HPLC-DAD in Xanthii fructus

Vortragsbeteiligung

The 5th Annual Meeting of GP-TCM Research Association-cum-Summit on Compendium of Materia Medica and Innovative Drug Discovery in Chinese Medicine. 2016, Hongkong, China

Franz G, Schiller K, Scherübl R. TCM Herbal Drugs – Decoction – Granules: is there a Phytoequivalence?

Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeine Einleitung	1
1.1	Traditionelle Chinesische Medizin (TCM)	1
1.1.1	Geschichte der TCM.....	1
1.1.2	TCM in Europa.....	2
1.1.3	Grundlagen und therapeutische Ansätze der TCM.....	3
1.2	Die Vorbehandlung (<i>pao zhi</i>) von TCM-Drogen.....	6
1.3	Darreichungsformen in der TCM	7
1.3.1	Darreichungsformen der TCM	8
1.3.2	Dekokte.....	8
1.3.3	Granulate	9
1.4	Arzneibuchmonographien für Drogen aus der TCM.....	10
2	Zielsetzung	17
3	Scrophulariae radix (<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.)	19
3.1	Einleitung	19
3.2	Material und Methoden.....	22
3.2.1	Prüfung auf Identität	27
3.2.1.1	Makroskopische Untersuchung	27
3.2.1.2	Mikroskopische Untersuchung	27
3.2.1.3	Dünnschichtchromatographische Untersuchung.....	28
3.2.1.3.1	Methodenevaluierung und Entwicklung.....	28
3.2.1.3.2	Methodenvalidierung zur Identitätsbestimmung.....	31
3.2.1.3.2.1	Methodenbeschreibung.....	31
3.2.1.3.2.2	Validierung.....	32
3.2.2	Prüfung auf Reinheit.....	35
3.2.2.1	Bestimmung des Trocknungsverlustes	35
3.2.2.2	Bestimmung der Asche	35
3.2.2.3	Bestimmung der salzsäureunlöslichen Asche	35
3.2.2.4	Bestimmung der wasserlöslichen extrahierbaren Substanzen	35
3.2.3	Gehaltsbestimmung.....	37
3.2.3.1	Gehaltsbestimmung mittels HPTLC	37

3.2.3.1.1	Methodenentwicklung.....	37
3.2.3.1.2	Methodenvergleich	38
3.2.3.2	Gehaltsbestimmung mittels HPLC.....	41
3.2.3.2.1	Methodenevaluierung und Entwicklung.....	41
3.2.3.2.2	Methodenvalidierung zur Gehaltsbestimmung.....	46
3.2.3.2.2.1	Methodenbeschreibung	46
3.2.3.2.2.2	Methodenvalidierung	47
3.3	Ergebnisse und Diskussion zu den analytischen Untersuchungen zu <i>Scrophulariae radix</i>	58
3.3.1	Makroskopische Untersuchung	58
3.3.2	Mikroskopische Untersuchung	59
3.3.3	Identifizierung durch Dünnschichtchromatographie	61
3.3.3.1	Methodenevaluierung und Entwicklung.....	61
3.3.3.2	Methodenvalidierung	65
3.3.4	Bestimmung des Trocknungsverlustes	74
3.3.5	Bestimmung der Asche	76
3.3.6	Bestimmung der salzsäureunlöslichen Asche.....	77
3.3.7	Bestimmung der wasserlöslichen extrahierbaren Substanzen	78
3.3.8	Gehaltsbestimmung mittels HPTLC	80
3.3.8.1	Methodenentwicklung.....	80
3.3.8.2	Methodenvergleich	85
3.3.9	Gehaltsbestimmung mittels HPLC.....	90
3.3.9.1	Methodenevaluierung und Entwicklung.....	90
3.3.9.2	Methodenvalidierung	95
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zu <i>Scrophulariae radix</i>	105
4	<i>Xanthii fructus (Xanthium sibiricum PATR.)</i>.....	109
4.1	Einleitung	109
4.2	Qualitative und quantitative Analytik.....	112
4.2.1	Material und Methoden	112
4.2.1.1	Mikroskopische Untersuchungen	115
4.2.1.2	Dünnschichtchromatographische Untersuchung.....	115

4.2.1.3	Methodenevaluierung und Entwicklung zur Quantifizierung der beiden Diterpene Carboxyatractylosid und Atractylosid	119
4.2.1.4	Methodenevaluierung und Entwicklung zur Quantifizierung von Chlorogensäure.....	124
4.2.2	Ergebnisse der Prüfung auf Identität.....	131
4.2.2.1	Makroskopische Untersuchung	131
4.2.2.2	Mikroskopische Untersuchung	132
4.2.2.3	Dünnschichtchromatographie.....	135
4.2.2.3.1	Methodenevaluierung und Entwicklung.....	135
4.2.2.3.2	Methodenvalidierung	140
4.2.3	Ergebnisse der Prüfung auf Reinheit	148
4.2.3.1	Bestimmung des Trocknungsverlustes	148
4.2.3.2	Bestimmung der Asche	149
4.2.3.3	Bestimmung des Gehaltes an Carboxyatractylosid und Atractylosid per HPLC	151
4.2.3.3.1	Methodenevaluierung und Entwicklung.....	151
4.2.3.3.2	Methodenvalidierung	156
4.2.4	Ergebnisse der Gehaltsbestimmung mittels HPLC	164
4.2.4.1	Methodenevaluierung und Entwicklung.....	164
4.2.4.2	Methodenvalidierung	169
4.2.5	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analytik zu Xanthii fructus	179
4.3	Isolierung von Atractylosid.....	183
4.3.1	Einleitung und Isolierungsstrategie.....	183
4.3.2	Material und Methoden	183
4.3.2.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und verwendetes Drogenmaterial	183
4.3.2.2	Extraktion.....	186
4.3.2.3	Dünnschichtchromatographie.....	186
4.3.2.4	Säulenchromatographie an Sephadex LH-20	187
4.3.2.5	Gegenstromverteilungschromatographie CPC.....	188
4.3.2.6	Semi-präparative HPLC.....	189
4.3.2.7	NMR-spektroskopische Verfahren.....	189
4.3.2.8	Massenspektrometrie	190
4.3.2.9	Polarimetrie.....	190

4.3.2.10	Reinheitsbestimmung	190
4.3.3	Ergebnisse und Diskussion	190
4.4	Zellbiologische <i>in-vitro</i> Testungen	205
4.4.1	Einleitung	205
4.4.2	Material und Methoden	206
4.4.2.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Kulturmedien und sonstige Lösungen	206
4.4.2.2	Zelllinien.....	208
4.4.2.3	Getestete Substanzen und Extrakte.....	209
4.4.2.4	Allgemeine Behandlung der Zellen.....	210
4.4.2.5	MTT-Assay	211
4.4.2.6	Statistik und Auswertung	213
4.4.3	Ergebnisse und Diskussion	214
5	Abschließende Zusammenfassung.....	219
6	Summary.....	221
7	Monographievorschläge für das Deutsche Arzneibuch (DAB)	223
7.1	Monographievorschlag zu <i>Scrophulariae radix</i>	223
7.2	Monographievorschlag zu <i>Xanthii fructus</i>	229
8	Abkürzungsverzeichnis	235
9	Literatur	239
10	Anhang.....	255
11	Erklärung zur Eigenständigkeit.....	263

1 Allgemeine Einleitung

1.1 Traditionelle Chinesische Medizin (TCM)

1.1.1 Geschichte der TCM

Die TCM ist eine Heilkunde deren Historie sich, basierend auf klinischen Untersuchungen und Beobachtungen, seit über 3000 Jahren bis heute entwickelt hat. Ein Beleg für die frühen Anfänge ist u.a. die Zusammenstellung „Rezepturen für 52 Krankheiten“ („*Wu Shi Er Bing Fang*“), die bei Ausgrabungen (aus den 1970er Jahren) aus dem Mawangdui-Grab (von 167 v. Chr.) in der Nähe der Stadt Changsha, Provinzhauptstadt von Hunan, (Unschuld, **2013**; Unschuld, **2003**) zum Vorschein trat. Grundlegende und bis heute relevante Theorien wie die der vier Temperaturverhalten („*Si Qi*“) wurden bereits im 3. Jahrhundert v. Chr. im Rahmen des Buches „Der gelbe Kaiser“ festgelegt und dokumentiert. Die Autoren dieses 18-bändigen Buches sind jedoch unbekannt. Im 2. Jahrhundert v. Chr. wurde die erste und vollständig erhaltene Dokumentation der TCM verfasst. In der „Materia Medica des göttlichen Landmannes“ oder „*Shen Nong Ben Cao Jing*“ finden 365 Arzneidrogen Erwähnung, inklusive deren thermischen und sensorischen Eigenschaften, Toxizität und Dosierungen. Mit dem Werk „Überarbeiteter Klassiker der Heilkräuter“ von Su Jing („*Xin Xiu Ben Cao*“, 659 n. Chr.), das auf Initiative des Arztes Sun Si Miao (652 n. Chr.) in Form der „Rezepturen, die tausend Goldstücke wert sind“ („*Qian Jin Yao Fang*“) entstand, ist in dieser ergänzten und überarbeiteten Form mit 844 Drogen die erste chinesische Pharmakopöe verfasst worden. Ein weiterer wichtiger Meilenstein in der Entwicklung der TCM ist die Niederschrift von Li Shi-Zhen in Form der „Klassifikation der Wurzeln und Kräuter“ bzw. „Die große Materia Medica“ („*Ben Cao Gang Mu*“) mit 1892 Einzelarzneien, pflanzlichen, tierischen oder mineralischen Ursprunges und 11000 Rezepturen. Dieses Werk wurde zudem im Jahre 2011 von der UNESCO in die Liste des Welterbes aufgenommen mit dem Ziel dokumentarisches Erbe zu bewahren, den freien Zugang zu ermöglichen und so das Bewusstsein und die Bedeutung der Existenz dieser Dokumente zu schärfen (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization; United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization). Aufzeichnungen mit dem Titel „Nachtrag zum Ben Cao Gang Mu“ („*Ben Cao Gang Mu Shi Yi*“) die von Zhao Xue Min im Jahre 1765 verfasst wurden, enthalten 920 Kräuter, von denen 716 ihre erste Erwähnung fanden. Die Zahl der dokumentierten Drogen war zu diesem Zeitpunkt auf 2608 gestiegen. (Chen and Chen, **2012**; Körfers and Sun, **2009**)

1.1.2 TCM in Europa

Mit den Jesuitenmissionen Ende des 16. Jahrhunderts begann u.a. der wissenschaftliche Kontakt zwischen China und Europa. Die Jesuiten lernten die chinesische Kultur in Form von Sprache, Bildung und Lebensweise kennen und brachten diese Informationen nach Europa. Nach einer 200-jährigen Phase des gegenseitigen Verständnisses und der Kommunikation, waren die folgenden 100 Jahre von einer Isolation Chinas geprägt. Das „Reich der Mitte“ sah die Notwendigkeit sich von europäischen Einflüssen abzugrenzen und nahm an gesellschaftlichen Entwicklungen wie u.a. der industriellen Revolution nur eingeschränkt teil. Durch die beiden Opiumkriege Mitte des 19. Jahrhunderts wurde die Isolation Chinas gewaltsam beendet und das Land verlor seine Eigenständigkeit gegenüber Europa und Japan. Erst im Jahre 1949 konnte das Land unter Führung der kommunistischen Partei von Mao Zedong zur Eigenständigkeit zurückfinden. Mit Öffnung der Volksrepublik Chinas zu Beginn der 70er Jahre war dem enormen Interesse des Auslandes an chinesischer Kultur und Heiltraditionen, wie TCM, kein Einhalt mehr geboten. (Schmincke, **2014**) Den wahrscheinlich größten Erfolg verzeichnete die TCM durch das sogenannte Projekt 523, politisch initiiert durch Mao Zedong (1976), und der damit verbundenen Entdeckung des Sesquiterpens Artemisinin und dem Nachweis seiner Wirksamkeit gegen Malaria (Cheung, **2011**; Tu, **2011**).

Weltweit nutzen Millionen an Patienten die TCM oder damit verbundene Heilverfahren. Neben den USA, dem größten Importeur an TCM-Produkten (2010: 7,6 Milliarden USD) nimmt Europa mit 2 Milliarden USD (2010) und einer prognostizierten steigenden Tendenz um 10% pro Jahr eine ebenso wichtige Marktstellung ein. (Cheung, **2011**) Deutschland kommt ein Marktanteil von 3,48% (2010) des Exportvolumens an traditionellen chinesischen Arzneien zu (China Chamber of Commerce for Import & Export of Medicines & Health Products, **2011**).

Im Jahre 2016 ging der Gesamtimport- und Exportwert an TCM-Produkten das erste Mal seit zehn Jahren zurück, wohingegen die Gesamtwerte (Import und Export) für pharmazeutische Erzeugnisse im Vergleich zu 2015 wuchsen. Betrachtet man die Zahlen genauer, fällt auf, dass die Gesamtsumme an Import- und Exportwerten an TCM 2016 4,6 Milliarden USD betrug, was einen Marktanteil von 4,45% am Gesamtanteil der chinesischen pharmazeutischen Produkte ausmachte. Während von 2015 bis 2016 der Exportwert an TCM-Produkten um 9,13% zurückging, stieg der Importwert jedoch um 14,50% von 1,025 Milliarden USD auf 1,174 Milliarden USD. Gründe für den möglichen Rückgang des Exportwertes könnten zum einen die erschwerten rechtlichen und monetären Bedingungen auf dem US-Markt (2016: 15,34% Exportwert China in die USA) und zum anderen die Verluste durch den Markt in Japan sein. Japan gehörte zu den größten Märkten, die chinesische medizinische Produkte importierten. Doch ab 1990 begann das Land sich durch die Initiation von Eigenanbau unabhängiger zu machen und somit den Import von Heilpflanzen aus China zu reduzieren. Mit

505 Millionen USD (2016) ist Japan, hinter den USA, der zweitgrößte Exportmarkt für TCM Produkte. (Lin et al., **2018**)

Die erste Klinik für chinesische Medizin in Europa eröffnete 1991 in Deutschland in Bad Kötzing und wurde 2010 zur Universitätsklinik der Universität von Beijing ernannt (Erste Deutsche Klinik für Traditionelle Chinesische Medizin GmbH; Scheid, **1999**). Durch die Initiation des Masterstudienganges TCM in München (Technische Universität München) wurde zudem eine Ausbildung in der fernöstlichen Medizin ermöglicht (Technische Universität München).

1.1.3 Grundlagen und therapeutische Ansätze der TCM

Grundlage der TCM ist das freie und ungehinderte Fließen der Lebensenergie Qi und somit ein Gleichgewicht der beiden Kräfte Yin und Yang (Abbildung 1), wobei Yin die passive und Yang die aktive Kraft darstellt. Sollte es innerhalb dieses Gleichgewichtes zu einer Disharmonie kommen, ist der menschliche Körper geschwächt und demnach für Krankheiten anfällig.



Abbildung 1 Yin und Yang Symbol (Deutsche Ärztesgesellschaft für Akupunktur e.V.)

Dieses Verständnis für Yin und Yang geht jedoch über den medizinischen bzw. pharmazeutischen Bereich hinaus und bezieht sich auf den kompletten Kosmos bzw. auf alles was sich innerhalb dessen befindet. Sei es der Übergang von Tag zu Nacht, Ebbe zu Flut oder Ein- zu Ausatmen. Nach den Ansichten der TCM befindet sich alles sowohl in der belebten Natur als auch innerhalb des menschlichen Körpers in einem ständigen Wandel. Diese Vorstellung wird anhand der fünf Wandlungsphasen mit den Symbolen Holz, Feuer, Erde, Metall und Wasser verdeutlicht. Jedem Symbol bzw. jeder Wandlungsphase sind zwei Organe zugeordnet. Meridiane, ausgehend von diesen Organen, gehen an die Körperoberfläche und wieder zurück. Die Wandlungsphasen werden stets kreisförmig in physiologischen und pathologischen Sequenzen angeordnet, wobei dabei beispielsweise das Erzeugen oder das Bezwingen bzw. Kontrollieren im Vordergrund steht. Anhand dieser Kreisläufe und der gegenseitigen Abhängigkeiten können in der TCM therapeutische Ansätze eruiert und angewendet werden. (Körfers and Sun, **2009**; Stöger, **2015**)

Als Ursache für Krankheiten werden drei wesentliche Faktoren, klimatische, emotionale und sonstige (bzw. falsche Lebensführung), in der TCM unterschieden. Als äußere oder klimatische Faktoren sind beispielsweise Wind, Sommerhitze und Feuer zu erwähnen. Innere oder emotionale Faktoren sind Wut und Zorn, Freude, Trauer oder Schreck. Falsche Ernährung, Schicksalsschläge oder Unfälle werden zu sonstigen Faktoren bzw. falscher Lebensführung gezählt. (Körfers and Sun, **2009**; Stöger, **2015**)

Die Diagnosestellung erfolgt in der TCM mit Hilfe von vier Begriffen:

- wàng: Diagnose durch Betrachten, hierbei wird der Habitus des Patienten mit Hautfarbe und Gestalt in den Fokus genommen, vor allem die Zungendiagnose nimmt hier einen zentralen Punkt ein.
- wén: Diagnose durch Hören und Beurteilung von Körpergeräuschen und Geruch.
- wèn: Diagnose durch eine intensive und weitreichende Befragung.
- qié: Diagnose durch Betasten, hierzu wird der menschliche Körper abgetastet. Die Pulsdiagnose spielt dabei eine wichtige Rolle. (Stöger, **2015**)

Mit Hilfe der Ergebnisse aus der Diagnosestellung, der Lokalisierung der Störung anhand der Funktionskreise und diagnostischen Leitkriterien kann im Anschluss der Befund oder die Diagnose therapeutisch umgesetzt werden. Je nach Befund wird eines oder mehrere therapeutische Verfahren, wie beispielsweise Erwärmen, Tonisieren oder Auswurf Förderung angewendet und die geeigneten TCM-Drogen für die Therapie ausgewählt. (Stöger, **2015**)

In der TCM werden die Arzneimittel bzw. Drogen aufgrund von fünf verschiedenen Eigenschaften unterteilt (Körfers and Sun, **2009**) und entsprechend eingesetzt:

- Temperaturverhalten
- Geschmacksrichtung
- Grad der Toxizität
- Wirkrichtung der Droge
- Meridian-/Leitbahnbezug

Im Folgenden sollen die einzelnen Eigenschaften genauer erläutert werden.

Temperaturverhalten der TCM-Drogen

Eine der fünf Eigenschaften, anhand derer die Drogen in der TCM eingeteilt bzw. charakterisiert werden ist das Temperaturverhalten. Dabei wird grob in die vier Merkmale kalt, heiß, warm und kühl unterschieden. Wird die Natur einer Arzneipflanze beispielsweise als heiß beschrieben, wie bei Gan Jiang (*Zingiberis rhizoma*), hat es die Funktion Kälte zu vertreiben

und die Yang-Leere zu supplementieren. Allgemein gesprochen wird es bei Krankheiten eingesetzt, deren Ursache die Kälte ist, wie Kälte und Schmerz im Abdomen und in kalten Extremitäten.

Um die Vielschichtigkeit zu verdeutlichen gibt es zudem die Unterteilung in die neun Abstufungen sehr kalt, kalt, leicht kalt, kühl, neutral, leicht warm, warm, heiß und sehr heiß. (Chen and Chen, **2012**; Kalg, **2009**; Körfers and Sun, **2009**)

Geschmacksrichtung der TCM-Drogen

Die Geschmackrichtung bzw. Geschmacksqualität einer Droge setzt sich einerseits aus dem durch die Einnahme wahrnehmbaren Geschmack, aber auch aus der Wirkung der Drogen zusammen. Auch hier wird grob in scharf, süß, sauer, bitter, salzig, neutral/fade und adstringierend unterschieden. Süße Drogen (z.B. Ginseng radix et rhizoma und Astragali radix) wirken harmonisierend, kräftigen bei Mangelzuständen und führen Energie zu. (Chen and Chen, **2012**; Kalg, **2009**; Stöger, **2015**)

Grad der Toxizität

Der Begriff Toxizität bedeutet in diesem Zusammenhang nicht zwingend das, was in der westlichen Medizin darunter verstanden wird, sondern sie ist gleichbedeutend mit der Wirkung bzw. Wirkstärke der Droge. Zudem muss man unterscheiden zwischen der Toxizität des Drogenmaterials, die per se vorhanden ist, wie beispielsweise bei Xanthii fructus und Genkwae flos oder einer Giftigkeit, die durch eine fehlerhafte Anwendung oder durch Qualitätsmängel der Drogen zustande kommt. (Chen and Chen, **2012**; Körfers and Sun, **2009**; Stöger, **2015**)

Wirkrichtung der Drogen

Steigen, Fallen, Schweben, Sinken und Umwandeln bezeichnen die Wirkrichtungen des Drogenmaterials in der TCM. Sinken beispielweise hat neben der nach unten gerichteten Wirkrichtung zusätzlich eine, die nach innen gerichtet ist. Unterschiedliche *pao zhi* Verfahren (Kapitel 1.2) haben zudem Einfluss auf die Wirkrichtung. Wird eine Droge mit Salzwasser verarbeitet kann dies die Wirkrichtung zu „fallend“ hin beeinflussen. (Körfers and Sun, **2009**)

Meridian-/Leitbahnbezug

Durch den Leitbahn- oder Meridianbezug wird ersichtlich, in welches Organ oder welchen Funktionskreis die Droge eintritt. Nach (Kalg, 2009) benötigt man um Lungen-Hitze zu klären eine Droge mit Lungenbezug wie beispielweise *Scutellariae radix*. (Chen and Chen, 2012; Kalg, 2009)

1.2 Die Vorbehandlung (*pao zhi*) von TCM-Drogen

Viele der Drogen aus der traditionellen chinesischen Medizin müssen vor Abgabe oder Einnahme vorbehandelt werden (*pao zhi* Verfahren). Die unterschiedlichen „processing“ Methoden (Tabelle 1) sind im ChP erklärt und werden je nach Droge in der entsprechenden Monographie gefordert. Das Processing beinhaltet ebenfalls das Reinigen und Schneiden der frischen Droge. Die Verwendung von Trinkwasser zur Verarbeitung der Drogen ist Voraussetzung.

Tabelle 1 Vorbehandlungsverfahren in der TCM inklusive derer Hilfsstoffe und Zusätze (Arzneibuch der Chinesischen Medizin, 2005, 2010 und 2015).

Methode		Hilfstoff/Zusatz
Chao-Verfahren Rösten	<i>Qingchao</i>	-
	<i>Fuchao</i>	Weizenkleie
Tang-Verfahren Rösten unter Zugabe fester Hilfsstoffe		Gereinigter Sand, Muschelkalk, Talk
Duan-Verfahren Brennverfahren	<i>Minguan</i>	-
	<i>Duancui</i>	Flüssige Hilfsstoffe
Zhitan-Verfahren Verkohlungsverfahren	<i>Chaotan</i>	Wasser
	<i>Duantan</i>	-
Zheng-Methode Verarbeitung (Dämpfen) mit Wasser		Wasser
Zhu-Methode Verarbeitung (Kochen) in Wasser oder sonstigen flüssigen Hilfsmitteln		Wasser oder flüssige Hilfsmittel
Dun-Methode Verarbeitung mit festgelegten Hilfsstoffen (Erhitzen in heißem Wasserdampf)		Festgelegte Hilfsstoffe
Chan-Methode Streuen der Droge in kochendes Wasser		Wasser
Jiuzhi-Methode Verfahren unter Verwendung von gelbem Wein	<i>Jiuzhi (Rösten)</i>	Reiswein
	<i>Jiudun (Kombi mit Chan-Methode)</i>	Reiswein
	<i>Jiuzheng (Kombi mit Zheng-Methode)</i>	Reiswein
Cuzhi-Verfahren	<i>Cuzhi (Rösten)</i>	Essig

Allgemeine Einleitung

Verfahren unter Verwendung von Essig	<i>Cuzhu</i> (Kombi mit Chan-Methode) <i>Cuzheng</i> (Kombi mit Zheng-Methode)	Essig Essig
Yanshuizhi-Verfahren	<i>Yanshuizhi</i> (Rösten)	Salzwasser
Verfahren unter Verwendung von Salzwasser	<i>Yanshuizheng</i> (Kombi mit Zheng-Methode)	Salzwasser
Jianzhizhi-Methode Verarbeitung mit Ingwerpresssaft		Ingwer
Mizhi-Methode Verarbeitung mit Honig		Honig
Zhishuang-Methode Entölen und zermahlen		Wasser

Die verschiedenen Vorbehandlungsverfahren verfolgen unterschiedliche Motive und reichen von der Reduzierung der Toxizität, der Wirkverstärkung, Wirkveränderung bis hin zur Veränderung von Geruch, Geschmack oder Verlängerung der Haltbarkeit. Die Anwendung unterschiedlicher *pao zhi* Verfahren kann bei ein und demselben Drogenmaterial zu unterschiedlichen Resultaten und Indikationen führen. Beispielsweise *Rhei radix et rhizoma* hat in getrockneter Form eine laxierende Wirkung, mit Reiswein versetzt und kurz geröstet kann die Droge bei Zahnfleischentzündungen und -blutungen eingesetzt werden. Wird sie im Wok geröstet oder über einem Wasserbad gedünstet, kann sie blutstillende Eigenschaften entwickeln. Viele der chemischen und damit einhergehenden pharmakologischen Veränderungen während des „processings“ sind noch nicht geklärt und bedürfen zudem einer Methodenstandardisierung, um eine gleichbleibende Qualität der TCM-Zubereitungen zu gewährleisten. (Körfers and Sun, **2009**; Wu et al., **2018**; Arzneibuch der Chinesischen Medizin, **2005, 2010 und 2015**)

1.3 Darreichungsformen in der TCM

Als Ausgangsmaterial für Zubereitungen wird in der TCM die sogenannte *daodi*-Droge verwendet. Darunter versteht man das Drogenmaterial aus bestimmten Regionen, das unter erfahrungsgemäß optimalen Bedingungen, wie ökologische Einflüsse, Anbau, Ernte und Verarbeitung, gewonnen wird und daher das Drogenmaterial aus anderen Regionen in Qualität und klinischer Wirksamkeit übertrifft. (Stöger, **2015**; Zhao et al., **2012**)

Aufgrund von beunruhigenden Meldungen, gefährliche Verfälschungen oder Verunreinigungen des Drogenmaterials betreffend (Ihrig et al., **2004**; Das ZL informiert: Aristolochiasäure in TCM nachgewiesen, **2003**; Lord et al., **1999**; Nortier and Vanherweghem, **2002**; Schmoltzi and Scherges, **2000**), wurde 1999 von der Bayerischen Landesanstalt für

Landwirtschaft (LfL) ein Projekt entwickelt, das sich mit der Entwicklung von optimalen Anbaubedingungen, Züchtung und Verarbeitung von TCM Drogen in Deutschland beschäftigt, um Qualitäts- und Beschaffungsprobleme zu umgehen und damit einhergehend eine gleichbleibend qualitativ hohe Versorgung der Patienten mit TCM-Drogenmaterial sicherzustellen (Heuberger et al., 2010; Holzapfel et al., 2016).

Neben der gewöhnlichen Rohdroge, bzw. des verarbeiteten Drogenmaterials existieren eine Vielzahl an Darreichungsformen.

1.3.1 Darreichungsformen der TCM

Anhand der in Tabelle 2 aufgeführten Arzneizubereitungen soll verdeutlicht werden, wie vielseitig das galenische Angebot in der TCM ist.

Tabelle 2 Arzneiformen, die in der TCM Anwendung finden mit Bezeichnung und Bedeutung (Körfers and Sun, 2009).

Bezeichnung	Bedeutung
<i>Tang</i>	Dekokt
<i>San</i>	Drogen-Pulver
<i>Mi Wan</i>	Pille aus pulverisierten Kräutern mit Honig als Bindemittel
<i>Wie Ji</i>	Rohes Eisenpulver mit Essig oder Wasser, setzt bei Oxidation Wärme frei
<i>Jiao Nang</i>	Kapsel
<i>Pian</i>	Tablette
<i>Chon Ji (Ke Li Ji)</i>	Granulat
<i>Qi Wu Ji</i>	Aerosol

Auch wenn die TCM eine Vielzahl an Darreichungsmöglichkeiten bietet, sollen im Folgenden lediglich die beiden Zubereitungsmöglichkeiten Dekokt und Granulat erläutert werden.

1.3.2 Dekokte

Dekokte gehören zu den wichtigsten, populärsten und den am häufigsten verwendeten Zubereitungsarten in der Praxis der TCM (Chen and Chen, 2012; Körfers and Sun, 2009; Stöger, 2015). Nach westlichem galenischem Verständnis sind Dekokte oder Abkochungen, Zubereitungen, bei denen das Drogenmaterial bzw. die Teemischung mit kaltem Wasser angesetzt wird und nach fünf bis zehn minütigem Kochen abgeseiht werden kann (Sticher et al., 2015). In der TCM hingegen versteht sich der Dekokt als eine etwas aufwendigere und konzentriertere Zubereitungsform. Die Herstellung kann dabei, je nach Bestandteilen variieren. Eine Rezeptur könnte beispielsweise wie folgt gestaltet sein (Körfers and Sun, 2009):

- Die Arzneidrogen werden für eine bestimmte Zeit in kaltes Wasser eingelegt und bei Raumtemperatur mazeriert (Gefäße aus Ton, Emaille oder Edelstahl sollten verwendet werden, nicht Eisen, Kupfer oder Aluminium).
- Die Mischung wird zum Kochen erhitzt und während eines definierten Zeitintervalles unter schwacher Hitze am Sieden gehalten.
- Der erste Dekokt wird abgeseiht.
- Die Drogen werden ein zweites Mal mit frischem Extraktionsmittel extrahiert.
- Die beiden Dekokte werden vereinigt.

Die Einnahme der Abkochung gestaltet sich ebenfalls individuell je nach Eigenschaften der Bestandteile der Dekokte und Erkrankung. Meistens werden zwei bis drei Einnahmen pro Tag 30 bis 60 min nach den Mahlzeiten empfohlen. Tonisierende Drogen werden beispielsweise lauwarm eingenommen, abführende Drogen vor dem Essen und beruhigende vor dem Zubettgehen. Bei akuten Erkrankungen ist eine häufigere Einnahme, alle zwei bis vier Stunden möglich. (Körfers and Sun, **2009**)

1.3.3 Granulate

Auch wenn durch die Zubereitung von Dekokten eine sehr individuelle Therapie möglich ist, gilt die Herstellung oftmals als aufwendig und zeitintensiv. Die begrenzte Haltbarkeit, der unhandliche Transport, die Lagerung und die erschwerte Qualitätskontrolle sind zudem von Nachteil. Durch die Anwendung von alternativen Zubereitungen wie Tabletten, Pulver, Salben und Granulaten sollen die genannten Nachteile umgangen und so die Einnahmetreue der Patienten verbessert werden. (Luo et al., **2012**)

Die sogenannten „granules for prescription“ oder Granulate wurden ab den 1970er Jahren in Taiwan, Japan und Südkorea entwickelt und fanden schnell Zuspruch (Li et al., **2018**). Auch in Deutschland werden diese Granulate verwendet und sollen so zu einer vereinfachten Handhabung beitragen. Die genauen Herstellungsvorschriften sowie das Extraktionsmittel oder das Droge-Extrakt-Verhältnis sind in der Regel Firmengeheimnisse und nicht auf der Verpackung angegeben. Zur Herstellung eines Granulates wird ein Primärextrakt angefertigt und dieser zusammen mit Dextran oder verschiedenen Stärken (Mais- oder *Dioscorea*-Stärke) sprühgetrocknet. (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, **2016**; Stöger, **2015**) Unterschieden werden sogenannte Monoextrakt-Granulate, die im Anschluss nach ärztlicher Anordnung vermischt werden oder komplexe Rezepturen, die bereits als Fertigarzneimittel appliziert werden können (Stöger, **2015**). Ausgehend von einer Stellungnahme des LGL zum Einsatz von Rezepturgranulaten in der Apotheke kann die Identität und damit einhergehend auch die Qualität der Ausgangsstoffe nicht mit

apothekenüblichen Möglichkeiten eindeutig überprüft werden. Der Apotheker/die Apothekerin kann weder nach §11 ApBetrO die ordnungsgemäße Qualität noch, bei Vorhandensein eines Prüfzertifikates (§6 Abs. 3 ApBetrO), die Identität der Granulate zweifelsfrei nachweisen. Zudem besitzen Prüfzertifikate, die in Drittländern (z.B. China) ausgestellt wurden, hier in Deutschland keine Gültigkeit. Daher äusserte das LGL zu diesem Zeitpunkt (10/2016), dass eine „Verwendung von Rezepturgranulaten der Traditionellen Chinesischen Medizin in der Apotheke [...] in Deutschland rechtskonform derzeit nicht möglich“ sei. (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, **2016**; Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, **1987**) Neben diesen analytischen bzw. rechtlichen Problemen in der Handhabung der Granulate ergibt sich die Fragestellung, ob Granulate tatsächlich als gleichwertiger Ersatz für Dekokte eingesetzt werden können. Literaturdaten haben gezeigt, dass verschiedene Darreichungsformen einer pflanzlichen Zubereitung wie Dekokte, Tabletten und Granulate eine unterschiedliche qualitative und/oder quantitative Zusammensetzung haben können (Chen et al., **2009**; Chen et al., **2006**; Schiller et al., **2018**; Zhou et al., **2015**). In diesem Zusammenhang ist der Begriff „Phytoäquivalenz“ Gegenstand von Diskussionen, der analog eines Bioäquivalenz-Prinzips auf pflanzliche Zubereitungen angewandt werden sollte (Uehleke et al., **1994**). Nach (Tyler, **1999**; Uehleke et al., **1994**), die den Begriff „Phytoäquivalenz“ eingeführt hatten, lautet die Definition „eine Zubereitung ist mit einem klinisch geprüften Phytopharmakon dann phytoäquivalent, wenn die einzelnen wirksamkeitsbestimmenden Stoffe innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite etwa in gleicher Menge enthalten sind und solche Begleitstoffe, welche eventuell einen Einfluss auf das Resorptionsverhalten ausüben können, in vergleichbarer Menge enthalten sind.“ Auf diesem Wege sollen aufwendige klinische Studien zum Nachweis von Wirksamkeit und Unbedenklichkeit bei verschiedenen Zubereitungen umgangen werden. Ist bei verschiedenen Darreichungsformen eine gewisse Phytoäquivalenz demnach nicht nachweisbar, ist es fraglich ob diese, ohne Veränderung der klinischen Wirksamkeit, gegeneinander ausgetauscht werden können.

1.4 Arzneibuchmonographien für Drogen aus der TCM

Drogen aus der TCM (unbehandelt, grob vorbehandelt), die zu Heilzwecken verwendet werden, gelten beim Import nach Deutschland zunächst nicht als Arzneimittel (§2 AMG) und unterliegen daher auch nicht dem AMG. Sobald sie jedoch in der Apotheke zur Herstellung bzw. Belieferung einer Rezeptur oder Verordnung vermischt oder zusammengestellt werden, gelten die Vorschriften des AMG. (Hempfen and Huber, **2014**; Oberverwaltungsgericht Niedersachsen, **2002**) Infolgedessen liegt die Verantwortung für die Qualität der Ausgangsstoffe und der Zubereitung nach §4 Abs. 14 und 17 AMG und §§7, 8 ApBetrO beim

Apotheker (Bundesministerium der Justiz für Verbraucherschutz, **1976**; Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, **1987**; Hempen and Huber, **2014**). Sofern ein Prüfprotokoll des Händlers für das jeweilige pflanzliche Material mitgeliefert wurde, ist lediglich die Überprüfung der Identität nach ApBetrO (§6 Abs. 3 ApBetrO) durch den Apotheker, die Apothekerin, durchzuführen. (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, **1987**) Für die entsprechenden Untersuchungen werden die Vorschriften aus dem DAB oder Ph.Eur. herangezogen. Sollte dies, aufgrund mangelnder Ausstattung oder bei nicht Vorhandensein von Vorschriften aus den vorgegebenen Arzneibüchern, nicht möglich sein, so müssen ersatzweise andere geeignete Vorschriften zur Prüfung verwendet werden:

- Arzneibücher der EU-Mitgliedsstaaten
- Anerkannte Monographie-Sammlungen (wie DAC, NRF, Arzneibücher von Drittländern wie USP, JP, Ph.Helv.)
- Ältere Arznei- und Ergänzungsbücher (z.B. DAB 10, EB6, AB-DDR)
- Prüfvorschriften des Händlers
- alternative Prüfmethode (nur unter bestimmten Voraussetzungen). (Bundesapothekerkammer, **2016**)

Nach §55 AMG ist das Arzneibuch „eine vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut und dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit bekannt gemachte Sammlung anerkannter pharmazeutischer Regeln über die Qualität, Prüfung, Lagerung, Abgabe und Bezeichnung von Arzneimitteln und den bei ihrer Herstellung verwendeten Stoffen“, die Reglementierungen werden dabei von der Deutschen Arzneibuch-Kommission (nach §55 Abs. 4 AMG vom BfArM in Bonn gebildet) oder der Europäischen Arzneibuch-Kommission beschlossen. (Bundesministerium der Justiz für Verbraucherschutz, **1976**)

Um einen sicheren Umgang mit TCM Drogen zu gewährleisten, kam es 2005, sowohl im Rahmen der Deutschen, als auch der Europäischen Arzneibuch Kommission zu dem Beschluss, dass Arzneibuchmonographien für pflanzliches Drogenmaterial aus der TCM, gemäß bestehender Standards des Ph.Eur. bzw. des EDQM entwickelt werden sollen (Auszug des Protokolls der DAB-Kommission 2005, **2005**; European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, **2007**; Wang and Franz, **2015**). Die Expertengruppen 13A und 13B (Phytochemie) des europäischen Arzneibuches erhielten daraufhin die Anweisung TCM-Drogen, die auch im ChP gelistet sind, in ihr Arbeitsprogramm aufzunehmen. Häufigkeit der Anwendung, dokumentierte Probleme die Qualität oder Toxizität betreffend und die mögliche Gefahr von Verwechslungen waren Kriterien, die bei der Auswahl oder Priorisierung der zu bearbeitenden Drogen herangezogen wurden. Ausgehend von ursprünglich mehr als 100 TCM-Drogen wurden 83 Kandidaten in das erste Arbeitsprogramm übernommen. Aufgrund

des hohen Arbeitsaufkommens wurde die Expertengruppe 13A und 13B 2008, initiiert durch die Europäische Arzneibuch Kommission beim EDQM durch eine spezielle Arbeitsgruppe TCM (TCM working party), die sich ausschließlich mit der Erarbeitung von TCM Arzneibuchmonographien beschäftigt, entlastet. Experten aller EU Mitgliedsstaaten wurden einer speziellen Expertise folgend ausgewählt und von der Europäischen Arzneibuch Kommission ernannt (18 Mitglieder und 1 Vorsitzender). (Bauer and Franz, **2010**; Wang and Franz, **2015**) Im Juni 2011 kam es zudem zu einem Abkommen zwischen der SATCM der Republik China und dem europäischen Rat, repräsentiert durch das EDQM, um die gegenseitige Zusammenarbeit zu fördern (EDQM Council of Europe, **2018a**; Wang and Franz, **2015**). Sowohl die Entstehung von Arzneibuchmonographien, als auch der Aufbau einer Monographie sind im Vergleich ChP *versus* Ph.Eur. bzw. DAB grundlegend unterschiedlich. Beginnend mit dem Ablauf einer Monographieentstehung im Ph.Eur., wird zunächst nach dem Beschluss der Europäischen Arzneibuch Kommission durch die Arbeitsgruppe TCM ein Berichterstatter ernannt, der für die Erstellung der Monographie verantwortlich ist. Der erste Entwurf wird in Pharmeuropa, einer offiziellen Zeitschrift des Ph.Eur., veröffentlicht und kann von nationalen Behörden kommentiert werden. Nach einer Revision von Seiten der Arbeitsgruppe können, gemäß der Anmerkungen, Änderungen vorgenommen werden und der Entwurf zur Verabschiedung an die Europäische Arzneibuchkommission weitergereicht werden. Sofern diese einverstanden ist, wird der Entwurf zu einer offiziellen Arzneibuchmonographie des Ph.Eur.. Der gesamte Ablauf einer Monographie-Erstellung nimmt in etwa zwei Jahre in Anspruch. Im Gegensatz dazu ist der Arbeitsablauf einer Monographieerarbeitung im ChP analog dem Schema Abbildung 2, wesentlich komplizierter und zeitaufwendiger. (Wang and Franz, **2015**)

Allgemeine Einleitung

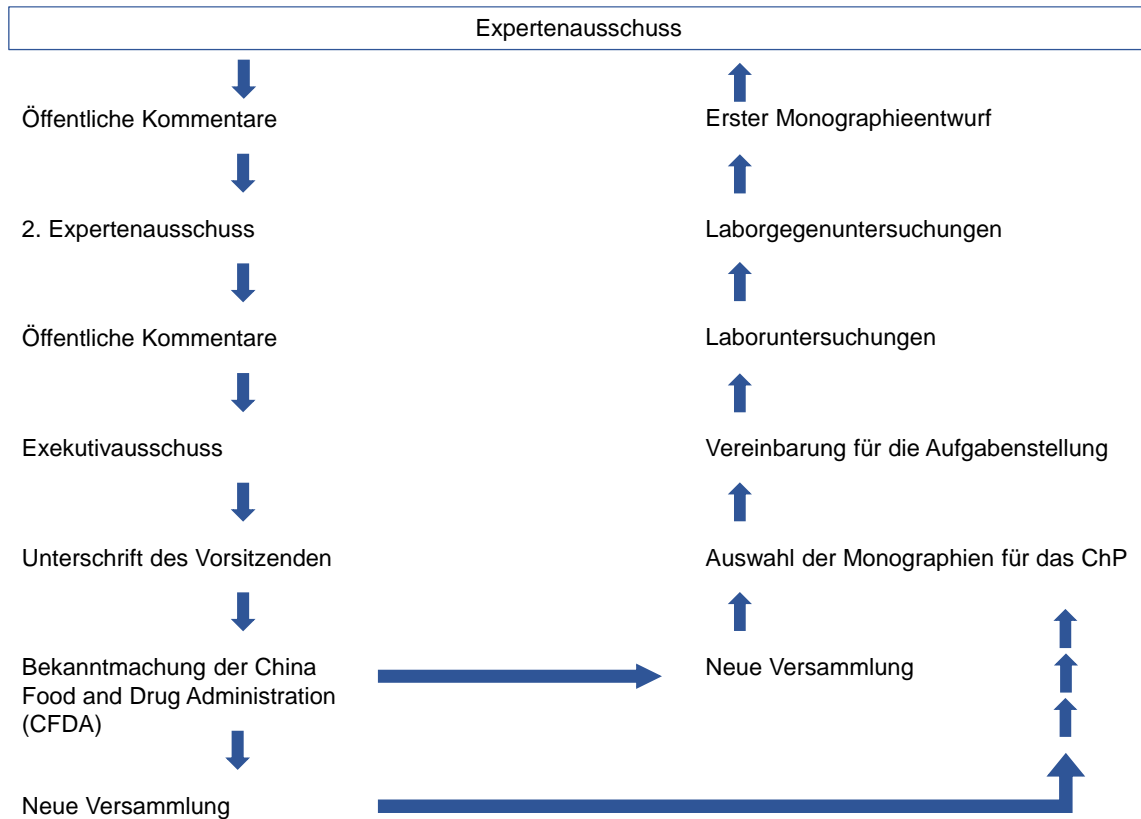


Abbildung 2 Ablauf der Monographieentstehung für das ChP (Wang and Franz, 2015).

Wie bereits erwähnt ist auch der Aufbau einer Monographie in Vergleich Ph.Eur./DAB vs. ChP unterschiedlich (Abbildungen 3 und 4). Die größte Diskrepanz besteht bei den Parametern „processing“ bzw. „prepared slices“, die der Aufarbeitung des Drogenmaterials (*pao zhi*, Kapitel 1.2) entsprechen. Angaben zu Eigenschaften und Geschmack, Meridianbeeinflussung, Wirkung/Indikation und Anwendung mit Dosierung werden im Ph.Eur. bzw. DAB nicht gemacht, da ausschließlich qualitative, bzw. analytische Parameter und Fragestellungen behandelt werden sollen. Um Verwechslungen zu vermeiden, wird neben dem lateinischen Namen auch die *pinyin*-Bezeichnung im DAB angegeben. (Wang and Franz, 2015)

Im Ph.Eur. existiert mittlerweile ein Verzeichnis, in dem die TCM Drogen bzw. der deutschsprachige Monographietitel zusammen mit dem lateinischen Monographietitel, dem *pinyin*-Namen und dem Sinogramm angegeben sind (5.22 Bezeichnungen von in der Traditionellen Chinesischen Medizin verwendeten pflanzlichen Drogen, 2018). Im Rahmen der Identitätsuntersuchungen greifen beide Arzneibücher zu kombinierten mikroskopischen, makroskopischen und dünnschicht-chromatographischen (DC/HPTLC) Methoden. Sowohl im DAB als auch Ph.Eur. wird zur Auswertung eine tabellarische Beschreibung angegeben, die die Referenzlösung der Untersuchungslösung gegenüberstellt. Im DAB gibt es zusätzlich ein abgebildetes Chromatogramm im Appendix. Das Ph.Eur. führt Zeichnungen der charakteristischen Pulverbestandteile (Identität B) auf, um die Auswertung zu

erleichtern. Reinheitsbestimmungen wie Asche oder Trocknungsverlust sind in den Arzneibüchern weitestgehend ähnlich. Die Gehaltsbestimmung gibt eine Methode zur Quantifizierung des unter Definition angegebenen aktiven oder analytischen Markers an. Sowohl im ChP als auch im DAB wird häufig die Quantifizierung per HPLC/DAD vorgenommen. (Bauer and Franz, **2010**; Wang and Franz, **2015**) Das Ph.Eur. bietet zudem die Möglichkeit über die sogenannte „Knowledge Database“ online Auskünfte über beispielweise erhaltene Chromatogramme, Referenzstandards oder Handelsnamen der verwendeten Säulen einzuholen (EDQM Council of Europe, **2018b**).

Um jedoch eine Qualitätsmonographie implementieren zu können, muss der jeweilige analytische Marker (*CRS*, *HRS*) etabliert und auch verfügbar sein (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, **2007**).

Monographie-Aufbau nach ChP (englische Übersetzung)
<p>Titel der Monographie (Lateinischer Name, Sinogramm, <i>pinyin</i>-Name und Englischer Name)</p> <p>Herkunft (Drogengewinnung mit Beschreibung des verwendeten Pflanzenteils, Erntezeitpunkt, Stammpflanze, Familie, Trocknung)</p> <p>Beschreibung (Makroskopische Beschreibung)</p> <p>Identifizierung (1) Mikroskopische Beschreibung (2) Dünnschichtchromatographie (3) Nasschemische Verfahren</p> <p>Trocknungsverlust</p> <p>Asche/ Salzsäureunlösliche Asche</p> <p>Extrahierbare Stoffe</p> <p>Gehaltsbestimmung/ Assay</p> <p>Prepared slices (mit Beschreibung des Processings, Identifizierung, Wassergehalt, Asche, salzsäureunlöslicher Asche, Extrahierbaren Substanzen und Assay)</p> <p>Eigenschaften und Geschmack</p> <p>Meridianbeeinflussung</p> <p>Wirkung</p> <p>Indikation</p> <p>Anwendung und Dosierung</p> <p>Lagerung</p>

Abbildung 3 Prinzipieller Aufbau einer Monographie aus dem ChP (englische Übersetzung).

Monographie-Aufbau nach DAB
<p>Titel der Monographie (Deutscher und lateinischer Name, bei TCM-Drogen <i>pinyin</i>-Name)</p> <p>Definition (Stammpflanze, Droge mit Pflanzenteil und Erntezeitpunkt, Minimalgehalt der Markersubstanz)</p> <p>Identität A. Makroskopische Beschreibung B. Mikroskopische Beschreibung C. Dünnschichtchromatographie</p> <p>Prüfung auf Reinheit (Fremde Bestandteile, Asche/ salzsäureunlösliche Asche/ Sulfatasche, Trocknungsverlust)</p> <p>Gehaltsbestimmung</p> <p>Lagerung</p>

Abbildung 4 Aufbau einer Monographie im DAB.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden vier TCM-Arzneibuchmonographien (Tabelle 3) in das DAB 2017 und 52 (Tabelle 4) in das Ph.Eur. 2017 implementiert.

Tabelle 3 TCM-Drogenmonographien aus dem DAB 2017 (Deutsches Arzneibuch, 2017).

Deutsche Drogenbezeichnung	Lateinische Drogenbezeichnung
Beifußkraut, Haariges	Artemisiae scopariae herba
Chinesisches Mutterkraut	Leonuri herba
Forsythiafrüchte	Forsythiae fructus
Goldfadenwurzelsstock	Coptidis rhizoma

Tabelle 4 TCM-Drogenbezeichnung aus dem Ph.Eur. (Europäisches Arzneibuch, 2017).

Deutsche Drogenbezeichnung	Lateinische Drogenbezeichnung
Akebiaspross	Akebiae caulis
<i>Amomum</i> -Früchte	Amomi fructus
<i>Anemarrhena-asphodeloides</i> -Wurzelsstock	Anemarrhenae-asphodeloides rhizoma
<i>Angelica-dahurica</i> -Wurzel	Angelicae dahuricae radix
<i>Angelica-pubescens</i> -Wurzel	Angelicae pubescentis radix
<i>Angelica-sinensis</i> -Wurzel	Angelicae sinensis radix
<i>Atractylodes-lancea</i> -Wurzelsstock	Atractylodis lanceae rhizoma
<i>Atractylodes-macrocephala</i> -Wurzelsstock	Atractylodis macrocephalae rhizoma
Baikal-Helmkraut-Wurzel	Scutellaria baicalensis radix
Bocksdornfrüchte	Lycii fructus
Braunellenähren	Prunellae spica
Buschknöterichwurzelsstock mit Wurzel	Polygoni cuspidati rhizoma et radix
Chinesische-Esche-Rinde	Fraxini rhynchophyllae cortex
Chinesische-Tragant-Wurzel	Astragali mongholici radix

Kapitel 1

<i>Clematis-armandii</i> -Spross	Clematidis armandii caulis
<i>Drynaria</i> -Wurzelstock	Drynariae rhizoma
Ecliptakraut	Ecliptae herba
Ephedrakraut	Ephedrae herba
Eucommiarinde	Eucommiae cortex
Färberdistelblüten	Carthami flos
Färberwaidwurzel	Isatidis radix
Gardenienfrüchte	Gardeniae fructus
Glockenwindenwurzel	Codonopsis radix
Großer-Wiesenknopf-Wurzel	Sanguisorbae radix
Himalayaschartenwurzel	Aucklandiae radix
Hiobstränensamen	Coicis semen
Japanische-Padogenbaum-Blütenknospen	Sophorae japonicae flos immaturus
Japanische-Pagodenbaum-Blüten	Sophorae japonicae flos
Kopoubohnenwurzel	Puerariae lobotae radix
Langer Pfeffer	Piperis longi fructus
Leopardenblumenwurzelstock	Belamcandae chinensis rhizoma
<i>Magnolia-officinalis</i> -Blüten	Magnoliae-officinalis flos
Magnolienrinde	Magnoliae officinalis cortex
Mandarinenschale	Citri reticulatae epicarpium et mesocarpium
Mehlige Kopoubohnenwurzel	Puerariae thomsonii radix
Notoginsengwurzel	Notoginseng radix
Orientalischer-Knöterich-Früchte	Polygoni orientalis fructus
Pfeffer	Piperis fructus
<i>Poria-cocos</i> -Fruchtkörper	Poria
Rote Pfingstrosenwurzel	Paeoniae radix rubra
Rotwurzsalbei-Wurzelstock mit Wurzel	Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma
Runde <i>Amomum</i> -Früchte	Amomi fructus rotundus
Schisandrafrüchte	Schisandrae chinensis fructus
Schlangenwiesenknöterichwurzelstock	Bistortae rhizoma
<i>Sinomenium-acutum</i> -Spross	Sinomenii caulis
Stachelpanaxwurzelrinde	Acanthopanax gracilistylis cortex
<i>Stephania-tetrandra</i> -Wurzel	Stephaniae tetrandrae radix
Uncariazweige mit Dornen	Uncariae rhynchophyllae ramulus cum uncis
Vielblütiger-Knöterich-Wurzel	Polygoni multiflori radix
Weißer Pfingstrosenwurzel	Paeoniae radix alba
Yamswurzelknollen	Dioscoreae oppositifoliae rhizoma
<i>Zanthoxylum-bungeanum</i> -Schale	Zanthoxyli bungeani pericarpium

2 Zielsetzung

Dem Beschluss, sowohl der DAB Kommission als auch der Europäischen Arzneibuch Kommission von 2005, folgend, sollten zur Qualitätssicherung Arzneibuchmonographien für pflanzliches TCM-Drogenmaterial erarbeitet und zur Implementierung, zunächst in Deutschland in das DAB, vorgeschlagen werden (DAB-Kommission: Monographien für TCM-Drogen, **2005**; Auszug des Protokolls der DAB-Kommission 2005, **2005**; Wang and Franz, **2015**). Gegenstand der vorliegenden Arbeit war demnach eine qualitative und quantitative Charakterisierung des im Handel befindlichen Drogenmaterials der beiden Arzneipflanzen, *Scrophularia ningpoensis* HEMSL. und *Xanthium sibiricum* PATR. aus der TCM. Im Falle von *Scrophularia ningpoensis* HEMSL. wurde die Wurzeldroge, *Scrophulariae radix* oder Braunwurz Wurzel untersucht, wohingegen bei *Xanthium sibiricum* PATR. die Fruchtdroge, *Xanthii fructus* auch Sibirische Spitzklettenfrucht genannt, im Fokus stand (Chinesische Pharmakologie I, **2012**). Die Resultate sollten in Form von Monographien für das DAB formuliert und als Vorschlag für die Implementierung in Deutschland eingereicht werden. Grundlagen der Analytik zu *Scrophulariae radix* und *Xanthii fructus* stellen die englischen Übersetzungen des ChP 2010 (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2010**) und 2015 (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2015**), die HKCMMS Volume 4 (Hong Kong Chinese Materia Medica Standards, **2011**) und Volume 5 (Hong Kong Chinese Materia Medica Standards, **2012**) sowie die Monographien von Wagner et al. (Wagner et al., **2011**) dar. Zusätzlich wurden Methoden der Literatur und des Ph.Eur. 8. Ausgabe (Europäisches Arzneibuch, **2014**) und 9. Ausgabe (Europäisches Arzneibuch, **2017**) evaluiert. Ausgehend vom ChP sollten etablierte Methoden in Hinblick auf Durchführbarkeit überprüft, bei Bedarf modifiziert und an Methodenstandards des Ph.Eur. angepasst (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, **2007**) werden. Bearbeitet wurden Drogenmuster verschiedener Importeure sowie zum Teil Muster aus einem deutschen Pilotprojekt der Bayerischen Anstalt für Landwirtschaft (Heuberger et al., **2010**).

Die Prüfung auf Identität erfolgte makroskopisch, mikroskopisch und per DC- bzw. HPTLC-Fingerprint. Reinheitsprüfungen, wie beispielsweise Asche oder Trocknungsverlust wurden, falls nach ChP vorgeschrieben, analog den Vorschriften des Ph.Eur. (2.2.32 Trocknungsverlust, **2017**; 2.4.16 Asche, **2017**) durchgeführt. Die Gehaltsbestimmung der analytischen Markersubstanzen im pflanzlichen Drogenmaterial wurde analog den Vorgaben aus dem ChP überprüft. Die Methoden zur Identifizierung der Drogen via DC/HPTLC wurden hinsichtlich Stabilität, Spezifität, Präzision und Robustheit (Reich and Schibli, **2007**) validiert. Die quantitative Untersuchung wurde in Anlehnung an die ICH Guidelines Q2 (R1) (International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, **2005**) auf die Parameter Stabilität, Spezifität, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Präzision, Robustheit und Wiederfindungsrate untersucht

und validiert. Aufgrund mangelnder Verfügbarkeit der Referenzsubstanz Atractylosid zur Bestimmung der Reinheit von *Xanthii fructus*, wurde diese aus kommerziell erhältlichem Pflanzenmaterial, mit Hilfe unterschiedlicher chromatographischer Methoden isoliert und charakterisiert.

Ziel der Arbeit war es weiterhin, die in der Literatur beschriebene Hepatotoxizität von *Xanthii fructus* (Wang et al., **2011**), insbesondere der beiden enthaltenen Diterpene Atractylosid und Carboxyatractylosid durch ein einfaches zelluläres Testsystem zu evaluieren und zu bewerten.

3 Scrophulariae radix (*Scrophularia ningpoensis* HEMSL.)

3.1 Einleitung

Scrophularia ningpoensis HEMSL., die Stammpflanze des Drogenmaterials, gehört zur Gattung *Scrophularia* und der Familie der Scrophulariaceen, die wiederum der Ordnung der Lamiales untergeordnet ist. Den Braunwurzgewächsen gehören 69 Gattungen mit 1910 Arten an, die weltweit, vor allem aber in Afrika und Australien verbreitet sind. (Strasburger - Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften, **2014**; Scrophulariae Radix, **2010**) In China sollen, laut der Flora of China, 36 Spezies beheimatet sein (Flora of China).

Die Recherche über das Internetportal www.theplantlist.org, eine Zusammenarbeit des Royal Botanic Gardens, Kew und Missouri Botanical Garden (unter zu Hilfenahme und Zusammenarbeit anderer Institutionen) ergab, dass in dieser Systematik der Familie der Scrophulariaceae insgesamt 76 Gattungen (Scrophulariaceae - The Plant List, **2013**) zugeordnet werden. Zur Gattung *Scrophularia* gehören hiernach insgesamt 617 Arten, wobei nur 86 davon als akzeptiert gelten (47 Arten als Synonyme und 484 Arten nicht veranlagt oder bestätigt) (*Scrophularia* - The Plant List, **2013**).

Bei *Scrophularia ningpoensis* HEMSL. handelt es sich um ein 60-120 cm hohes mehrjähriges Kraut. Die Stängel sind aufrecht und vierkantig. Die Blätter sind überwiegend gegenständig angeordnet, selten im oberen Bereich des Stängels wechselständig. Die Blattspreite ist bei einer Länge von 7-20 cm und einer Breite von 3,5-12 cm als ei- bis ellipsenförmig zu beschreiben. Die Blütenkrone ist dunkelviolett und 8-9 mm lang. Zu finden ist die Pflanze vor allem an Bächen, Berghängen, im Unterholz und auf Grasflächen in den Provinzen Chinas wie Jiangsu, Anhui und Hubei. Kultiviert wird die pharmazeutisch verwendete Pflanze in ganz China, vor allem in der Provinz Zhejiang, welche die beste Qualität liefern soll. Die Blütezeit beschränkt sich auf die Monate Juli bis August, im August bis September werden dann die oval/eiförmigen Kapseln ausgebildet. (Scrophulariae Radix (Figwort Root), **2010**; Scrophulariae Radix, **2004**)

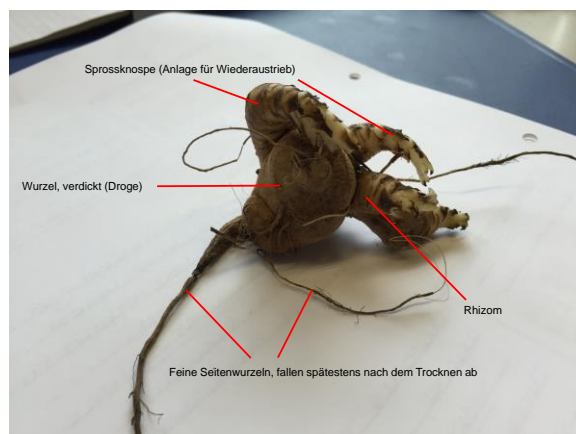
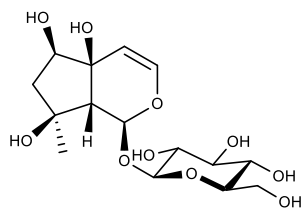


Abbildung 5 Wurzel, Sprossknospe, feine Seitenwurzeln und Rhizom von *Scrophularia ningpoensis* HEMSL. aus deutschem Versuchsanbau (LfL) in Manching, Versuchsstation Baumannshof (Beschriftung der Abbildung nach (Heuberger, 2014).

Nach ChP ist *Scrophulariae radix*, auch Braunwurz, dunkle Wurzel oder dunkler Ginseng genannt (Chinesische Pharmakologie I, 2012), die getrocknete Wurzel von *Scrophularia ningpoensis* HEMSL. (Abbildung 5) und wird im Winter, wenn Stängel und Blätter verwelkt sind, gesammelt, von Rhizomresten, Sprossen, Nebenwurzeln und Schmutz befreit und in der Sonne oder durch Zufuhr von Wärme getrocknet bis die Droge halb trocken ist. Im Anschluss wird das Drogenmaterial aufeinandergeschichtet und für drei bis sechs Tage gelagert. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis die Droge komplett trocken ist. Die sogenannte Schnittdroge („slices“), bestehend aus dünnen Scheiben kann auf zwei Arten gewonnen werden. Zum einen, in dem man die Wurzel wäscht, gründlich durchfeuchtet, in dünne Scheiben schneidet und dann trocknet oder zum anderen durch kurzes Einlegen in Wasser, gründlichem Dämpfen, kurzem Trocknen an Luft, Schneiden in dünne Scheiben und abschließendem vollständigen Trocknen. (*Scrophulariae Radix*, 2010) Diese Art der Aufbereitung, allgemein als „primary processing“ und in diesem speziellen Fall, als „Schwitzen lassen“ bezeichnet, soll einen entscheidenden Einfluss auf das Inhaltsstoffspektrum und somit die Qualität der Droge haben. Dabei ist nicht nur entscheidend ob das pflanzliche Material „processed“ wird, sondern auch auf welche Art und Weise. (Wang et al., 2016; Zhang et al., 2011) Die Tatsache, dass diese Methode des „Schwitzens“ nicht standardisiert ist und auf mehrere Arten ausgeführt werden kann, erschwert die Implementierung der Monographie in das Europäische Arzneibuch.

Das Inhaltsstoffspektrum von *Scrophulariae radix* reicht von Iridoidglykosiden wie Harpagid (Abbildung 6, Teilabbildung A), Harpagosid (Abbildung 6, Teilabbildung B) (Li et al., 1999), Aucubin (Qian et al., 1992; Wu et al., 2010) und Catalpol (Cao et al., 2015; Wang et al., 2016), über Phenylpropanoidglykoside wie Ningposid A-C (Abbildung 7, Teilabbildungen A-C) (Li et al., 2000) und Acteosid (Jing et al., 2011) bis hin zu Fettsäuren (Miyazawa and Okuno, 2003) und Alkaloiden (Zhang et al., 2015).

Teilabbildung A



Teilabbildung B

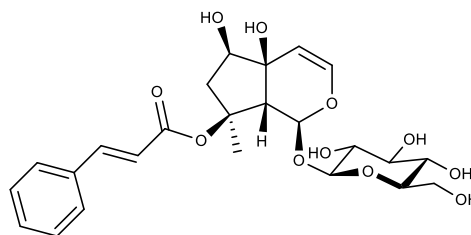
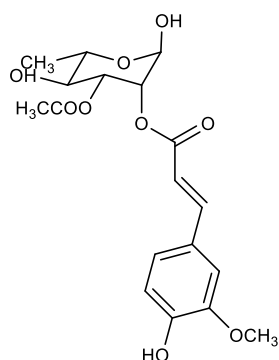
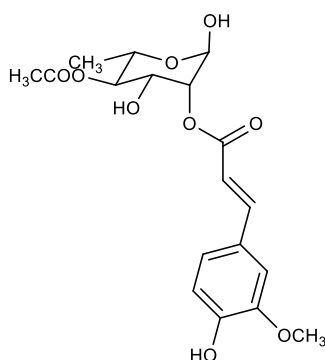


Abbildung 6 Strukturformeln der Iridoidglykoside aus *Scrophulariae radix* Harpagid (**Teilabbildung A**) und Harpagosid (**Teilabbildung B**).

Teilabbildung A



Teilabbildung B



Teilabbildung C

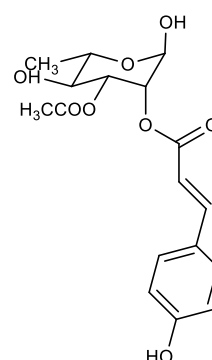


Abbildung 7 Strukturen, der aus der Wurzel von *Scrophularia ningpoensis* isolierten Verbindungen Ningposid A (3-O-Acetyl-2-O-feruloyl- α -L-rhamnopyranose, **Teilabbildung A**), Ningposid B (4-O-Acetyl-2-O-feruloyl- α -L-rhamnopyranose, **Teilabbildung B**) und Ningposid C (3-O-Acetyl-2-O-*p*-hydroxycinnamoyl- α -L-rhamnopyranose, **Teilabbildung C**).

Die dosisabhängige antipruriginöse Wirkung des methanolischen Extraktes von *Scrophulariae radix* konnte mit Substanz P als juckreizfördernde Substanz, nach peroraler Applikation, in Mäusen nachgewiesen werden (Tohda et al., **2000**). Weiterhin konnte eine Studie, unter zu Hilfenahme der SOS-induzierten Aktivität eines Mutagens im *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 *umu* Test, ein antimutagenes Potenzial des methanolischen Extraktes zeigen. Dieser Effekt wurde vor allem auf die vier Verbindungen *trans*-Zimtsäure, *p*-Methoxy-*trans*-zimtsäure, 3,4-Dimethoxy-*trans*-zimtsäure und 4-Hydroxy-3-Methoxy-*trans*-zimtsäure zurückgeführt. (Miyazawa et al., **1998**)

Die Wirkung der beiden Iridoide Harpagid und Harpagosid wurde (neben anderen Iridoiden und aromatischen Glykosiden) an murinen Herzmuskelfaserzellen auf deren inhibitorische Eigenschaften nach Calciumanstieg, indiziert durch Kaliumchlorid, untersucht und zeigten dabei eine signifikante Wirkung. Die Autoren postulierten, dass Iridoidglykoside aus *Scrophularia ningpoensis* einen prophylaktischen und therapeutischen Beitrag bei Herzmuskelschäden über eine Calciumregulation leisten könnten (Chen et al., **2008**). *In vitro* (Shen et al., **2012**) und *in vivo* Experimente (Qian et al., **1991**) bestätigten zudem die anti-inflammatorische Wirkung von wässrigen Extrakten aus *Scrophulariae radix*.

Anwendung findet das Pflanzenmaterial in der TCM in Kombination mit anderen Arzneidroge beispielsweise bei Halsschmerzen, Diphtherie, eitrigen Entzündungen, Hautläsionen mit Abszessen (Chinesische Pharmakologie I, **2012**) und geröteten Augen (*Scrophulariae Radix*, **2010**).

3.2 Material und Methoden

Tabelle 5 In Kapitel 3 verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Aceton	Pure	Acros Organics über Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Acetonitril	Acetonitril für die Flüssigchromatographie (HPLC grade)	Merck Chemicals, Darmstadt (Deutschland)
Ameisensäure	Rotipuran® p.A.	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ameisensäure	≥ 98%	Acros Organics über Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ammoniak	25%	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Anisaldehyd	<i>p</i> -Anisaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Chloralhydrat	Chloralhydrate C-IV, 99,5-101%	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Chloroform	p.A.	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Chloroform	HPLC grade	Acros Organics über Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
DC Kieselplatten	TLC, Silica Gel 60 F ₂₅₄ 20x20 cm	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Dichlormethan	Dichlormethan ≥99,5% stabilisiert, AnalaR NORMAPUR® ACS	VWR, Darmstadt (Deutschland)
Dichlormethan	Dichlormethan HPLC grade	Acros Organics über Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Dichlormethan	HPLC grade	Acros Organics über Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Einmalspritzen	Norm-Ject, Tuberculin, 1 ml	Henke Sass Wolf, Tuttlingen (Deutschland)
Essigsäure	Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Essigsäure	99,5%	Acros Organics über Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ethanol	Ethanol (p.a.) absolute ≥99,8%	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Ethanol	Ethanol 99,8%	Alcosuisse AG, Bern (Schweiz)
Ethanol 96%	Ethanol 96%	Alcosuisse AG, Bern (Schweiz)
Ethylacetat	99,5%	Acros Organics, über Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ethylacetat	Reag. Ph.Eur.	VWR, Darmstadt (Deutschland)

Faltenfilter	Qualitative, grade 1289, Dia. 125 mm, 84 g/m ²	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Filterpapier (Aschefrei)	Quantitative, grade 388, Dia. 90 mm, 84 g/m ²	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Heptan	≥ 95%	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
HPLC inlays	Micro Insert, 300 µl Inhalt, WIC 47000	Wicom, Heppenheim (Deutschland)
HPLC Vials mit Verschlusskappe	11 mm CrimpSnap-Vial braun 2 mm, PP Schnappkappe mit PTFE/Silikon-Septum	Wicom, Heppenheim (Deutschland)
HPTLC Kieselgelplatten	HPTLC, Silica Gel 60 F ₂₅₄ 20x10 cm, 10x10 cm	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Methanol	Methanol für die Flüssigchromatographie (HPLC grade)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Methanol	Methanol p.a. (Reag. Ph.Eur.)	VWR, Darmstadt (Deutschland)
Methanol	Methanol für die Flüssigchromatographie (HPLC grade)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Methyl-tert-butylether	99,9%	Acros Organics über Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
n-Butanol	p.a., ≥99,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
n-Butanol	p.a., ≥99,5%	Acros Organics über Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Orangeegel	Silica gel orange 2-5 mm mit Indikator	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Phloroglucinol	for synthesis	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Phosphorsäure	ortho-Phosphorsäure p.A. 85%	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Salzsäure, konzentrierte	37%	VWR, Darmstadt (Deutschland)
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄ , p.a., 95-97%	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Schwefelsäure	96%	Alcosuisse AG, Bern (Schweiz)
Spritzenvorsatzfilter	Perfect-Flow, Cellulose 0,2 µm, 13 mm	Wicom, Heppenheim (Deutschland)
Toluol	≥99%	Acros Organics über Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Vanillin		Fluka über Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Vanillin	≥99%	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Wasser	Entionisiert	Universität Regensburg, Regensburg (Deutschland)
Wasser	Entionisiert	Firma Camag, Muttenz (Schweiz)

Tabelle 6 In Kapitel 3 verwendete Geräte und Software.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Abdampfschale	Verschiedene Größen	Rosenthal, Selb (Deutschland)
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Analysenwaage	MS 205 DU	Mettler-Toledo, Ingolstadt (Deutschland)
Diverse Laborglasgeräte	u.a. Vollpipetten, Messpipetten, Bechergläser, Messkolben, Messzylinder	Brand, Wertheim (Deutschland)
Excel	Microsoft Excel 2013	Microsoft, Washington (USA)
Exsikkator	Vakuum Exsikkator, diverse Größen	Duran, Wertheim/Main (Deutschland)
Flachbodenkammer	20x20 cm	Desaga Sarstedt-Gruppe, Nümbrecht (Deutschland)
Fotodokumentation	CarbUVis	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Heizplatte	Thermoplate S	Desaga Sarstedt-Gruppe, Nümbrecht (Deutschland)
HPLC	Autosampler L-2200 Pumpe L-2130 Säulenofen L-2350 Diode Array Detector L-2455	VWR, Darmstadt (Deutschland)
HPLC Software	EZChrom Elite 3.1.7	VWR, Darmstadt (Deutschland)
HPTLC (Camag, Schweiz)	Auftragung Automatic TLC Sampler 4 Entwicklung ADC2 Doppeltrogkammer 20x10 cm Dokumentationseinheit Visualizer Filterpapier für die Kammersättigung	Camag, Muttenz (Schweiz)
HPTLC (Regensburg)	Auftragung Linomat 5 Entwicklung ADC2 Doppeltrogkammer 20x10 cm Dokumentationseinheit Reprostar 3 TLC Scanner 3 Filterpapier für die Kammersättigung	Camag, Muttenz (Schweiz)
HPTLC Software (Camag, Schweiz)	VisionCats 2.0	Camag, Muttenz (Schweiz)
HPTLC Software (Regensburg)	WinCats 1.4.6	Camag, Muttenz (Schweiz)
Indikatorpapier	pH 1-10, Universalindikator	Merck, Darmstadt (Deutschland)

Mikroskop	BX14	Olympus, München (Deutschland)
Muffelofen	L 3/11/B170	Nabertherm, Lilientahl (Deutschland)
Mühle	UZM ZM1 Mühle Yellowline A10	IKA-Werke, Staufen (Deutschland)
Polfilter	U-Pot	Olympus, München (Deutschland)
Porzellantiegel	Hohe Form, verschiedene Größen	Haldenwanger, Waldkraiburg (Deutschland)
Rotationsverdampfer	Laborota 4003	Heidolph Instruments, Schwabach (Deutschland)
RP-18 Säule (HPLC) I	Purospher® Star RP-18e (5 µm), Hibar® RT-250-4 (No.027442), mit Vorsäule	Merck, Darmstadt (Deutschland)
RP-18 Säule (HPLC) II	Purospher® Star RP-18e (5 µm), LiChroCART® 250-4 (No.841127), mit Vorsäule	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Rückflusskühler	Diverse Größen	Normschliff Gerätebau, Wertheim (Deutschland)
Schüttelmaschine	RO 10	Gerhardt, Königswinter (Deutschland)
Schütteltrichter		Schott, Mainz (Deutschland)
Sieb	704284 (DIN 4188)	Retsch, Haan (Deutschland)
Sprühfinger		Witeg, Wertheim (Deutschland)
Spss	IBM SPSS Statistics 25 Software	IBM, Ehningen (Deutschland)
Tauchkammer	HPTLC Tauchgerät mit Kammer	Universität, Regensburg
	HPTLC Tauchgerät mit Kammer	Bionorica, Neumarkt (Deutschland)
Trockenschrank	Tv50ul 770169	Memmert, Schwabach (Deutschland)
Ultraschallbad I	SW 3H	Sonoswiss, Ramsen (Schweiz)
Ultraschallbad II	USC1200TH	VWR, Darmstadt (Deutschland)
Ultraschallbad III	USC1700TH	VWR, Darmstadt (Deutschland)
Waage	LE4202S	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Wägeglast	mit Deckel, diverse Größen	Duran, Wertheim/Main (Deutschland)
Wasserbad	WB 22	Memmert, Schwabach (Deutschland)
Zentrifuge	EBA21	Hettich, Tuttlingen (Deutschland)

Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (StabW) wurden mit Hilfe der Software Excel berechnet.

Tabelle 7 In Kapitel 3 verwendete Referenzsubstanzen, inklusive Reinheit.

Bezeichnung	Reinheit; Charge	Anbieter
Aucubin	95%, HPLC rein; 5970	Phytolab, Vestenbergsgreuth (Deutschland)
Catalpol	100%, HPLC rein; 03-14	TransMIT, Gießen (Deutschland)
Escin	81%, absolut; 7116	Phytolab, Vestenbergsgreuth (Deutschland)
Harpagid	85%, absolut; 2925 95%, absolut; 10059	Phytolab, Vestenbergsgreuth (Deutschland)
Harpagosid	97%, absolut; 7259 96%, absolut; 7259	Phytolab, Vestenbergsgreuth (Deutschland)
Verbascosid	96%, absolut; 7613	Phytolab, Vestenbergsgreuth (Deutschland)

Tabelle 8 In Kapitel 3 verwendetes Drogenmaterial/Granulat.

Bezeichnung/Anbieter	Stammpflanze	Charge; ggf. Herkunft
Arobemed	-	7360
Caelo	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.	10122146; Zhe Jiang
Chinamedica	-	220004; Anhui
Chongqing (Chongqingtiankaiyaoyey- ouxiangongsi)	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.	140301; Chongqing
Harpagophyti radix Caelo	<i>Harpagophytum procumbens</i>	12031807
Herbasinica	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.	111201H087; Zhe Jiang
Herbasinica	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.	120701G087
Trockenextrakt		
LfL Probe 1	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.	2012
LfL Probe 10	<i>Scrophularia nodosa</i>	2009
LfL Probe 3	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.	2012
LfL Probe 5	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.	2012
LfL Probe 7	<i>Scrophularia nodosa</i>	2009
LfL Probe 8	<i>Scrophularia nodosa</i>	2009
LfL Probe 9	<i>Scrophularia nodosa</i>	2009
Plantaginis lanc. herba conc. Galke	-	-
Plantasia 30004	-	30004
Plantasia 002/82	-	002/82
Plantasia 720004	-	720004
Plantasia 003/40	-	003/40
Plantasia 510004	-	510004
Plantasia 780004	-	780004
Plantasia Granulat	-	1204535
Sinophyto	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.	01270933; Hubei
Valerianae radix conc. Caelo	-	13119004
Yong	-	130788862

Alle Proben wurde durch ein Sieb der Maschenweite 355 µm (s. Text unten) gesiebt, mit Ausnahme von Harpagophyti radix, Plantaginis lanc. herba und Valerianae radix, die durch ein Sieb der Maschenweite 500 µm gesiebt wurden.

Tabelle 9 Verwendetes Drogenmaterial des Rhizoms von *Scrophularia ningpoensis* HEMSL..

Bezeichnung/Anbieter	Stammpflanze	Charge; ggf. Herkunft
LfL Probe 2	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.	2012
LfL Probe 4	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.	2012
LfL Probe 6	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSL.	2012

3.2.1 Prüfung auf Identität

3.2.1.1 Makroskopische Untersuchung

Für die makroskopische Charakterisierung wurde in Anlehnung an das ChP (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2010**) und dessen deutscher Übersetzung (Arzneibuch der Chinesischen Medizin, **2005, 2010 und 2015**) das pflanzliche Drogenmaterial auf einer weißen Unterlage ausgebreitet, untersucht und fotografiert. Gegenstand der Prüfung waren dabei Eigenschaften wie Farbe, Größe (Länge, Breite und Dicke) und sonstige auffällige botanische Charakteristika.

3.2.1.2 Mikroskopische Untersuchung

Für die mikroskopische Untersuchung wurde in Anlehnung an das ChP (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2015**; Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2010**), dessen deutscher Übersetzung (Arzneibuch der Chinesischen Medizin, **2005, 2010 und 2015**) und dem HKCMMS (Hong Kong Chinese Materia Medica Standards, **2012**; Hong Kong Chinese Materia Medica Standards, **2011**) das Drogenmaterial in einer Mühle pulverisiert und mit einem Sieb der lichten Maschenweite 355 µm (*Scrophulariae radix*) (2.4.1 Siebe, **2017**) gesiebt. Im Mikroskop wurden charakteristische Merkmale ausfindig gemacht, fotografiert und falls notwendig vermessen. Für die Identifizierung der charakteristischen Merkmale wurden ein Polfilter und folgende Reagenzien verwendet:

- **Chloralhydrat-Lösung:** 1000 g Chloralhydrat ad 1000 ml mit Wasser
 - Etwas Pulver wurde auf dem Objektträger mit ein paar Tropfen Chloralhydrat-Lösung vermischt und erhitzt; Bevor das Präparat mikroskopiert werden konnte, wurde verloren gegangene Flüssigkeit mit Chloralhydrat-Lösung ersetzt.
- **Phloroglucin/HCl-Lösung:** 8 g Phloroglucin in 400 ml Ethanol 90% (V/V) mit 25%iger Salzsäure (70 g Salzsäure in 100 ml Wasser)

- Das Pulver wurde auf einem Objektträger mit 2-3 Tropfen Phloroglucin-Lösung versehen und im Anschluss mit 1-2 Tropfen Salzsäure versetzt. Durch das Reagenz wird Lignin rot angefärbt (Stahl-Biskup and Reichling, **2010**).

3.2.1.3 Dünnschichtchromatographische Untersuchung

3.2.1.3.1 Methodenevaluierung und Entwicklung

Die Prüflösungen wurden bandenförmig (Bandenlänge 8 mm) und mit einem 8 oder 10 mm breiten Abstand vom Plattenboden mit Hilfe des Linomaten oder einer automatischen Auftrageinheit (ATS) auf Kieselgelplatten (DC oder HPTLC) aufgetragen und getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Entwicklung der Platte nach Kammersättigung entweder in einer automatischen Entwicklungskammer oder in einer Doppeltrog- bzw. Flachbodenkammer bis zur jeweils in der Bildunterschrift angegebenen Entwicklungsdistanz. Nach Trocknung der Platte konnte eine erste Auswertung bei 254, 366 nm oder Weißlicht mit Hilfe des Reprostars vorgenommen werden. Das Derivatisierungsreagenz wurde entweder auf die Platten mittels Sprühfingerring aufgebracht oder die Platte in das jeweilige Reagenz, unter Zuhilfenahme einer Tauchkammer, getaucht. Eine weitere Dokumentation erfolgte erneut bei 254, 366 nm oder Weißlicht.

Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung von *Scrophulariae radix* wurden folgende **Derivatisierungsreagenzien, inklusive ihrer Anwendung**, verwendet:

Ethanolische Schwefelsäure (10%) (*Scrophulariae Radix*, **2011**)

Bestandteile: 10 ml Schwefelsäure wurden zu 90 ml Ethanol gegeben.

Derivatisierung: Nach dem Besprühen wurde die Platte bei 105 °C auf der Heizplatte erhitzt. Die Auswertung erfolgte bei 366 nm.

5%iges Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz ChP (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2010**)

Bestandteile: 2,5 g Vanillin wurden in 50 ml konzentrierter Schwefelsäure gelöst.

Derivatisierung: Die Platte wurde besprüht und im Anschluss 3 min bei 100 °C getrocknet. Die Auswertung erfolgte bei Weißlicht.

Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (Wagner et al., 2011)

Bestandteile: 1%ige ethanolische Vanillin-Lösung (1 g Vanillin wurde in 100 ml wasserfreiem Ethanol gelöst) und 10%ige ethanolische Schwefelsäure (10 g Schwefelsäure wurde mit 90 g wasserfreiem Ethanol vermischt).

Derivatisierung: Die Platte wurde zunächst mit 1%iger ethanolischer Vanillinlösung und im Anschluss mit 10%iger ethanolischer Schwefelsäure besprüht und für 10 min auf einer Heizplatte von ca. 110 °C getrocknet. Die Auswertung erfolgte unter Weißlicht.

Anisaldehyd-Reagenz (Reich and Schibli, 2007)

Bestandteile: 170 ml Methanol wurden unter Eiskühlung langsam und mit 20 ml Essigsäure und 10 ml Schwefelsäure versetzt und vermischt. Nachdem die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde 1 ml Anisaldehyd (*p*-Methoxybenzaldehyd) hinzugegeben.

Derivatisierung: Die Platte wurde in das Reagenz getaucht und für 3 min, bei ca. 100 °C auf der Heizplatte getrocknet. Die Auswertung erfolgte unter Weißlicht.

Für die Evaluierung und Entwicklung einer Identitätsbestimmungsmethode für *Scrophulariae radix* wurden folgende **Methoden** verwendet:

Methode I HKCMMS (*Scrophulariae Radix*, 2011)

Extraktion: 1,0 g pulverisiertes Drogenmaterial (355 µm) wurden mit 10 ml Ethanol 50% versetzt, für 10 min im Ultraschallbad extrahiert und im Anschluss filtriert.

Mobile Phase: Ethylacetat:Methanol:Ameisensäure (4:1:0,1, V:V:V).

Derivatisierungsreagenz: Ethanolische Schwefelsäure (10%).

Methode II ChP (*Scrophulariae Radix*, 2010)

Extraktion: 2,0 g pulverisierte Droge (355 µm) wurde mit 25 ml Methanol versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur mazeriert, für 30 min im Ultraschallbad extrahiert und im Anschluss filtriert. Das

Filtrat wurde zur Trockne eingedampft und in 25 ml Wasser gelöst. Es fand eine Extraktion durch Ausschütteln mit zwei Aliquoten (je 30 ml) *n*-Butanol (gesättigt mit Wasser) statt. Nach Kombination der *n*-Butanol-Fractionen wurde die Lösung zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 5 ml Methanol aufgenommen.

Mobile Phase: Chloroform:Methanol:Wasser (12:4:1, V:V:V), die untere Phase wurde verwendet.

Derivatisierungsreagenz: 5%iges Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz ChP.

Methode III Wagner (Radix Scrophulariae, 2011)

Extraktion: 1,0 g pulverisiertes Drogenmaterial (355 µm) wurde mit 10 ml *n*-Butanol versetzt und 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Der abgekühlte Extrakt wurde filtriert und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol aufgenommen.

Mobile Phase: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V:V:V).

Derivatisierungsreagenz: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz.

Methode IV (in Anlehnung an (Radix Scrophulariae, 2011))

Extraktion: 1,5 g pulverisiertes Drogenmaterial (355 µm) wurden mit 10 ml *n*-Butanol versetzt und 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Der abgekühlte Extrakt wurde filtriert und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol aufgenommen.

Mobile Phase: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V:V:V).

Derivatisierungsreagenz: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz.

Derivatisierung: Die Platte wurde zunächst mit einer 1%igen ethanolschen Vanillinlösung und im Anschluss mit einer 10%igen ethanolschen Schwefelsäure besprüht und für 3 min auf einer Heizplatte von ca. 110 °C getrocknet. Die Auswertung erfolgte unter Tageslicht.

3.2.1.3.2 Methodenvalidierung zur Identitätsbestimmung

Die Validierungsergebnisse wurden mit Hilfe eines Validierungsprotokolles (3.2.1.3.2.1 und 3.2.1.3.2.2) nach (Reich and Schibli, **2007**) und in Anlehnung an (Brem, **2010**) und (Scherübl, **2014**) generiert und zusammengefasst.

3.2.1.3.2.1 Methodenbeschreibung

In Tabelle 10 werden die Parameter zur Methodenbeschreibung im Rahmen der Erstellung eines Validierungsprotokolles vorgestellt.

Tabelle 10 Parameter für die Methodenbeschreibung zur Erstellung eines Validierungsprotokolles.

Testlösung	Die Extraktion des Drogenmaterials wird genau beschrieben (Einwaage Drogenmaterial, Extraktionsart und Extraktionsdauer).
Referenzlösung	Beschreibung der Art, Konzentration und des Lösungsmittels zur Herstellung der Referenzlösung.
Derivatisierungsreagenz	Erläuterung der Zusammensetzung und Herstellung des Derivatisierungsreagenzes.
Stationäre Phase	Beschreibung der verwendeten stationären Phase (DC/HPTLC) mit Material und Abmessungen der Platte.
Probenauftragung	Auftragungsvolumen (TLC und HPTLC) der Testlösung, Referenzlösung mit Länge der Banden und Auftragsposition werden beschrieben.
Temperatur und Luftfeuchtigkeit	Beschreibung der bei Versuchsdurchführung vorherrschenden Temperatur und Luftfeuchtigkeit.
Chromatographie	Zur Chromatographie verwendete Entwicklungskammer, mobile Phase (V/V/V), Entwicklungsstrecke (ab Auftragszone oder ausgehend vom unteren Plattenrand) und der Trocknungszeit (Kaltluft/Warmluft).
Derivatisierung	Die Durchführung der Derivatisierung wird genau beschrieben (Sprühen, Tauchen; bei Erhitzen der Platte mit Angabe der Temperatur und Dauer).
Chromatogramme, Auswertung und Ergebnisse	Die erhaltenen Chromatogramme werden wie gefordert (254, 366 nm, Tageslicht; vor oder nach Derivatisierung) dargestellt und die Banden der Testlösungen mit denen der Referenzlösungen verglichen. Anhand von Farbe, Intensität und Lage (R_f) der Banden werden die Ergebnisse diskutiert.

3.2.1.3.2.2 Validierung

a) Materialien

Tabelle 11 beschreibt die Darstellung der bei einer Validierung verwendeten Materialien.

Tabelle 11 Beschreibung der verwendeten Materialien für die Validierung einer Identitätsbestimmungsmethode.

Chemikalien, Lösungsmittel	Die zur Validierung verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel, inklusive deren Hersteller und Qualität werden aufgeführt.
Pflanzenproben, Verfälschungen und Standards	Verwendete Pflanzenproben (Anbieter), Verfälschungen (Anbieter) und Referenzstandards (Hersteller und Reinheit) werden beschrieben.
Platten	Die Charge, Größe und der Hersteller des verwendeten Materials wird aufgeführt.
Geräte	Eine Zusammenstellung aller verwendeten Geräte mit Herstellern.
Software	Die zur Detektion und Auswertung verwendete Software wird aufgeführt.

b) Validierungstests

Zur Durchführung der im Folgenden aufgeführten Validierungstests wurden die in Tabellen 10 und 11 verwendeten Parameter und Materialien verwendet.

Stabilität

Stabilität der Analyten während der Chromatographie

Zur Untersuchung der Stabilität des Analyten während der Chromatographie wurde eine definierte Menge (μl) der Testlösung auf eine HPTLC-Platte (10x10 cm) punktförmig aufgetragen und wie beschrieben chromatographiert. Im Anschluss wurde die Platte um 90° gedreht und erneut mit frischem Fließmittel entwickelt. Falls notwendig wurde die Platte derivatisiert und konnte so ausgewertet werden. Liegen alle Banden/Zonen des Extraktes auf der Winkelhalbierenden, so bleibt der Analyt während der Chromatographie stabil.

Stabilität des Analyten in Lösung und auf der Platte

Um die Untersuchung der Stabilität des Analyten in Lösung und auf der Platte vorzunehmen, wurde zunächst eine authentische Drogenprobe extrahiert und auf eine HPTLC-Platte (10x10 cm aufgetragen) aufgetragen. Der Extrakt und die Platte wurden unter Lichtausschluss

(HPTLC-Platte zusätzlich in Aluminiumfolie gewickelt im Exsikkator) für drei Stunden gelagert. Nach drei Stunden wurde eine weitere Probe auf die gleiche Art und Weise extrahiert und zweifach aufgetragen. Als weitere Bande wurde der drei Stunden in Lösung befindliche Extrakt aufgetragen. Es ergab sich daher folgendes Auftragungsschema auf der HPTLC-Platte:

1. Probe, aufgetragen drei Stunden vor der Chromatographie.
2. Probe, frisch extrahiert und kurz vor der Chromatographie aufgetragen.
3. Probe, frisch extrahiert und kurz vor der Chromatographie aufgetragen.
4. Probe, deren Extrakt drei Stunden in Lösung gelagert wurde, frisch aufgetragen.

Im Anschluss wurde die Platte entwickelt, falls nötig derivatisiert und ausgewertet. Die Probe ist mindestens drei Stunden in Lösung und auf der Platte stabil, wenn sich keine deutlichen Unterschiede der Banden in Bezug auf Farbe, Intensität und R_f -Wert ergaben.

Stabilität der Derivatisierung/der Ergebnisse

Die Drogenproben wurden wie beschrieben extrahiert, chromatographiert und ggf. derivatisiert. Nach der Dokumentation wurde die Platte eine Stunde lang beobachtet. Für die Auswertung wurden jeweils sofort, nach einer, zwei, fünf, zehn, 20, 30 und nach 60 min ein Bild der Platte aufgenommen. Eine Stabilität der Derivatisierung bzw. der Ergebnisse ist gegeben, wenn sich keine Unterschiede der Banden in Bezug auf Farbe, Intensität und R_f -Wert ergaben.

Spezifität

Identifizierung durch Vergleich von Drogenmaterial mit Referenzsubstanzen

Authentisches Drogenmaterial wurde extrahiert und zusammen mit der für die Auswertung notwendigen Referenzlösungen auf die HPTLC-Platte aufgetragen, chromatographiert und ggf. derivatisiert. Nach Dokumentation der Ergebnisse erfolgte die Auswertung. Die Methode wird als spezifisch bezeichnet, wenn das Fingerprint-Chromatogramm des Extraktes in Farbe und Position (R_f -Wert) die Banden der Referenzlösungen aufwies.

Detektion von Verfälschungen

Verfälschungen wurden zusammen mit authentischem Drogenmaterial extrahiert, mit den entsprechenden Referenzlösungen chromatographiert und ggf. derivatisiert. Die Methode ist für das jeweilige Pflanzenmaterial spezifisch, wenn das Fingerprint-Chromatogramm der Verfälschungen sich deutlich von dem Fingerprint-Chromatogramm des authentischen Drogenmaterials bezüglich Anzahl, Farbe und Position (R_f -Wert) der Banden unterscheidet.

Präzision

Wiederholpräzision

Authentisches Drogenmaterial wurde dreimal innerhalb eines Tages frisch extrahiert, auf drei unterschiedlichen Platten mit frischem Fließmittel chromatographiert und ggf. derivatisiert. Die Ergebnisse innerhalb einer Platte und von Platte zu Platte wurden verglichen und anhand der durchschnittlichen R_f -Werte je Bahn und Platte ausgewertet. Der Versuch Wiederholpräzision entsprach den Anforderungen, wenn alle Banden auf jeder Platte identisch waren in Bezug auf Anzahl, Position und Farbe. Die R_f -Werte der Referenzlösungen und deren korrespondierenden Zonen in den Extrakten durften, über die drei Platten hinweg, um nicht mehr als 0,03 R_f -Einheiten voneinander abweichen.

Laborpräzision

Zur Überprüfung der Laborpräzision wurde an zwei weiteren Tagen authentisches Drogenmaterial extrahiert, chromatographiert und ggf. derivatisiert. Die Durchschnitts- R_f -Werte je Bahn und je Platte wurden innerhalb der drei Platten verglichen und durften nicht mehr als 0,03 R_f -Einheiten voneinander abweichen.

Robustheit

Kammertyp/Plattentyp

Zur Überprüfung der Robustheit wurde authentisches Drogenmaterial extrahiert, auf eine DC-Platte aufgetragen und in einer Flachbodenkammer (20x20 cm) entwickelt und ggf. derivatisiert. Die Ergebnisse wurden mit denen der Chromatographie auf einer HPTLC-Platte und mittels automatischem Entwicklungsgerät in einer Doppeltrogkammer (20x10 cm) verglichen. Alle relevanten Banden der in den beiden unterschiedlichen Versuchen entwickelten Platten waren identisch in Bezug auf Anzahl, Position und Farbe der Zonen. Der Unterschied der R_f -Einheiten durfte nicht mehr als 0,06 betragen.

Entwicklungsdistanz

Die Robustheit in Bezug auf die Entwicklungsdistanz wurde überprüft, in dem authentisches Drogenmaterial nach den Vorgaben extrahiert und die Entwicklungsstrecke je um 10 mm verlängert oder 10 mm verkürzt wurde. Die im Vergleich zu den Standardbedingungen resultierenden Banden, unterschieden sich nicht signifikant in Bezug auf Anzahl, Position und Farbe. Der Unterschied der R_f -Einheiten durfte nicht mehr als 0,06 betragen.

3.2.2 Prüfung auf Reinheit

3.2.2.1 Bestimmung des Trocknungsverlustes

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes erfolgte nach Ph.Eur. (2.2.32 Trocknungsverlust, **2017**). Dafür wurde ein Wägegglas zwei Stunden im Trockenschrank bei 100-105 °C getrocknet und anschließend im Exsikkator abgekühlt. Das genaue Gewicht wurde als Tara bestimmt. Nach Einwaage von 1,000 g gemahlenem Drogenmaterial wurde das Wägegglas erneut im Trockenschrank bei 100-105 °C für zwei Stunden getrocknet. Nach Auswaage wurde der Trocknungsverlust als prozentualer Masseverlust (m/m) berechnet und angegeben. Der Trocknungsverlust wurde mindestens an sechs verschiedenen Handelsmustern in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.2.2.2 Bestimmung der Asche

Die Bestimmung der Asche erfolgte ebenfalls nach den Vorschriften des Ph.Eur. (2.4.16 Asche, **2017**). Nach zweistündigem Ausglühen eines Quarztiegels bei 600 °C im Muffelofen wurde dieser im Exsikkator erkalten gelassen und genau gewogen. 1,00 g Substanz wurde eingewogen, eine Stunde lang im Trockenschrank bei 100-105 °C getrocknet und anschließend im Muffelofen bei 600 ± 25 °C bis zur Massekonstanz geglüht. Nach Abkühlen des Tiegels, in einem mit Orangegel befüllten Exsikkator, wurde die Auswaage bestimmt. Die Asche entspricht dem prozentualen Anteil (m/m) an der eingewogenen Masse. Die Aschebestimmung wurde mindestens an sechs verschiedenen Handelsmustern in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.2.2.3 Bestimmung der salzsäureunlöslichen Asche

Die Bestimmung der salzsäureunlöslichen Asche wurde gemäß den Vorgaben des Ph.Eur. durchgeführt (2.8.1 Salzsäureunlösliche Asche, **2017**). Dabei wurde der Rückstand aus der Aschebestimmung mit 15 ml Wasser und 10 ml Salzsäure 36% versetzt und mit einem Uhrglas abgedeckt 10 min schwach zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde der Rückstand durch ein aschefreies Filter abfiltriert und bis zur Neutralität des Filtrates mit heißem Wasser gewaschen. Der Rückstand wurde im Anschluss bis zur Massekonstanz im Muffelofen (600 ± 25 °C) geglüht. Zur Bestimmung der salzsäureunlöslichen Asche wurden mindestens sechs verschiedene Handelsmuster in einer Dreifachbestimmung untersucht.

3.2.2.4 Bestimmung der wasserlöslichen extrahierbaren Substanzen

Gemäß ChP (X A Determination of extractives, **2010**) wurde die Bestimmung der wasserlöslichen extrahierbaren Substanzen in der Hitze durchgeführt. Dazu wurden etwa 4 g der pulverisierten Droge abgewogen, mit 100,0 ml Wasser versetzt und das Gefäß dicht verschlossen. Nach einer erneuten Wägung und einer einstündigen Mazeration (in der Kälte)

wurde die Probe mit Hilfe eines Rückflusskühlers zum Sieden erhitzt und eine Stunde lang gekocht. Die Probe wurde nachdem sie abgekühlt war erneut gewogen und der Masseverlust mit Wasser ergänzt. Nach Filtration des Gemisches wurden 25,0 ml entnommen und in einer zuvor bis zur Massekonstanz getrockneten Abdampfschale auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft und im Anschluss drei Stunden bei $105 \pm 5 \text{ °C}$ getrocknet. Die abgekühlte Abdampfschale (30 min im Exsikkator) wurde erneut gewogen. Die Durchführung des Experimentes erfolgte an mindestens sechs verschiedenen Handelsmustern und wurde in Triplikaten durchgeführt.

3.2.3 Gehaltsbestimmung

3.2.3.1 Gehaltsbestimmung mittels HPTLC

3.2.3.1.1 Methodenentwicklung

Zur Entwicklung einer densitometrischen Gehaltsbestimmungsmethode mittels HPTLC von *Scrophulariae radix* wurden folgende **Methoden** verwendet:

Methode V

- Extraktion: 0,5 g pulverisiertes Drogenmaterial (355 µm) wurden mit 5 ml Lösungsmittel für 10 min im Ultraschallbad extrahiert, im Anschluss zentrifugiert (5000 rpm/5 min). Der Überstand stellte die Testlösung dar.
- Mobile Phase: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V:V:V).
- Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd-Reagenz.
- Derivatisierung: Die Platte wurde in das Reagenz getaucht und für 3 min, bei ca. 100 °C auf der Heizplatte getrocknet. Die Auswertung erfolgte unter Weißlicht.

Methode VI

- Extraktion: 0,5 g pulverisiertes Drogenmaterial (355 µm) wurden mit 5 ml Ethanol 90% (V/V) für 10 min im Ultraschallbad extrahiert, im Anschluss zentrifugiert (5000 rpm/5 min). Der Überstand stellte die Testlösung dar.
- Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd-Reagenz.
- Derivatisierung: Die Platte wurde in das Reagenz getaucht und für 3 min, bei ca. 100 °C auf der Heizplatte getrocknet. Die Auswertung erfolgte unter Weißlicht.

3.2.3.1.2 Methodenvergleich

Um die neu entwickelte HPTLC-Methode (3.2.3.1.1, Methode VI) zur Quantifizierung von Harpagid und Harpagosid zu beurteilen, wurden Modifikationen vorgenommen und die somit erhaltene Methode (3.2.3.1.2, Methode VII) mit den Ergebnissen aus der Quantifizierung der beiden Iridoide per HPLC in Anlehnung an das ChP (3.2.3.1.2, Methode VIII) verglichen (Scrophulariae Radix, 2010).

HPTLC

Methode VII

- Extraktion:** 0,5 g pulverisiertes Drogenmaterial (355 µm) wurden mit 5,0 ml Ethanol 90% (V/V) bzw. 5,0 ml Methanol 50% (V/V) versetzt und für 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Lösung wurde filtriert und unter Nachspülen des Filters auf 5,0 ml mit entsprechendem Lösungsmittel aufgefüllt.
- Mobile Phase:** Dichlormethan: Ethanol: Wasser (70:45:6,5, V:V:V).
- Stationäre Phase:** HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten, alle Platten zur quantitativen Auswertung wurden vor Benutzung mit Methanol gewaschen und getrocknet.
- Auftragevolumen:** 5 µl (Proben- und Referenzlösungen).
- Derivatisierungsreagenz:** Anisaldehyd-Reagenz.
- Derivatisierung:** Die Platte wurde in das Reagenz getaucht und für 3 min, bei ca. 100 °C auf der Heizplatte getrocknet. Die Auswertung erfolgte unter Weißlicht.
- Detektion:** Harpagosid 284 nm (vor Derivatisierung) und 507 nm (nach Derivatisierung).
- Quantifizierung:** Absorbanz-Modus (Remission), slit dimension 5,00x0,3 mm (Mikro), scanning speed 20 mm/s.
- Auswertung der Ergebnisse:** Die Extrakte wurden jeweils an den Versuchstagen frisch hergestellt und vermessen. Die Referenzlösungen hingegen wurden zu Beginn der Versuchsreihe hergestellt, verdünnt und vermessen. Die Lagerung zwischen den Versuchen erfolgte bei -20 °C. Aus der Vermessung der Referenzlösungen an drei unterschiedlichen Tagen wurde eine gemittelte Kalibriergerade (lineare und quadratische Regression) per Software Excel erstellt. Durch die Ermittlung des Bestimmtheitsmaßes (r^2 ,

gemäß Software Excel) wurde zur Auswertung die Regression mit dem numerisch größeren bzw. besseren Bestimmtheitsmaß verwendet.

Referenzlösungen:

In Tabellen 12 und 13 werden die vermessenen Konzentrationen an Harpagid und Harpagosid aufgeführt.

Harpagid

Tabelle 12 Konzentrationen an Harpagid (mg/ml), hergestellt in Methanol 50% (V/V) zur Erstellung einer Kalibriergeraden.

Konzentrationen (mg/ml)						Lösungsmittel
0,0338	0,0676	0,1690	0,3380	0,5408	0,6760	Methanol 50% (V/V)

Harpagosid

Tabelle 13 Konzentrationen an Harpagosid (mg/ml), hergestellt in Ethanol 90% (V/V) zur Erstellung einer Kalibriergeraden.

Konzentrationen (mg/ml)						Lösungsmittel	
0,0124	0,0398	0,0795	0,0994	0,1243	0,1491	0,2485	Ethanol 90% (V/V)

HPLC

Methode VIII

Extraktion: 0,5 g pulverisiertes Drogenmaterial (355 µm) wurden mit 5,0 ml Ethanol 90% (V/V) bzw. 5,0 ml Methanol 50% (V/V) versetzt und für 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Lösung wurde filtriert und unter Nachspülen des Filters auf 5,0 ml mit entsprechendem Lösungsmittel aufgefüllt.

Stationäre Phase: RP-18.

Injektionsvolumen: 10 µl (Proben- und Referenzlösungen).

Mobile Phase: wässr. Phosphorsäure 0,03% (V/V) → Eluent A.

Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 0,800 ml/min.

Tabelle 14 Gradient zur Quantifizierung der beiden Iridoide Harpagid und Harpagosid per HPLC nach Methode VIII.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	97	3
10	90	10
20	67	33
25	50	50
30	20	80
35	20	80
37	97	3

Säulenofentemperatur: 25 °C.

Detektion: Harpagosid 280 nm und Harpagid 205 nm.

Auswertung der Ergebnisse: Die Extrakte wurden jeweils an den Versuchstagen frisch hergestellt und vermessen. Die Referenzlösungen hingegen wurden zu Beginn der Versuchsreihe hergestellt, verdünnt und vermessen. Die Lagerung zwischen den Versuchen erfolgte bei -20 °C. Aus der Vermessung der Referenzlösungen an drei unterschiedlichen Tagen wurde eine gemittelte Kalibriergerade (lineare und quadratische Regression) per Software Excel erstellt. Durch die Ermittlung des Bestimmtheitsmaßes (r^2 , gemäß Software Excel) wurde zur Auswertung die Regression mit dem numerisch größeren Bestimmtheitsmaß verwendet.

Referenzlösungen:

In den Tabellen 15 und 16 werden die vermessenen Konzentrationen an Harpagid und Harpagosid aufgeführt.

Harpagid

Tabelle 15 Konzentrationen an Harpagid (mg/ml), hergestellt in Methanol 50% (V/V) zur Erstellung einer Kalibriergeraden.

Konzentrationen (mg/ml)						Lösungsmittel
0,0338	0,0676	0,1690	0,3380	0,5408	0,6760	Methanol 50% (V/V)

Harpagosid

Tabelle 16 Konzentrationen an Harpagosid (mg/ml), hergestellt in Ethanol 90% (V/V) zur Erstellung einer Kalibriergeraden.

Konzentrationen (mg/ml)						Lösungsmittel	
0,0124	0,0398	0,0795	0,0994	0,1243	0,1491	0,2485	Ethanol 90% (V/V)

Die Wahl der stationären, mobilen Phase und des Gradienten erfolgte in Anlehnung an das ChP (Scrophulariae Radix, 2010). Die Extraktionsmethode, Säulenofentemperatur und die Detektionswellenlänge wurden jeweils modifiziert bzw. angeglichen, damit die Ergebnisse mit denen der Quantifizierung mittels HPTLC verglichen werden konnten.

3.2.3.2 Gehaltsbestimmung mittels HPLC

3.2.3.2.1 Methodenevaluierung und Entwicklung

Um eine Gehaltsbestimmungsmethode für den Monographievorschlag DAB zu Scrophulariae radix zu entwickeln, wurden zunächst bereits bestehende Methoden, wie beispielsweise die des ChP (Scrophulariae Radix, 2010) evaluiert und optimiert.

Methode IX (Scrophulariae Radix, 2010)

Extraktion:	Zu 0,5 g Drogenmaterial (355 µm) wurden in einen verschließbaren Kolben 50,0 ml Methanol 50% (V/V) gegeben. Einer einstündigen Mazeration folgte eine 45 min Extraktion im Ultraschallbad. Nach Abkühlen des Extraktes, wurde verloren gegangenes Volumen mit Methanol 50% (V/V) aufgefüllt. Nach Filtration konnte die erhaltene Lösung injiziert werden.
Stationäre Phase:	RP-18.
Injektionsvolumen:	10 µl (Proben- und Referenzlösungen).
Mobile Phase:	wässr. Phosphorsäure 0,03% (V/V) → Eluent A. Acetonitril → Eluent B.
Flussrate:	0,800 ml/min.

Tabelle 17 Gradient zur Quantifizierung der beiden Iridoide Harpagid und Harpagosid per HPLC nach Methode IX.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	97	3
10	90	10
20	67	33
25	50	50
30	20	80
35	20	80
37	97	3

Säulenofentemperatur: 25 °C.
 Detektion: Harpagosid und Harpagid bei 210 nm.
 Referenzlösungen: Harpagid (60 µg/ml, in Methanol 30% (V/V)), Harpagosid (20 µg/ml, in Methanol 30% (V/V)).

Methode X (Scrophulariae Radix, 2010)

Extraktion: Zu 0,5 g Drogenmaterial (355 µm) wurden in einen verschließbaren Kolben 50,0 ml Methanol 50% (V/V) zugegeben. Einer einstündigen Mazeration folgte eine 45 min Extraktion im Ultraschallbad. Nach Abkühlen des Extraktes, wurde verloren gegangenes Volumen mit Methanol 50% (V/V) aufgefüllt. Nach Filtration konnte die erhaltene Lösung injiziert werden.

Stationäre Phase: RP-18.

Injektionsvolumen: 10 µl (Proben- und Referenzlösungen).

Mobile Phase: wässr. Phosphorsäure 0,03% (V/V) → Eluent A.
 Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 18 Gradient zur Quantifizierung der beiden Iridoide Harpagid und Harpagosid per HPLC nach Methode X.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	97	3
10	90	10
20	67	33
25	50	50
30	20	80
35	20	80
37	97	3

Säulenofentemperatur: 40 °C.

Detektion: Harpagosid und Harpagid bei 210 nm.

Referenzlösungen: Harpagid (60 µg/ml, in Methanol 30% (V/V)), Harpagosid (20 µg/ml, in Methanol 30% (V/V)).

Methode XI (Teufelskrallenwurzel, 2017)

Extraktion: 0,500 g pulverisierte Droge (355 µm) wurden mit 100,0 ml Methanol versetzt, 4 h lang geschüttelt und im Anschluss durch einen Membranfilter filtriert.

Stationäre Phase: RP-18.

Injektionsvolumen: 10 µl (Proben- und Referenzlösungen).

Mobile Phase: Wasser → Eluent A.
Methanol → Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 19 Gradient zur Quantifizierung der beiden Iridoide Harpagid und Harpagosid per HPLC nach Methode XI.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	50	50
25	50	50
30	10	90
32	10	90
34	50	50
39	50	50

Säulenofentemperatur: 25 °C.

Detektion: Harpagosid 278 nm.

Referenzlösungen: Harpagid (60 µg/ml, in Methanol 30% (V/V)), Harpagosid (20 µg/ml, in Methanol 30% (V/V)).

Methode XII (Jing et al., 2011)*

Extraktion: 0,500 g pulverisiertes Drogenmaterial (355 µm) wurden mit 50,0 ml Methanol 50% (V/V) versetzt, 30 min im Ultraschallbad extrahiert und anschließend filtriert.

Stationäre Phase: RP-18.

Injektionsvolumen: 10 µl (Proben- und Referenzlösungen).

Mobile Phase*: 0,05% (V/V) wässrig. Ameisensäure → Eluent A.
Methanol → Eluent B.
Flussrate*: 1,000 ml/min.

Tabelle 20 Gradient zur Quantifizierung der beiden Iridoide Harpagid und Harpagosid per HPLC nach Methode XII (Jing et al., 2011).

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	90	10
5	85	15
10	65	35
15	52	48
30	30	70
36	12	88
42	12	88
44	90	10
49	90	10

Säulenofentemperatur*: 25 °C.
Detektion: 205 nm.
Referenzlösungen: Harpagid (60 µg/ml, in Methanol 30% (V/V)), Harpagosid (20 µg/ml, in Methanol 30% (V/V)), Verbascosid (60 µg/ml, in Methanol 30% (V/V)).

* aus Literaturstelle übernommene Parameter, restliche Parameter wurden modifiziert.

Methode XIII (in Anlehnung an und nach Modifikation von Methode IX/X (Scrophulariae Radix, 2010))

Extraktion: 0,500 g pulverisiertes Drogenmaterial (355 µm) wurden mit 25,0 ml Methanol 50% (V/V) versetzt, 10 min bei Raumtemperatur mazeriert und 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Nachdem der Extrakt abgekühlt war, folgte ein Filtrationsschritt. Unter Nachspülen des Filters wurde die Lösung auf 25,0 ml mit Methanol 50% (V/V) aufgefüllt.

Stationäre Phase: RP-18.
Injektionsvolumen: 10 µl (Proben- und Referenzlösungen).

Scrophulariae radix (*Scrophularia ningpoensis* HEMSL.)

Mobile Phase: wässr. Phosphorsäure 0,03% (V/V) → Eluent A.
Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 21 Gradient zur Quantifizierung der beiden Iridoide Harpagid und Harpagosid per HPLC nach Methode XIII.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	95	5
8	90	10
23	50	50
26	50	50
28	10	90
31	10	90
33	95	5
40	95	5

Säulenofentemperatur: 25 °C.

Detektion: 210 nm.

Referenzlösungen: Harpagid und Harpagosid; Konzentration und Lösungsmittel jeweils angegeben.

3.2.3.2.2 Methodenvalidierung zur Gehaltsbestimmung

Die Anfertigung des Validierungsschemas, die Durchführung der Methodenvalidierung und die Erstellung des Validierungsprotokolls zur Gehaltsbestimmung mittels HPLC wurden nach (Brem, **2010**; Funk, **1985**; Gottwald, **2000**; International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, **2005**; Kromidas, **2011**; Scherübl, **2014**) angefertigt. Die Parameter zur Methodenbeschreibung und Methodenvalidierung sind unter 3.2.3.2.2.1 und 3.2.3.2.2.2 aufgeführt.

3.2.3.2.2.1 Methodenbeschreibung

In Tabelle 22 sind die Parameter der Validierung aufgeführt und näher erläutert.

Tabelle 22 Die zur Methodenbeschreibung notwendigen Parameter mit deren Erklärung.

Testlösung	Die Herstellung der Testlösung mit Einwaage des Drogenmaterials, Extraktionsart und Extraktionszeit wird genau beschrieben.
Referenzlösung	Die Herstellung der Referenzlösung (Substanz, Konzentration und Lösungsmittel) wird genau beschrieben.
Stationäre Phase	Beschreibung der verwendeten stationären Phase mit Säulennamen, Material, Korngröße, Säulenlänge, Säulendurchmesser und Vorsäule.
Probeninjektion	Die injizierte Menge an Extrakt- und Referenzlösung wird aufgeführt. Während der Validierung werden alle Proben und Referenzlösungen je im Duplikat vermessen.
Chromatographie	Erläuterung des verwendeten Gerätes, des Fließmittelsystems (Lösungsmittel A [%], Lösungsmittel B [%]), des Gradienten mit Flussrate, Detektionswellenlänge und der Säulenofentemperatur.
Dokumentation	Die Chromatogramme werden bei der angegebenen Wellenlänge abgebildet.
Bild des Chromatogramms	Ein Chromatogramm einer authentischen Drogenprobe wird bei angegebener Wellenlänge dargestellt.
Auswertung der Ergebnisse	Die Auswertung des Chromatogrammes, mit Retentionszeit der zu quantifizierenden Peaks, wird beschrieben.
Methodeneignungstest	Anhand der Auflösung der zu quantifizierenden Peaks zu vorangehenden oder nachfolgenden Peaks wird die Methode auf Eignung überprüft.

3.2.3.2.2.2 Methodenvalidierung

a) Materialien

Tabelle 23 führt die Beschreibung der zur Validierung der Gehaltsbestimmungsmethode verwendeten Materialien auf.

Tabelle 23 Beschreibung der verwendeten Materialien für die Validierung einer Gehaltsbestimmungsmethode per HPLC.

Chemikalien, Lösungsmittel	Deren Beschreibung beinhaltet die zur Validierung verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel, inklusive deren Hersteller und Qualität.
Pflanzenproben und Standards	Verwendete Pflanzenproben (Anbieter) und Referenzstandards (Hersteller und Reinheit) werden beschrieben.
Geräte/Instrumente	Eine Zusammenstellung aller verwendeten Geräte mit Herstellern.
Software	Die zur Detektion und Auswertung verwendete Software wird aufgeführt.

b) Validierungstests

Zur Durchführung der Validierungstests wurden die in den Tabellen 22 und 23 verwendeten Parameter und Materialien verwendet.

Stabilität des Analyten in Lösung

Zur Untersuchung der Stabilität des Analyten wurde authentisches Drogenmaterial extrahiert und chromatographiert. Der Extrakt wurde über mindestens 12 Stunden (während Lagerung im Autosampler bei 10 °C) hinweg hintereinander mehrmals injiziert und die Peakflächen der Analyten ausgewertet. Für die Akzeptierung des Testes durfte die relative Standardabweichung der Peakflächen des Analyten nicht mehr als 5% betragen.

Spezifität

Authentisches Drogenmaterial wurde extrahiert und chromatographiert. Im erhaltenen Chromatogramm wurde die Auflösung (R_s) des Analyten zu vorangehenden und/oder nachfolgenden Peaks graphisch und nach Berechnung durch Formel 1 ermittelt (Rücker et al., 2013). Der Test auf Spezifität wurde akzeptiert, wenn die Auflösung des Analyten zu den nächstgelegenen Peaks ≥ 1 betrug.

Formel 1 Formel für die Berechnung der Auflösung R_s ; $t_{R2}/t_{R1} \triangleq$ Retentionszeiten, w_{h1}/w_{h2} Peakbreiten in halber Höhe, wobei $t_{R2} \geq t_{R1}$ (Rücker et al., 2013).

$$R_s = 1,18 * \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h2} + w_{h1}}$$

Kalibrierung

Messbereich (Range)

Um den Messbereich für die Kalibrierung festzulegen, wurde zunächst authentisches Drogenmaterial nach den Vorgaben (Tabelle 22 und 23) extrahiert und zusammen mit Verdünnungen der Referenzsubstanz des Analyten chromatographiert. Unter der Annahme, dass sich das Detektorsignal und die injizierte Proben-/bzw. Extraktmenge proportional verhalten wurde eine Kalibriergerade aufgestellt. Der Mittelwert der Detektorsignale aller Proben wurde als ungefähre Mitte des Messbereiches festgelegt. Die obere und untere Grenze des Kalibrierbereiches wurde so festgelegt, dass alle Proben innerhalb dieses Bereiches lagen. Die Kalibrierlösungen wurden möglichst so gewählt, dass sie äquidistant über den Kalibrierbereich verteilt waren.

Kalibrierfunktion

Nach Durchführung des Experimentes „Messbereich/Range“ wurde aus jeweils zwei getrennt voneinander eingewogenen Mengen Referenzsubstanz eine Stammlösung hergestellt, aus denen wiederum durch jeweils unabhängige und dreimalige Wiederholung eine Verdünnungsreihe mit den Kalibrierlösungen hergestellt wurde. Somit konnte jeder Kalibrierpunkt sechsmal (in Duplikaten) vermessen werden.

a) Lineare Regression

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden die gemessenen Werte [AUC] gegen die Konzentrationen [mg/ml] der eingesetzten Kalibrierlösungen aufgetragen. Es wurde daraus eine Gerade berechnet, die dem Prinzip der niedrigsten Summe aller Fehlerquadrate der Messwerte in y-Richtung folgte. Die Kalibriergerade der linearen Regression wurde durch folgende Geradengleichung (Formel 2) beschrieben.

Formel 2 Formel zur Erstellung einer Geradengleichung; $y \triangleq$ Messwert oder abhängige Größe, $x \triangleq$ Konzentration der Referenzsubstanz oder unabhängige Größe, $m \triangleq$ Steigung der Geraden, $b \triangleq$ Ordinatenabschnitt (Gottwald, 2000).

$$y = m * x + b$$

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden die Parameter m und b nach den Formeln 3-7 berechnet.

Scrophulariae radix (*Scrophularia ningpoensis* HEMSL.)

Formel 3 Formel zur Berechnung der Steigung m ; $x_i \triangleq$ Konzentrationswerte, $y_i \triangleq$ Signalwert, $N \triangleq$ Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

Die Werte im Zähler und Nenner können zu den entsprechenden Quadratsummen Q_{xy} und Q_{xx} zusammengefasst werden.

Für die Berechnung der Quadratsummen Q_{yy} wurde der Wert entsprechend Formel 4 berechnet.

Formel 4 Formel zur Berechnung der Quadratsummen Q_{yy} ; $y_i \triangleq$ Signalwert, $N \triangleq$ Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

Zur Berechnung des Ordinatenabschnittes b diente Formel 5.

Formel 5 Formel zur Berechnung des Ordinatenabschnittes; $\bar{y} \triangleq$ Arbeitsbereichsmittle der abhängigen Größe, $\bar{x} \triangleq$ Arbeitsbereichsmittle der unabhängigen Größe, $m \triangleq$ Steigung der Kalibriergeraden (Gottwald, 2000).

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

Die in Formel 5 enthaltenen Mittelwerte \bar{y} und \bar{x} entsprachen den jeweiligen Arbeitsbereichsmitteln in Signal- und Konzentrationsrichtung und wurden nach den Formeln 6 und 7 berechnet.

Formel 6 Formel zur Berechnung der Arbeitsbereichsmittle \bar{x} (Konzentration der Referenzlösungen); $x_i \triangleq$ Konzentrationswerte, $N \triangleq$ Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

Formel 7 Formel zur Berechnung der Arbeitsbereichsmittle \bar{y} (Messwerte [AUC]); $y_i \triangleq$ Signalwert (Absorption), $N \triangleq$ Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

Die Reststandardabweichung s_y ist ein Ausdruck der Präzision der linearen Regression und zeigt die Streuung der Signalwerte in y -Richtung. Die Berechnung erfolgte nach Formel 8.

Formel 8 Formel zur Berechnung der Reststandardabweichung s_y ; $y_i \triangleq$ Signalwert (Absorption), $x_i \triangleq$ Konzentrationswert, $m \triangleq$ Steigung der Ausgleichsgeraden, $b \triangleq$ Ordinatenabschnitte, $N \triangleq$ Anzahl der Kalibrierlösungen (Gottwald, 2000).

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

Die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} setzt sich zusammen aus der Reststandardabweichung s_y , als ein Maß für die Präzision der berechneten Kalibriergerade an die Messwerte und der Empfindlichkeit E , die in der Steigung der Geraden m wiedergegeben wird, die Berechnung erfolgte nach Formel 9.

Formel 9 Formel zur Berechnung der Verfahrensstandardabweichung s_{x0} ; $s_y \triangleq$ Reststandardabweichung, $m \triangleq$ Steigung der Geraden (Gottwald, 2000).

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

Zur Berechnung der relativen Verfahrensstandardabweichung V_{x0} , wurde die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} prozentual auf die Konzentrationsbereichsmittle \bar{x} bezogen (vgl. Formel 10).

Formel 10 Formel zur Berechnung der relativen Verfahrensstandardabweichung V_{x0} ; s_{x0} Verfahrensstandardabweichung, \bar{x} Arbeitsbereichsmittle (Gottwald, 2000).

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

b) Quadratische Regression

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden die gemessenen Werte [AUC] gegen die Konzentrationen [mg/ml] der eingesetzten Kalibrierlösungen aufgetragen. Es wurde daraus eine polynomische Funktion berechnet, die dem Prinzip der niedrigsten Summe aller Fehlerquadrate der Messwerte in y-Richtung folgte. Die Kalibrierfunktion der polynomischen Regression wurde durch folgende Gleichung beschrieben.

Formel 11 Allgemeine Formel der polynomischen Funktion; $y \triangleq$ Messwert oder abhängige Größe, $x \triangleq$ Konzentration der Referenzsubstanz oder unabhängige Größe, $m \triangleq$ linearer Teil der Funktionsgleichung, $b \triangleq$ konstanter Teil der Funktionsgleichung (Gottwald, 2000).

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

Um die quadratische Regressionsgleichung zu erstellen, wurden die Parameter n , m und b nach den Formeln 12-19 berechnet.

Scrophulariae radix (*Scrophularia ningpoensis* HEMSL.)

Formel 12 Formel zur Berechnung von Q_{xx} für die quadratische Regression; x_i \triangleq Konzentrationswert, N \triangleq Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

Formel 13 Formel zur Berechnung von Q_{xy} für die quadratische Regression; x_i \triangleq Konzentrationswert, y_i \triangleq Signalwert, N \triangleq Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

Formel 14 Formel zur Berechnung von Q_{x^3} für die quadratische Regression; x_i \triangleq Konzentrationswert, N \triangleq Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

Formel 15 Formel zur Berechnung von Q_{x^4} für die quadratische Regression; x_i \triangleq Konzentrationswert, N \triangleq Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

Formel 16 Formel zur Berechnung von Q_{x^2y} für die quadratische Regression; x_i \triangleq Konzentrationswert, y_i \triangleq Signalwert, N \triangleq Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

Die quadratische Steigung n wurde nach Formel 17 berechnet.

Formel 17 Formel zur Berechnung der quadratischen Steigung n (Gottwald, 2000).

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

Der Parameter m , als linearer Faktor der Gleichung für die quadratische Regression bezeichnet, wurde nach Formel 18 berechnet.

Formel 18 Formel zur Berechnung des Parameters m (Gottwald, 2000).

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

Um den konstanten Teil b zu berechnen, wurde Formel 19 verwendet.

Kapitel 3

Formel 19 Formel zur Berechnung des Parameters b ; $x_i \triangleq$ Konzentrationswert, $N \triangleq$ Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

In Formel 20 ist die Berechnung der Reststandardabweichung s_y für die quadratische Regression dargestellt.

Formel 20 Formel zur Berechnung der Reststandardabweichung s_y ; $x_i \triangleq$ Konzentrationswert, $y_i \triangleq$ Signalwert, $N \triangleq$ Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

Um die Empfindlichkeit E der quadratischen Regression zu ermitteln, wurde die Tangentensteigung an die quadratische Regression nach Formel 21 berechnet.

Formel 21 Formel zur Berechnung der Empfindlichkeit E der quadratischen Regression (Gottwald, 2000).

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

Formel 22 zeigt die Berechnung der Verfahrensstandardabweichung s_{x0} mit Hilfe der Reststandardabweichung s_y und der Empfindlichkeit E .

Formel 22 Berechnung der Verfahrensstandardabweichung s_{x0} ;

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

Zur Überprüfung der Linearität, wurde bei einer kleineren relativen Verfahrensstandardabweichung der quadratischen Regression im Gegensatz zur relativen Verfahrensstandardabweichung der linearen Regression der Anpassungstest nach Mandel durchgeführt (Gottwald, 2000; Kromidas, 2011). Nach Formel 23 wurde die Varianzdifferenz Δs_y^2 mit Hilfe der Reststandardabweichungen der beiden Anpassungen ($L \triangleq$ linear, $Q \triangleq$ quadratisch) berechnet.

Formel 23 Formel zur Berechnung der Varianzdifferenz Δs_y^2 für den Anpassungstest nach Mandel; $s_{yL}^2 \triangleq$ Reststandardabweichung der linearen Anpassung, $s_{yQ}^2 \triangleq$ Reststandardabweichung der quadratischen Anpassung, $N \triangleq$ Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

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

Die Nullhypothese H_0 lautet in diesem Fall, dass mit einer 99%igen ($p=99\%$) Wahrscheinlichkeit keine Varianzeninhomogenitäten der beiden Reststandardabweichungen

vorliegen und die Unterschiede nur zufälliger Natur sind. Als Alternativhypothese wurde angenommen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Reststandardabweichungen vorliegt. Zur Beurteilung des Testes wurde weiterhin die Prüfgröße (PG) nach Formel 24 berechnet.

Formel 24 Formel zur Berechnung der Prüfgröße (PG) für den Anpassungstest nach Mandel; Varianzendifferenz Δs_y^2 , $s_{yQ}^2 \triangleq$ Reststandardabweichung der quadratischen Anpassung (Gottwald, 2000).

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

Um die Prüfgröße mit dem F -Wert aus der F -Tabelle vergleichen zu können, wurden die beiden Freiheitsgrade f_1 und f_2 nach den Formeln 26 und 27 berechnet.

Formel 25 Formel zur Berechnung der Differenz der Freiheitsgrade für den Anpassungstest nach Mandel; $N \triangleq$ Anzahl der Messwerte (Gottwald, 2000).

$$\Delta f = (N - 2) - (N - 3)$$

Formel 26 Varianzendifferenz dargestellt durch den Wert des Freiheitsgrades f_1 (Gottwald, 2000).

$$f_1 = \Delta f$$

Formel 27 Berechnung des Freiheitsgrades f_2 (Gottwald, 2000).

$$f_2 = N - 3$$

Mit Hilfe der beiden Freiheitsgrade f_1 und f_2 wurde der Tabellenwert aus der F -Tabelle ($p=99\%$) abgelesen und mit der Prüfgröße verglichen. War die Prüfgröße PG größer als der tabellierte F -Wert konnte von einem signifikanten Unterschied der beiden Verfahrensstandardabweichungen ausgegangen werden, die Nullhypothese H_0 war zu verwerfen, die Alternativhypothese wurde angenommen und somit war die quadratische Regression der linearen vorzuziehen. Im entgegengesetzten Fall, wenn die Prüfgröße PG kleiner war als der tabellierte F -Wert ($p=99\%$, f_1 , f_2), konnte die Nullhypothese H_0 angenommen werden, es bestand somit kein signifikanter Unterschied der beiden Verfahrensstandardabweichungen und die lineare Regression konnte verwendet werden.

Mit Hilfe von Formel 28 konnte das Bestimmtheitsmaß r^2 berechnet werden.

Formel 28 Formel zur Berechnung des Bestimmtheitsmaßes r^2 (Gottwald, 2000).

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

Wiederholpräzision

Zur Durchführung des Versuches Wiederholpräzision wurde die Extraktion und Chromatographie (3.2.3.2.1, Tabelle 22) einer Probe authentischem Drogenmaterials je sechsmal unabhängig voneinander an einem Tag durchgeführt. Nach Auswertung der Ergebnisse durfte der Variationskoeffizient V_K (Formel 29) nicht größer als 5% sein.

Formel 29 Formel zur Berechnung des Variationskoeffizienten V_K (Kromidas, 2011).

$$V_K = \frac{s}{\bar{x}} * 100\%$$

Laborpräzision

Die Extraktion und Chromatographie des Extraktes wurde an sechs verschiedenen Tagen wiederholt. Nach rechnerischer Auswertung des Versuches durfte der Variationskoeffizient V_K nicht größer als 5% sein.

Probenauswertung

Um die Konzentration(en) der Markersubstanz(en) in den Extrakten zu berechnen wurde die Kalibrierfunktion (Formel 2 für die lineare Regression und Formel 11 für die quadratische Regression) nach x umgestellt und die gemessenen Absorptionen eingesetzt (Formeln 30 und 31).

Formel 30 Formel zur Berechnung der Konzentration \hat{x} des Analyten in der Probe nach linearer Anpassung.

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

Formel 31 Formel zur Berechnung der Konzentration \hat{x} des Analyten in der Probe nach quadratischer Anpassung.

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

Nach Berechnung der Konzentration x des Analyten in der Probe konnte der prozentuale Gehalt, nach Formel 32, berechnet werden.

Formel 32 Formel zur Berechnung des prozentualen Gehaltes des Analyten im Extrakt; $\hat{x} \triangleq$ Konzentration des Analyten berechnet nach Formel 30 oder 31.

$$G [\%] = \frac{\hat{x} \left[\frac{mg}{ml} \right] * \text{Extraktionsvolumen [ml]} * 100}{1000 * \text{Einwaage [g]}}$$

Prognoseintervall

Mit Hilfe der Berechnung des Prognoseintervalls, lässt sich der „tatsächliche“ Wert x für die Konzentration des Analyten mit einer gewissen statistischen Sicherheit abschätzen. Diese Berechnung ist notwendig, denn der „geschätzte“ Wert berechnet aus der Kalibriergeraden ist mit einem Gesamtfehler behaftet, der sich einerseits aus der Summe der Fehler durch die Messung und den Fehlern, die bei der Kalibrierung (Reststandardabweichung s_y) gemacht werden, zusammensetzt. Dem Fehlerfortpflanzungsgesetz folgend, wird deutlich, dass die „wahre“ Gerade zwischen zwei Hyperbeln liegt, die nach Formel 33 berechnet werden, so ergeben sich folglich drei Konzentrationswerte (\hat{x}_u , \hat{x} und \hat{x}_o) für den gemessenen \hat{y} Wert der Probe. Hierbei stellen \hat{x}_u und \hat{x}_o jeweils die unteren und oberen Grenzwerte durch den Schnittpunkt mit dem oberen bzw. unteren Prognoseband dar und \hat{x} steht für die Konzentration des Analyten in der Probelösung durch Berechnung mit der Kalibriergeraden.

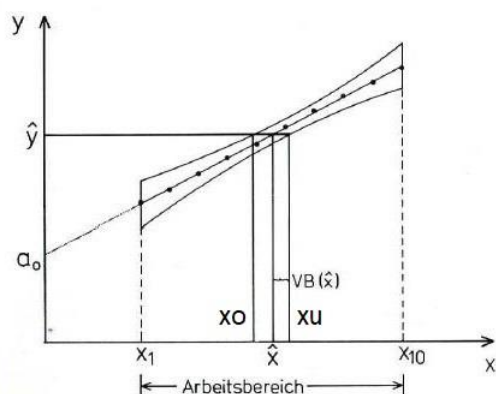


Abbildung 8 Kalibriergerade (x_1 - x_{10}) und zugehörige Hyperbeln; VB=Vertrauensbereich, x_o = oberer Grenzwert, x_u = unterer Grenzwert, \hat{x} ≙ Konzentration des Analyten in der Probelösung durch Berechnung mit der Kalibriergeraden, \hat{y} = gemessener Wert für die Probe, Graphik nach (Funk, **1985**) mit geringfügigen Modifikationen.

Formel 33 Formel zur Berechnung der Hyperbeln $y_{u,o}$; m ≙ Steigung der Geraden, x ≙ unabhängige Größe, b ≙ Ordinatenabschnitt, s_y ≙ Reststandardabweichung, t ≙ t-Faktor der zweiseitigen Tabelle ($f=N-2$, $p=95\%$), N ≙ Anzahl der Kalibrierlösungen, \bar{N} ≙ Anzahl der Parallelbestimmungen, Q_{xx} ≙ Quadratsumme (Gottwald, **2000**).

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

Demnach ergab sich daraus ein sogenannter Vertrauensbereich (VB) nach den Formeln 34-35, in welchem sich mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 95% der „wahre“ Analysenwert befindet.

Formel 34 Formel zur Darstellung des Vertrauensbereiches (VB); x_u und x_o ≙ unteren und oberen Grenzwerten durch den Schnittpunkt mit dem oberen bzw. unteren Prognoseband, \hat{x} ≙ Konzentration des Analyten in der Probelösung durch Berechnung mit der Kalibriergeraden (Gottwald, **2000**).

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

Formel 35 Formel für das Intervall, in dem sich der „wahre“ Analysenwert befindet; \hat{x} \triangleq Konzentration des Analyten in der Probelösung durch Berechnung mit der Kalibriergeraden, VB \triangleq Vertrauensbereich (Gottwald, 2000).

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

Nach Formel 36 konnten die Werte für den Bereich von \hat{x}_u nach \hat{x}_o berechnet werden.

Formel 36 Formel zur Berechnung von \hat{x}_u und \hat{x}_o ; b \triangleq Ordinatenabschnitt, m \triangleq Steigung der Geraden, s_y \triangleq Reststandardabweichung, t \triangleq t-Faktor der zweiseitigen Tabelle (f=N-2, p=95%), N \triangleq Anzahl der Kalibrierlösungen, \hat{N} \triangleq Anzahl der Parallelbestimmungen, \hat{y} \triangleq Signalwert der Probe, \bar{y} \triangleq Arbeitsbereichsmittle, Q_{xx} \triangleq Quadratsumme (Gottwald, 2000).

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

Robustheit

Im Versuch der Robustheit wurde die Methode durch Modifikationen in der Extraktion und/oder Chromatographie auf ihre Belastbarkeit überprüft.

Zur Auswertung der Versuche wurden die Variationskoeffizienten V_K (nach Formel 29) der Ergebnisse ermittelt und eine statistische Auswertung mittels SPSS Statistics 25 Software (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurden die Daten einer Varianzhomogenitätsanalyse (Levene Statistik) unterzogen. Lag der Wert für die Signifikanz über 0,05, so waren die Varianzen homogen und es konnte eine einfaktorielle ANOVA gefolgt von einem Bonferroni Post-Hoc Test durchgeführt werden. Lag der Signifikanz-Wert für die Levene Statistik unter 0,05 so waren die Varianzen inhomogen und es wurde weiterhin per Kruskal-Wallis-Test (> zwei Gruppen werden verglichen) oder Mann-Whitney-Test (2 Gruppen werden verglichen) die Signifikanz (Signifikanzlevel: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) untersucht.

Wiederfindungsrate

Eine definierte Menge an Analyt wurde sechsmal unabhängig voneinander der pulverisierten Droge zugesetzt und die Aufarbeitung nach festgelegten Methoden durchgeführt. Um die Wiederfindungsrate zu berechnen, wurde die im Extrakt gemessene Konzentration (c_G) mit der errechneten Konzentration (c_E) in Relation gesetzt und durch Multiplikation mit 100 in Prozent ausgedrückt (Formel 37). Die errechnete Konzentration ergab sich aus dem für „richtig“ angenommenen Wert (aus Labor- oder Wiederholpräzision) und der rechnerischen Addition der zugesetzten Menge an Analyten. Der Test wurde akzeptiert, wenn sich die Wiederfindungsrate in einem Bereich von 90-110% befand.

Formel 37 Formel zur Berechnung der Wiederfindungsrate [%]; $c_G \triangleq$ gefundene Konzentration, $c_E \triangleq$ errechnete Konzentration (in Anlehnung an (Kromidas, 2011; Rucker et al., 2013)).

$$\text{Wiederfindungsrate [\%]} = \frac{c_G}{c_E} * 100\%$$

Nachweisgrenze

Die Berechnung der Nachweisgrenze (LOD = Limit of detection, DL = detection limit) erfolgte nach Formel 38.

Formel 38 Formel zur Berechnung der Nachweisgrenze (LOD = Limit of detection, DL = detection limit); $m \triangleq$ Steigung der Kalibriergeraden, $s_y \triangleq$ Reststandardabweichung der Kalibriergeraden (International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005).

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

Quantifizierungsgrenze

Zur Berechnung der Quantifizierungsgrenze (LOQ = Limit of quantification, QL = quantification limit) wurde Formel 39 verwendet.

Formel 39 Formel zur Berechnung der Quantifizierungsgrenze (LOQ = Limit of quantification, QL = quantification limit); $m \triangleq$ Steigung der Kalibriergeraden, $s_y \triangleq$ Reststandardabweichung der Kalibriergeraden (International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005).

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

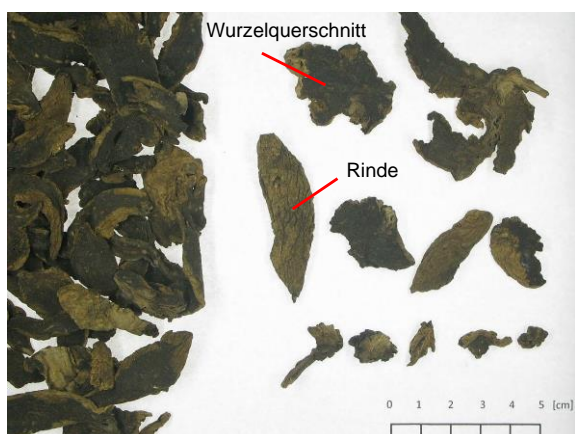
3.3 Ergebnisse und Diskussion zu den analytischen Untersuchungen zu *Scrophulariae radix*

3.3.1 Makroskopische Untersuchung

Die geschnittene Droge zeigte eine hellbraune bis gelblich braune Rinde, die von unregelmäßigen, groben und verhältnismäßig tiefen Längsfurchen gekennzeichnet war. Der Wurzelquerschnitt war dunkelbraun bis schwarz gefärbt. Darin liegt auch der Grund, weswegen die Droge in China als *Xuán Shen*, wörtlich übersetzt „dunkle Wurzel“ (Chinesische Pharmakologie I, **2012**), bezeichnet wird. Die Droge war von sehr harter und schwer brechbarer Konsistenz. Die chinesischen Drogenmuster lagen in Form von Scheiben meist länglicher Form, zwischen 1-6 cm lang, 0,5-2 cm breit und 0,1-0,4 cm dick (Abbildung 9, Teilabbildungen A und B) vor. Der Großteil der Importmuster zeigten ein homogenes makroskopisches Erscheinungsbild, mit Ausnahme Muster der Firma Caelo (Abbildung 9, Teilabbildung C), bei der die Wurzelfragmente im Bruch etwas heller erschienen und deren Form eher rundlicher waren, was auf eine andere Methode des Schneidens hinweist.

Die in Deutschland versuchsweise angebaute Ware (Baumannshof, Freising, LfL) zeigte ebenso eine helle, gelbbraune Rinde mit derben Längsfurchen und einem dunkelbraunen, fast schwarzen Wurzelquerschnitt. Die im ChP (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2010**) beschriebenen Querrisse und Nebenwurzelnarben mit kleinen Nebenwurzeln auf der Rinde waren bei deutschem Drogenmaterial besonders gut zu erkennen. Hinsichtlich der Größe und Form unterschieden sich die Muster von chinesischer Ware. Die geschnittenen Wurzelfragmente waren rundlicher Form und im Querschnitt 0,5 bis 2 cm groß. Die Schnittbreite lag durchschnittlich bei 1 cm.

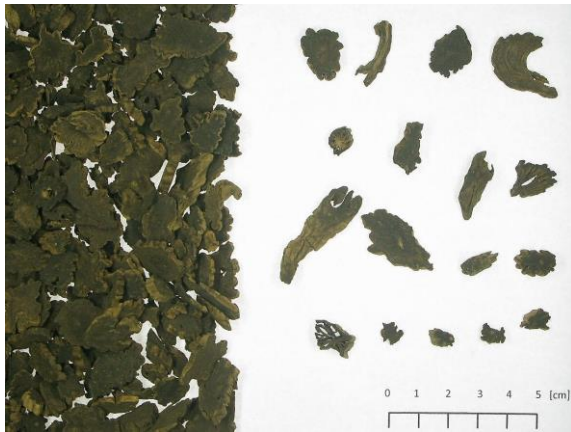
Teilabbildung A



Teilabbildung B



Teilabbildung C



Teilabbildung D



Abbildung 9 *Scrophulariae radix* Handelsmuster unterschiedlicher Anbieter/Importeure. **Teilabbildung A:** Probe Sinophyto, **Teilabbildung B:** Probe Chinamedica, **Teilabbildung C:** Probe Caelo, **Teilabbildung D:** LfL Probe 5.

3.3.2 Mikroskopische Untersuchung

Das pulverisierte und gesiebte (355 μm) Drogenmaterial wurde mit Chloralhydrat-Lösung aufgehellt und vorhandenes Lignin bzw. verholzte Gewebefragmente mit Phloroglucin/HCl-Lösung rötlich angefärbt. Im mittel- bis dunkelbraunen Pulver konnten zahlreiche Steinzellen, sowohl einzeln (Abbildung 10, Teilabbildung A), wie auch in Gruppen zu mehreren (Abbildung 10, Teilabbildung B) angeordnet, erkannt werden. Ihre Form war sehr inhomogen und reichte von annähernd quadratisch (Abbildung 10, Teilabbildung C) bis hin zu lang gestreckt, faserförmig (Abbildung 10; Teilabbildung A). Ihre Wanddicke war gleichmäßig und lag zwischen 5-26 μm . Tüpfelkanäle in der Zellwand waren deutlich zu erkennen. Zudem fanden sich zahlreiche Tracheen und Tracheenfragmente im Pulver von *Scrophulariae radix*. Der Durchmesser der Gefäße (Abbildung 10, Teilabbildung D) lag zwischen 14-47 μm . Parenchymatische Gewebeteile (Abbildung 10, Teilabbildung E) mit dunklen Bestandteilen (Abbildung 10, Teilabbildung F), die kleinen Kernen ähneln, prägten ebenfalls das mikroskopische Bild.

Teilabbildung A



Teilabbildung B



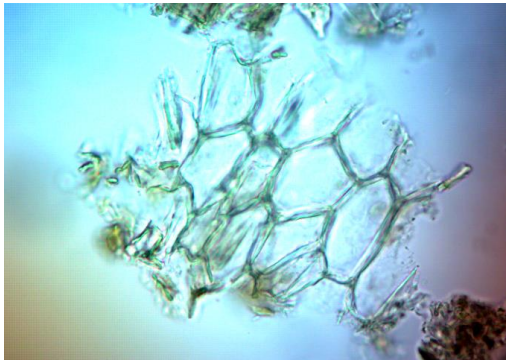
Teilabbildung C



Teilabbildung D



Teilabbildung E



Teilabbildung F



Abbildung 10 Mikroskopische Aufnahmen der Pulverbestandteile (355 µm) von *Scrophulariae radix*. **Teilabbildung A:** Steinzelle (200-fache Vergrößerung, Chloralhydrat - Präparat), **Teilabbildung B:** Gruppe aus Steinzellen (200-fache Vergrößerung, Chloralhydrat - Präparat), **Teilabbildung C:** quadratische Steinzelle (200-fache Vergrößerung, Phloroglucin/HCl - Präparat), **Teilabbildung D:** Gefäße im parenchymatischen Gewebe (200-fache Vergrößerung, Chloralhydrat-Präparat), **Teilabbildung E:** Parenchymatisches Gewebe (200-fache Vergrößerung, Chloralhydrat-Präparat), **Teilabbildung F:** Parenchymatisches Gewebe mit kernähnlichen Strukturen (200-fache Vergrößerung, Chloralhydrat - Präparat).

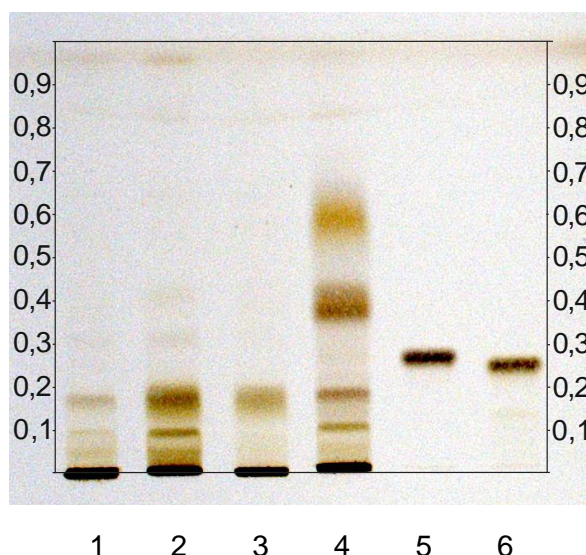
3.3.3 Identifizierung durch Dünnschichtchromatographie

3.3.3.1 Methodenevaluierung und Entwicklung

Um eine chromatographische Identitätsbestimmung für die Monographie von *Scrophulariae radix* für das DAB vorzuschlagen, wurden zunächst verschiedene, in der Literatur vorhandene Monographien bzw. Vorschriften evaluiert und gegebenenfalls modifiziert.

Nach den HKCMMS sollen bei der Identitätsprüfung in der Monographie zu *Scrophulariae radix* auf die beiden Iridoide Harpagid und Harpagosid getestet werden, die nach Entwicklung und Derivatisierung mit ethanolischer Schwefelsäure, sichtbar werden (*Scrophulariae Radix*, 2011).

Teilabbildung A



Teilabbildung B

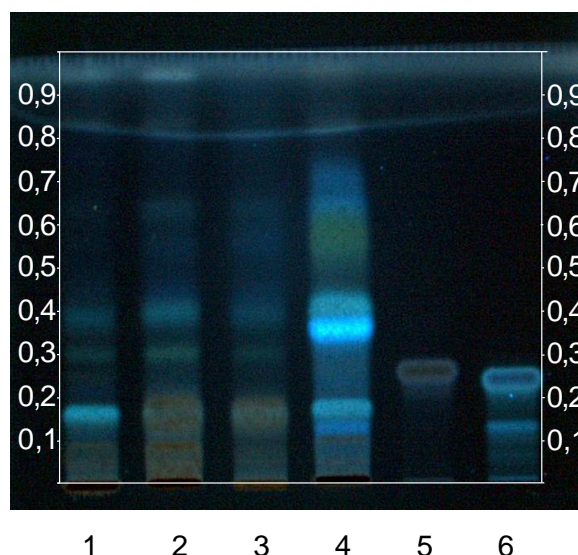


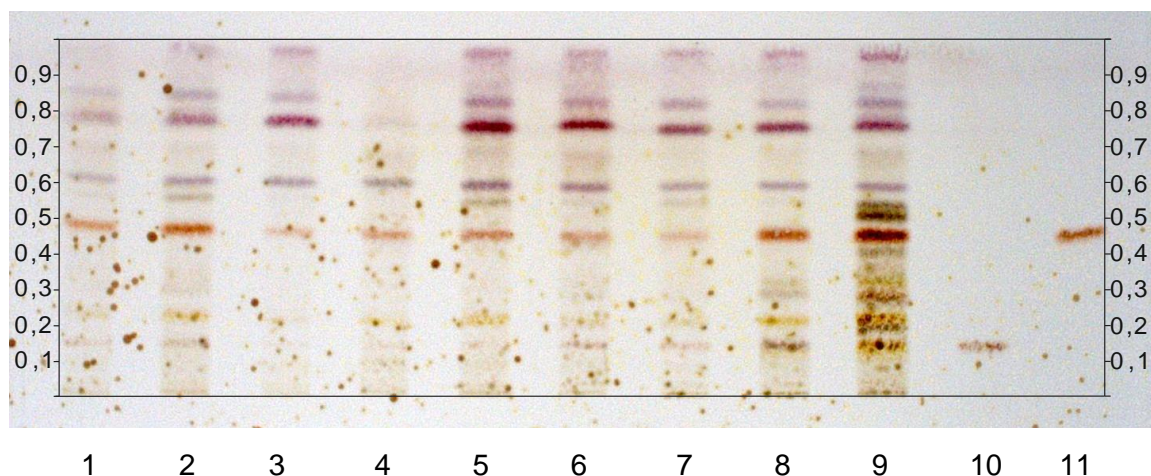
Abbildung 11 DC Fingerprint nach Methode I (HKCMMS, 3.2.1.3.1); Bahn 1: Probe Sinopyhto (3 µl), Bahn 2: Probe Herbasinica (3 µl), Bahn 3: Probe Herbasinica Trockenextrakt (3 µl), Bahn 4: Harpagophyti radix (3 µl), Bahn 5: Aucubin (1 mg/ml, 3 µl), Bahn 6: Catalpol (1 mg/ml, 3 µl); Entwicklungsstrecke: 8 cm (vom unteren Plattenrand); **Teilabbildung A**: nach Derivatisierung bei Tageslicht, **Teilabbildung B**: nach Derivatisierung bei 366 nm.

Abbildung 11 zeigt den Fingerprint, aufgearbeitet nach der Methode I (HKCMMS). Da zu diesem Zeitpunkt die beiden vorgeschriebenen Markersubstanzen, Harpagid und Harpagosid, noch nicht verfügbar waren, wurden zunächst ersatzweise die ebenfalls in *Scrophulariae radix* enthaltenen Iridoide Aucubin (Qian et al., 1992; Wu et al., 2010) und Catalpol (Cao et al., 2015; Wang et al., 2016) aufgetragen. Wie Abbildung 11, Teilabbildung A und B, zu entnehmen ist, waren beide Iridoide nicht oder in einer nicht mehr detektierbaren Menge enthalten. Der Fingerprint für die beiden Drogenproben von *Scrophulariae radix* (Abbildung 11, Teilabbildung A und B, Bahn 1 und 2) war zudem nicht von klaren und charakteristischer Banden geprägt, weswegen diese Methode nicht weiterverfolgt wurde.

Die Identitätsbestimmungsmethode nach Methode II (ChP) stellte sich als äußerst zeitintensiv und aufwendig in der Durchführung heraus. Zudem ist das Fließmittel durch den Zusatz an Chloroform als toxikologisch bedenklich einzustufen und das Derivatisierungsreagenz (5%iges

Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz) schwer handhabbar. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Analyse. Durch die hohe Viskosität des Vanillin-Schwefelsäure-Reagenzes ist es schwierig, eine gleichmäßige Derivatisierung mithilfe eines Sprühkopfes vorzunehmen, dadurch kam es, wie deutlich zu erkennen ist, zu partiellen Verätzungen (punktuelle braune Verfärbungen, Abbildung 12), was die Auswertbarkeit der Platten deutlich erschwerte.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

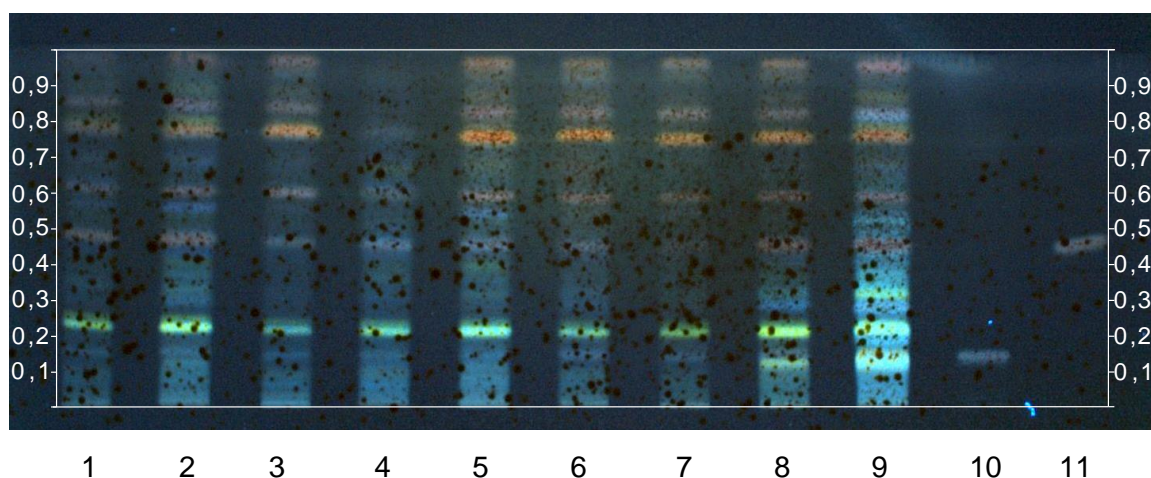
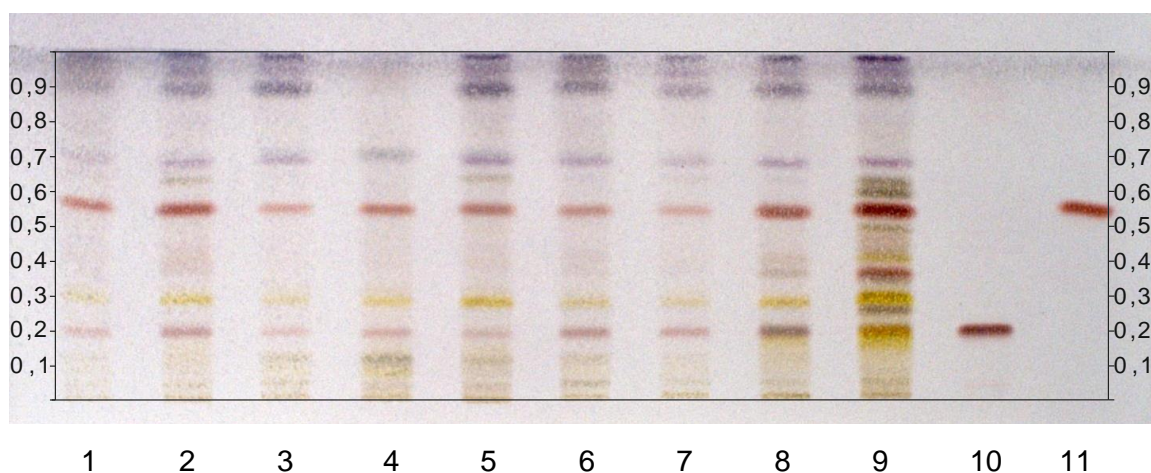


Abbildung 12 DC Fingerprint nach Methode II (ChP, 3.2.1.3.1): Bahn 1: Probe Arobemed (4 µl), Bahn 2: Probe Caelo (4 µl), Bahn 3: Probe Herbasinica (4 µl), Bahn 4: Herbasinica Trockenextrakt (4 µl), Bahn 5: Probe Plantasia 30004 (4 µl), Bahn 6: Probe Yong (4 µl), Bahn 7: Probe Sinophyto (4 µl), Bahn 8: Probe LfL 5 (4 µl), Bahn 9: Probe LfL 10 (4 µl), Bahn 10: Harpagid (1 mg/ml, 2 µl), Bahn 11: Harpagosid (1 mg/ml, 2 µl); Entwicklungsstrecke 8 cm (vom unteren Plattenrand); **Teilabbildung A**: nach Derivatisierung bei Tageslicht, **Teilabbildung B**: nach Derivatisierung bei 366 nm.

Zur Auswertung der Identitätsprüfung im ChP ist als Referenz eine methanolische Harpagosidlösung und eine Referenzdroge („Scrophulariae Radix reference drug“, (Scrophulariae Radix, **2010**)) vorgeschrieben. Harpagosid (Abbildung 12, Teilabbildung A und B, R_f -Wert 0,46) war deutlich in allen Handelsproben zu detektieren. Eine Referenzdroge war nicht zu erwerben und konnte somit nicht aufgetragen und analysiert werden. Um den Fingerprint besser auswerten zu können, wurden die gleichen Proben erneut aufgetragen, entwickelt, aber mit einem alternativen Derivatisierungsreagenz behandelt. In Anlehnung an die Monographie von Scrophulariae radix in (Wagner et al., **2011**) wurde das Vanillin-

Schwefelsäure-Reagenz verwendet, bestehend aus einer 1%igen ethanolischen Vanillin-Lösung und einer 10%igen ethanolischen Schwefelsäure-Lösung. Abbildung 13 zeigt das korrespondierende HPTLC-Fingerprint-Chromatogramm mit verschiedenen Handelsmustern aus China und dem Anbau aus Deutschland sowie den beiden Iridoiden Harpagid und Harpagosid. Harpagid (Abbildung 13, Teilabbildung A und B, R_f -Wert 0,20) war in allen Handelsproben erkennbar, jedoch deutlich schwächer vertreten als Harpagosid (Abbildung 13, Teilabbildung A und B, R_f -Wert 0,55). Trotz der positiven Ergebnisse überwogen die Nachteile aufgrund der toxischen (Chloroform) Fließmittelzusammensetzung (International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, **2016**), die Handhabung des Derivatisierungsreagenzes und die langen Analysenzeiten.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

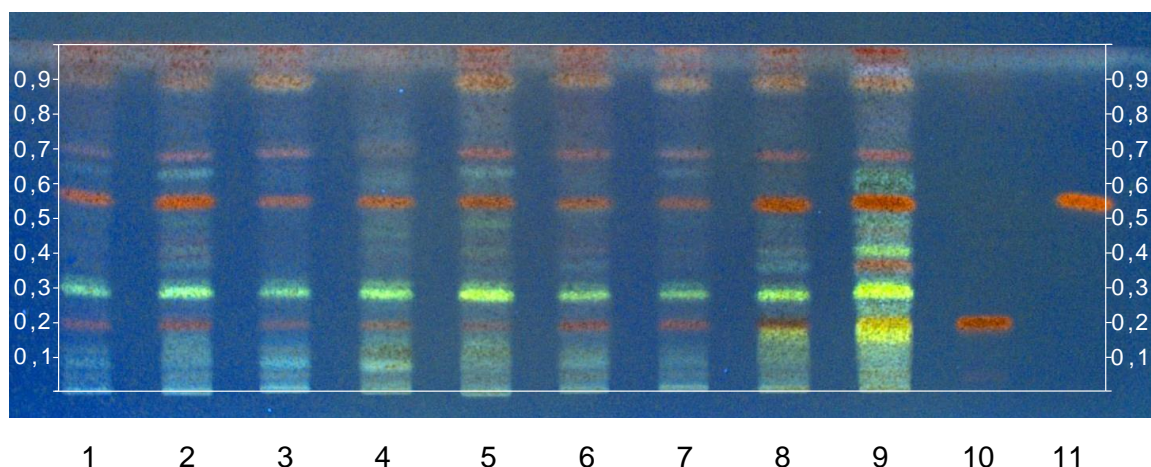


Abbildung 13 HPTLC Fingerprint nach Aufarbeitung Methode II (ChP, 3.2.1.3.1), Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (Wagner et al., **2011**): Bahn 1: Probe Arobemed (4 μ l), Bahn 2: Probe Caelo (4 μ l), Bahn 3: Probe Herbasinica (4 μ l), Bahn 4: Herbasinica Trockenextrakt (4 μ l), Bahn 5: Probe Plantasia 30004 (4 μ l), Bahn 6: Probe Yong (4 μ l), Bahn 7: Probe Sinophyto (4 μ l), Bahn 8: Probe LfL 5 (4 μ l), Bahn 9: Probe LfL 10 (4 μ l), Bahn 10: Harpagid (1 mg/ml, 2 μ l), Bahn 11: Harpagosid (1 mg/ml, 2 μ l); Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); **Teilabbildung A**: nach Derivatisierung bei Tageslicht, **Teilabbildung B**: nach Derivatisierung bei 366 nm.

Um die Methode nach (Wagner et al., **2011**) zu beurteilen, wurden erneut verschiedene Drogenmuster extrahiert und nach entsprechender Monographie chromatographiert. Als Referenzlösungen werden sechs verschiedene Marker gefordert: Harpagosid, Aucubin, Escin,

Acteosid, Angorosid C und Catalpol, je in einer Lösung von 1 mg/ml (Methanol). Wie in Abbildung 14 dargestellt, wurden bei durchgeführter Analyse die Referenzsubstanzen etwas modifiziert und als Harpagid (Bahn 6, R_f 0,18), Harpagosid (Bahn 7, R_f 0,45), Aucubin (Bahn 8, R_f 0,24), Catalpol (Bahn 9, R_f 0,23), Escin (Bahn 10, R_f 0,07) und Verbascosid (Bahn 11, R_f 0,51) in einer Konzentration von 1 mg/ml (Methanol) aufgetragen und chromatographiert. Die beiden Iridoide Catalpol und Aucubin waren erneut in keiner der Proben zu detektieren, wohingegen Harpagid und Harpagosid mehr oder weniger intensiv in allen Extrakten nachgewiesen werden konnten.

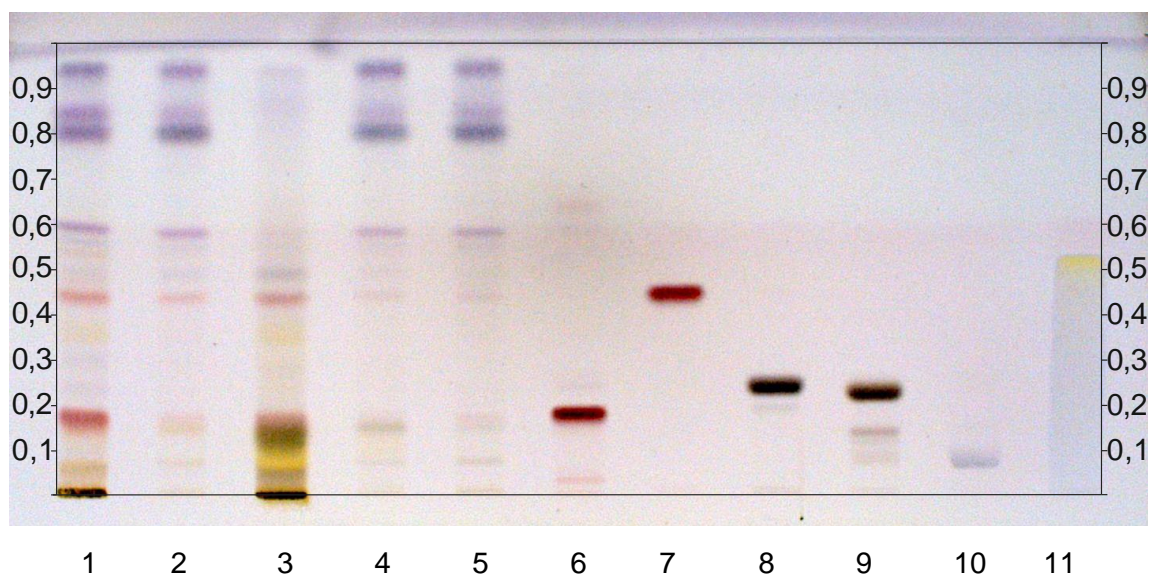


Abbildung 14 TLC Fingerprint nach Aufarbeitung Methode III (Wagner, 3.2.1.3.1): Bahn 1: Probe Sinophyto (6 μ l), Bahn 2: Probe Herbasinica (6 μ l), Bahn 3: Probe Herbasinica Trockenextrakt (6 μ l), Bahn 4: Probe Chinamedica (6 μ l), Bahn 5: Probe Yong (6 μ l), Bahn 6: Harpagid (1 mg/ml, 6 μ l), Bahn 7: Harpagosid (1 mg/ml, 6 μ l), Bahn 8: Aucubin (1 mg/ml, 6 μ l), Bahn 9: Catalpol (1 mg/ml, 6 μ l), Bahn 10: Escin (1 mg/ml, 6 μ l), Bahn 11: Verbascosid (1 mg/ml, 6 μ l); Entwicklungsstrecke 9 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung bei Tageslicht.

Die vorgestellte Methode nach (Wagner et al., **2011**) bietet entscheidende Vorteile gegenüber der Methode aus dem ChP (*Scrophulariae Radix*, **2010**). Die Extraktion ist wesentlich zeitsparender, das verwendete Fließmittel Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V) weniger toxisch und zudem ein typisches Fließmittel für Bitterstoffdrogen mit terpenoiden Strukturen (Wagner et al., **1983**), wie es zum Beispiel auch bei der Identitätsbestimmungsmethode in der Monographie für Teufelskrallenwurzel im Ph.Eur. verwendet wird (Teufelskrallenwurzel, **2017**). Die Derivatisierung mit zwei getrennten Reagenzien und unter Verzicht auf konzentrierte Schwefelsäure ist ebenfalls deutlich unproblematischer und führte zu besseren Ergebnissen. Nach geringfügiger Optimierung, wie eine erhöhte Extraktionsmenge, eine verkürzte Entwicklungsstrecke und eine verkürzte Erwärmungszeit der HPTLC-Platte nach der Derivatisierung, an Methode III, dargestellt in Abbildung 15, konnte die HPTLC-Fingerprint-Methode (Methode IV) validiert werden.

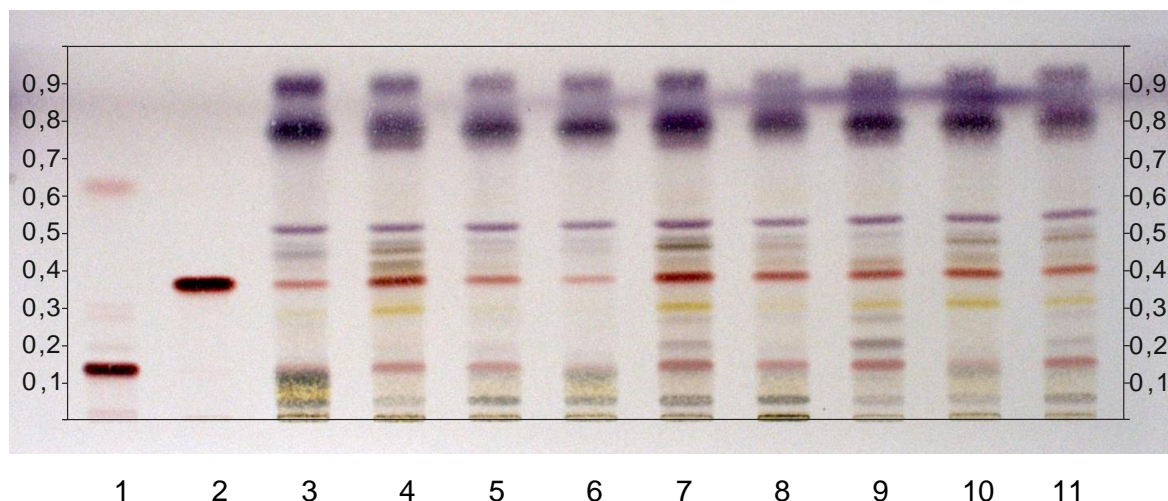


Abbildung 15 HPTLC Fingerprint nach Aufarbeitung Methode IV (3.2.1.3.1): Bahn 1: Harpagid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 2: Harpagosid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 3: Probe Chinamedica (10 µl), Bahn 4: Probe Sinophyto (10 µl), Bahn 5: Probe Yong (10 µl), Bahn 6: Probe Herbasinica (10 µl), Bahn 7: Probe Caelo (10 µl), Bahn 8: Probe Arobemed (10 µl), Bahn 9: Probe LfL 5 (10 µl), Bahn 10: Probe Plantasia 780004 (10 µl), Bahn 11: Probe Chongqing; Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

3.3.3.2 Methodvalidierung

Um die Eignung der Methode IV (3.2.1.3.1) zur Identitätsbestimmung von *Scrophulariae radix* zu überprüfen, wurde die Methode in Anlehnung an das unter 3.2.1.3.2.1 und 3.2.1.3.2.2 vorgestellte Validierungsprotokoll validiert.

Zur Überprüfung der Stabilität während der Chromatographie wurde eine authentische Drogenprobe (Herbasinica) nach Methode IV extrahiert und 3 µl punktförmig auf den rechten unteren Plattenrand (10 mm von jeder Ecke entfernt) auf eine HPTLC-Platte (10x10 cm) aufgetragen. Nach Entwicklung und Trocknung der Platte wurde diese um 90° gedreht und erneut entwickelt, getrocknet und derivatisiert. Da sich alle Zonen auf der Winkelhalbierenden befanden (Abbildung 16) wurde der Extrakt während der Chromatographie als stabil erachtet.

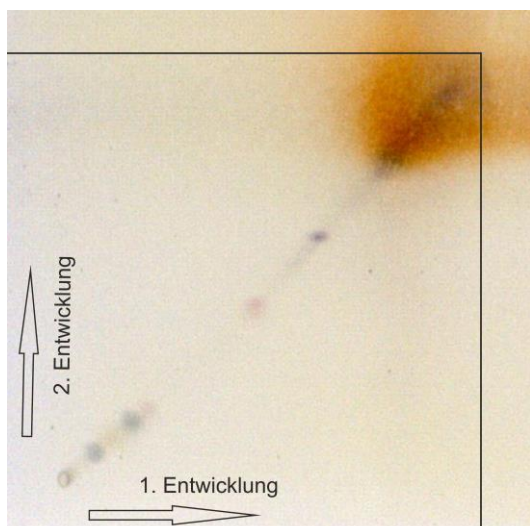


Abbildung 16 **2D-HPTLC-Chromatogramm** von Scrophulariae radix (Probe Herbasinica, 3 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand), nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

Um die Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung zu beurteilen, wurde authentisches Drogenmaterial (Herbasinica) extrahiert, auf eine HPTLC-Platte (10x10 cm) aufgetragen und der Extrakt zusammen mit der Platte, die mit Aluminiumfolie umwickelt wurde (im Exsikkator), für drei Stunden gelagert. Nach drei Stunden wurde neues Drogenmaterial erneut extrahiert und zusammen mit dem in Lösung befindlichen Extrakt aufgetragen, chromatographiert und derivatisiert. Im Vergleich der vier Bahnen (Abbildung 17) ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Intensität, der Farbe und der R_f -Werte der relevanten Banden. Es konnte somit von einer Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung ausgegangen werden.

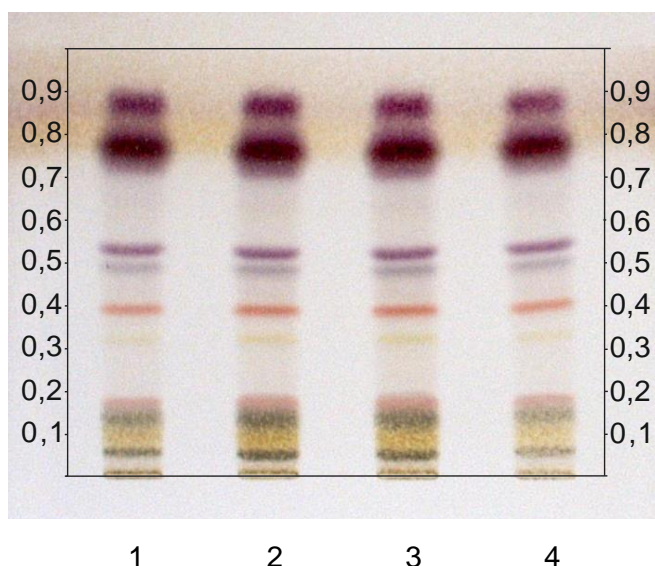


Abbildung 17 HPTLC-Fingerprint zur Überprüfung der **Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung** von Scrophulariae radix (Herbasinica); Bahn 1: Probe Herbasinica drei Stunden vor Chromatographie aufgetragen (10 µl), Bahn 2: Probe Herbasinica frisch vor Chromatographie extrahiert und aufgetragen (10 µl), Bahn 3: Probe Herbasinica frisch vor Chromatographie extrahiert und aufgetragen (10 µl), Bahn 4: Probe Herbasinica drei Stunden in Lösung (10 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand), nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

Zur Überprüfung der Stabilität der Derivatisierung wurden verschiedene Proben chinesischer und deutscher Herkunft extrahiert, chromatographiert und mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz derivatisiert. Die derivatisierte HPTLC-Platte wurde direkt (Abbildung 18), nach 1, 5, 20, 30 und 60 min (Abbildung 19) bei Weißlicht dokumentiert und die Ergebnisse verglichen.

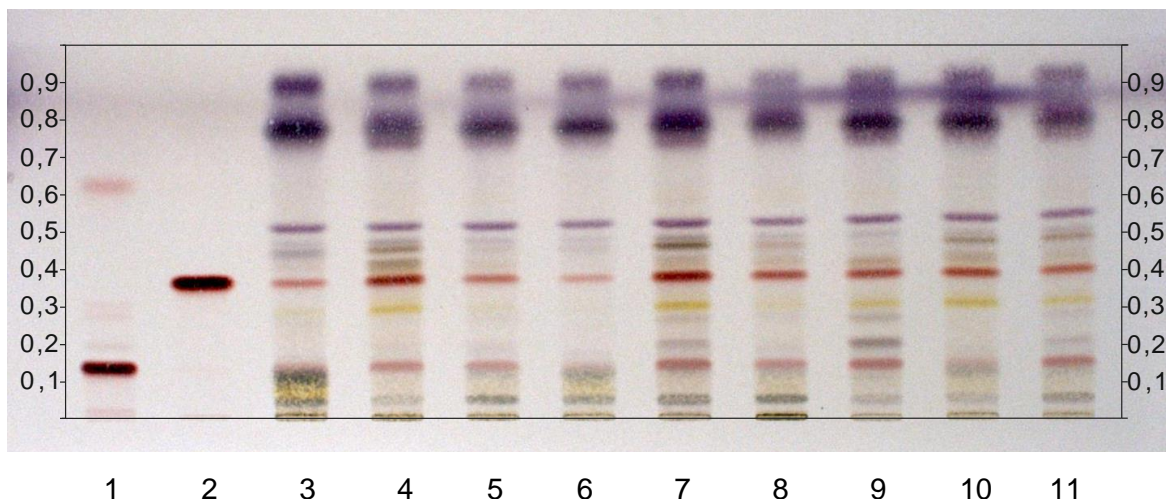


Abbildung 18 **Stabilität der Derivatisierung** unmittelbar nach Derivatisierung; Bahn 1: Harpagid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 2: Harpagosid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 3: Probe Chinamedica (10 µl), Bahn 4: Probe Sinophyto (10 µl), Bahn 5: Probe Yong (10 µl), Bahn 6: Probe Herbasinica (10 µl), Bahn 7: Probe Caelo (10 µl), Bahn 8: Probe Arobemed (10 µl), Bahn 9: Probe LfL 5 (10 µl), Bahn 10: Probe Plantasia 780004 (10 µl), Bahn 11: Probe Chongqing (10 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

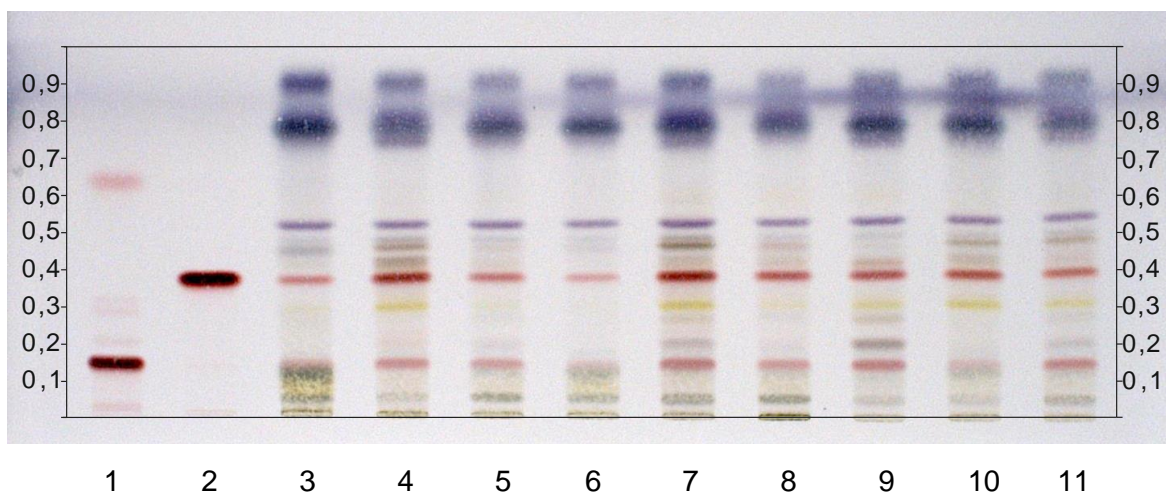


Abbildung 19 **Stabilität der Derivatisierung**, dokumentiert 60 Minuten nach Derivatisierung; Bahn 1: Harpagid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 2: Harpagosid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 3: Probe Chinamedica (10 µl), Bahn 4: Probe Sinophyto (10 µl), Bahn 5: Probe Yong (10 µl), Bahn 6: Probe Herbasinica (10 µl), Bahn 7: Probe Caelo (10 µl), Bahn 8: Probe Arobemed (10 µl), Bahn 9: Probe LfL 5 (10 µl), Bahn 10: Probe Plantasia 780004 (10 µl), Bahn 11: Probe Chongqing (10 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

Innerhalb eines Zeitrahmens von 60 min ergaben sich keine Unterschiede bezüglich Lage, Intensität und Farbe der Zonen des Fingerprint-Chromatogramms. Die Stabilität der Derivatisierung konnte somit belegt werden.

Die Spezifität der Methode wurde evaluiert, indem Extrakte von authentischem *Scrophulariae radix* Drogenmaterials deutscher und chinesischer Herkunft zusammen mit den

Referenzsubstanzen aufgetragen und chromatographiert (Abbildung 20) wurden. Die Banden für Harpagid (Bahn 1, R_f 0,14) und Harpagosid (Bahn 2, R_f 0,35) konnten in allen Drogenmustern mehr oder weniger intensiv detektiert werden. Die verschiedenen Fingerprint Chromatogramme zeigten ein homogenes Bild, Unterschiede ergaben sich lediglich in dem Bereich der Startlinie bis R_f 0,13 und in der gelben Bande bei R_f 0,28 welche z.B. in den Proben Sinophyto (Abbildung 20, Bahn 4) und Caelo (Abbildung 20, Bahn 7) deutlich zu detektieren war, wohingegen sie in den Proben Yong (Abbildung 20, Bahn 5) und Herbasinica (Abbildung 20, Bahn 6) kaum bis gar nicht zu erkennen war. Deutlichere Differenzen im Inhaltstoff-Spektrum ergaben sich im Vergleich der Probe aus deutschem Versuchsanbau mit importierter chinesischer Ware, was vor allem anhand der beiden dunklen Banden R_f 0,19 und R_f 0,25 zu belegen ist.

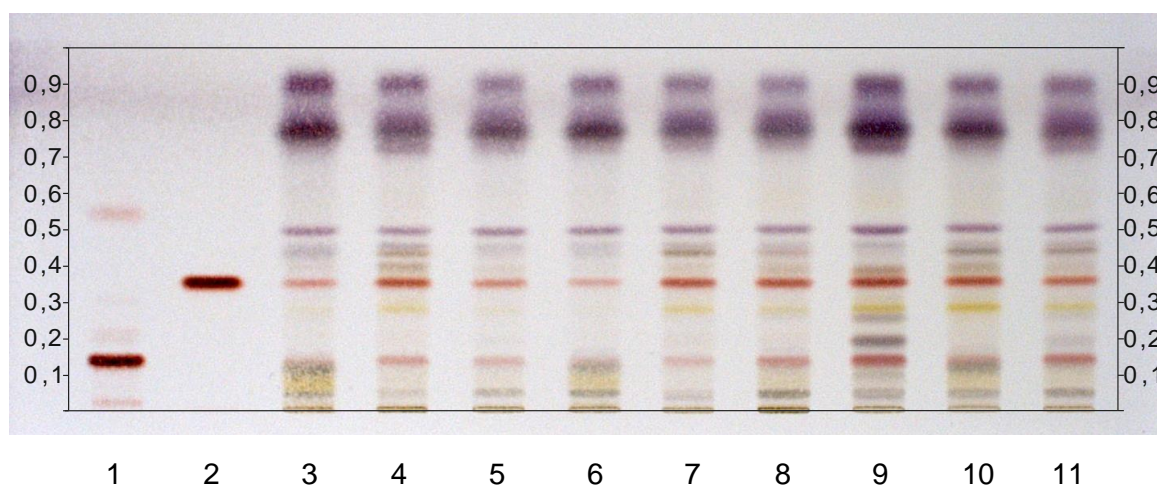


Abbildung 20 HPTLC-Chromatogramm zum Versuch **Spezifität**; Bahn 1: Harpagid (1 mg/ml, 10 μ l), Bahn 2: Harpagosid (1 mg/ml, 10 μ l), Bahn 3: Probe Chinamedica (10 μ l), Bahn 4: Probe Sinophyto (10 μ l), Bahn 5: Probe Yong (10 μ l), Bahn 6: Probe Herbasinica (10 μ l), Bahn 7: Probe Caelo (10 μ l), Bahn 8: Probe Arobemed (10 μ l), Bahn 9: Probe LfL 5 (10 μ l), Bahn 10: Probe Plantasia 780004 (10 μ l), Bahn 11: Probe Chongqing (10 μ l); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

In *Materia Medica* (Bensky et al., **2004**) findet man in der Monographie von *Scrophulariae radix* keine Angaben zu möglichen Verfälschungen, jedoch wird unter der Rubrik „Alternate species & local variants“ auf die verwandte Art *Scrophulariae buergeriana* (*Scrophulariae Radix*, **2004**) verwiesen. Da entsprechendes Drogenmaterial nicht kommerziell erhältlich war, wurden zur Testung auf Verfälschungen, Extrakte der Wurzeldrogen von *Scrophularia nodosa* und *Harpagophytum procumbens* chromatographiert (Abbildung 21).

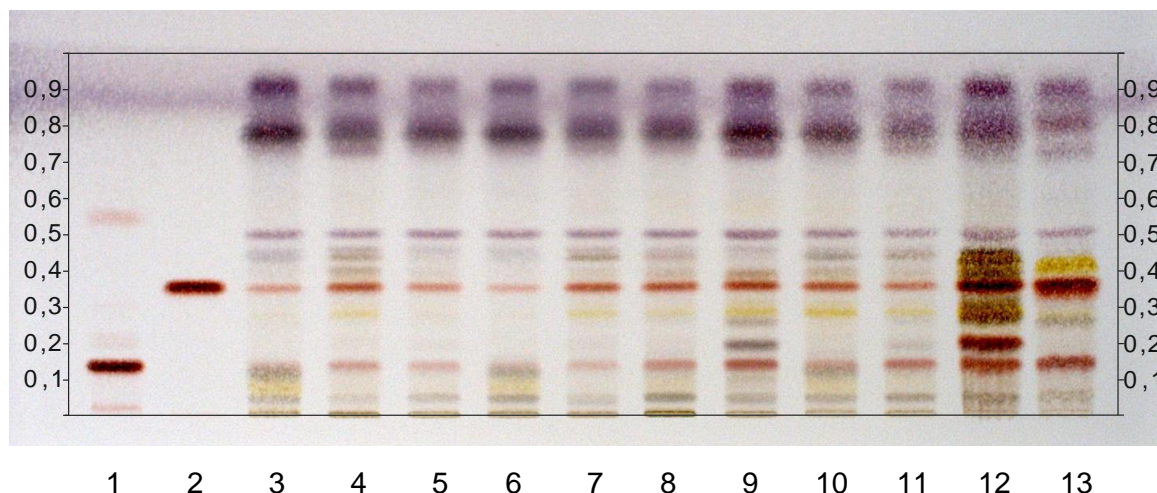


Abbildung 21 HPTLC-Fingerprint zur **Detektion von Verfälschungen**; Bahn 1: Harpagid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 2: Harpagosid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 3: Probe Chinamedica (10 µl), Bahn 4: Probe Sinophyto (10 µl), Bahn 5: Probe Yong (10 µl), Bahn 6: Probe Herbasinica (10 µl), Bahn 7: Probe Caelo (10 µl), Bahn 8: Probe Arobemed (10 µl), Bahn 9: Probe LfL 5 (10 µl), Bahn 10: Probe Plantasia 780004 (10 µl), Bahn 11: Probe Chongqing (10 µl), Bahn 12: Probe LfL 10 (*Scrophularia nodosa*, 10 µl), Bahn 13: Probe Harpagophyti radix Caelo (10 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

Die Fingerprint-Chromatogramme der Muster von *Scrophularia ningpoensis*, *Scrophularia nodosa* und *Harpagophytum procumbens* zeigen partielle Übereinstimmungen, da die beiden Markersubstanzen Harpagid (Abbildung 21, Bahn 1, R_f 0,14) und Harpagosid (Abbildung 21, Bahn 2, R_f 0,35) eindeutig in allen Bahnen zu erkennen sind. Durch den Nachweis spezifischer Banden lässt sich eine Verwechslung jedoch ausschließen. Die Wurzeldroge von *Scrophularia nodosa* (Abbildung 21, Bahn 12) zeigt mehrere grau bis gelblich braune Banden direkt oberhalb und unterhalb der Harpagosid-Bande. Zudem unterscheidet sich ihr Fingerprint durch eine markante braunviolette Bande bei R_f 0,20. Das Drogenmaterial der Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens*, Abbildung 21, Bahn 13) kann durch eine breite gelbe Bande im R_f -Bereich 0,38-0,43 von *Scrophularia ningpoensis* Proben unterschieden werden. Diese Verwechslungen können somit aufgrund der entwickelten Methode ausgeschlossen werden.

Um den Validierungsparameter Wiederholpräzision zu evaluieren, wurde Drogenmaterial unterschiedlicher Herkünfte dreimal (Versuch Wiederholpräzision 1-3) an einem Tag unabhängig voneinander extrahiert, chromatographiert und derivatisiert (Abbildung 22).

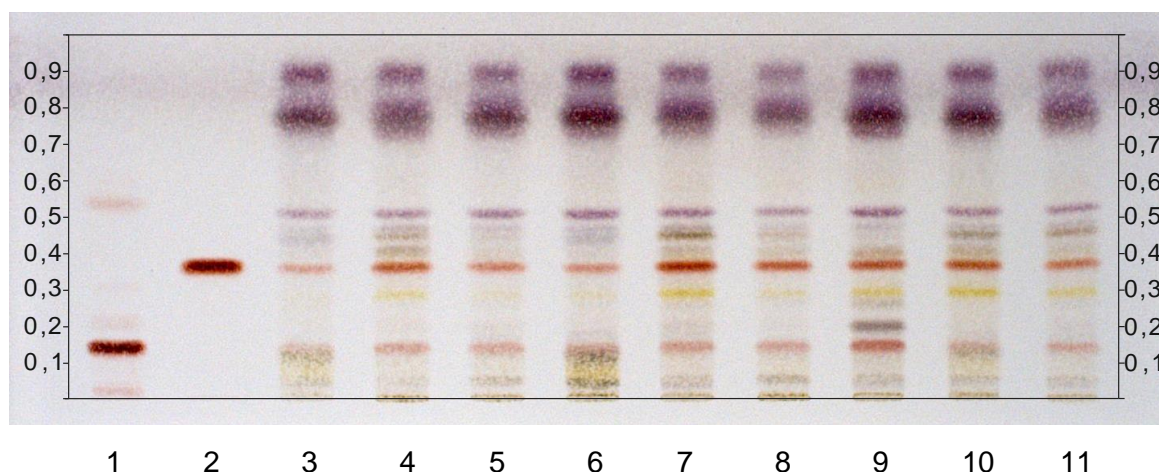


Abbildung 22 Versuch **Wiederholpräzision 1**; Bahn 1: Harpagid (1 mg/ml, 10 μ l), Bahn 2: Harpagosid (1 mg/ml, 10 μ l), Bahn 3: Probe Chinamedica (10 μ l), Bahn 4: Probe Sinophyto (10 μ l), Bahn 5: Probe Yong (10 μ l), Bahn 6: Probe Herbasinica (10 μ l), Bahn 7: Probe Caelo (10 μ l), Bahn 8: Probe Arobemed (10 μ l), Bahn 9: Probe LfL 5 (10 μ l), Bahn 10: Probe Plantasia 780004 (10 μ l), Bahn 11: Probe Chongqing (10 μ l); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

Die R_f -Werte innerhalb einer Platte (Tabellen 24-26) und von Platte zu Platte wurden verglichen (Tabelle 27) und zeigten Abweichungen in den R_f -Werten, die kleiner als 0,03 Einheiten waren. Zudem waren alle Banden der drei Platten identisch in Bezug auf Anzahl, Position und Farbe.

Tabelle 24 R_f -Werte des Versuches Wiederholpräzision 1.

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	MW
Harpagid	0,14	-	0,13	0,13	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,13	0,14
Harpagosid	-	0,36	0,35	0,35	0,36	0,35	0,36	0,36	0,36	0,36	0,37	0,36

Tabelle 25 R_f -Werte des Versuches Wiederholpräzision 2.

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	MW
Harpagid	0,14	-	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,14
Harpagosid	-	0,36	0,35	0,36	0,35	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,37	0,36

Tabelle 26 R_f -Werte des Versuches Wiederholpräzision 3.

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	MW
Harpagid	0,14	-	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,14
Harpagosid	-	0,37	0,36	0,36	0,36	0,36	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37

Tabelle 27 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Versuch Wiederholpräzision 1-3.

Versuch	Wiederholpräzision 1	Wiederholpräzision 2	Wiederholpräzision 3	ΔR_f
Harpagid	0,14	0,14	0,14	0,00
Harpagosid	0,36	0,36	0,37	0,01

Zur Durchführung des Versuches Laborpräzision wurde Drogenmaterial von *Scrophulariae radix* zusätzlich an zwei weiteren Tagen neu aufgearbeitet und chromatographiert. Um eine Aussage zu treffen, wurden ebenfalls die R_f -Werte innerhalb einer Platte und von Platte zu Platte verglichen (Tabelle 28). Numerisch sollten die Unterschiede in den R_f -Werten nicht größer als 0,03 Einheiten sein, die Banden durften weder in Farbe, Position noch Anzahl Unterschiede aufweisen.

Tabelle 28 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Versuch Laborpräzision 1-3.

Versuch	Laborpräzision 1 ≅ Wiederholpräzision 1	Laborpräzision 2	Laborpräzision 3	ΔR_f
Harpagid	0,14	0,13	0,15	0,02
Harpagosid	0,36	0,35	0,37	0,02

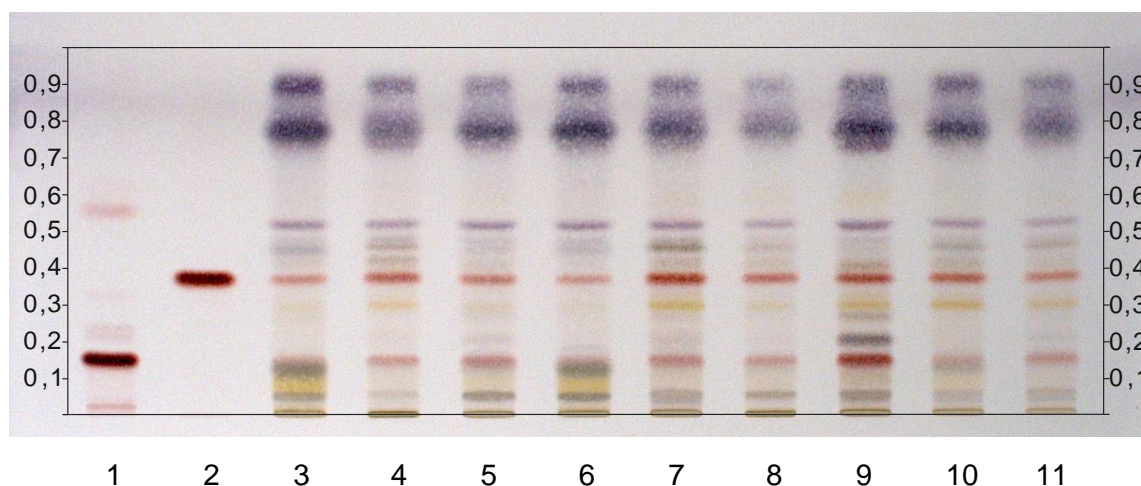


Abbildung 23 Versuch **Laborpräzision 3**; Bahn 1: Harpagid (1 mg/ml, 10 μ l), Bahn 2: Harpagosid (1 mg/ml, 10 μ l), Bahn 3: Probe Chinamedica (10 μ l), Bahn 4: Probe Sinophyto (10 μ l), Bahn 5: Probe Yong (10 μ l), Bahn 6: Probe Herbasinica (10 μ l), Bahn 7: Probe Caelo (10 μ l), Bahn 8: Probe Arobemed (10 μ l), Bahn 9: Probe LfL 5 (10 μ l), Bahn 10: Probe Plantasia 780004 (10 μ l), Bahn 11: Probe Chongqing (10 μ l); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

Tabelle 28 zeigt das Ergebnis der Auswertung der R_f -Werte und Abbildung 23 eines der drei Chromatogramme des Versuches Laborpräzision. Der Test wurde akzeptiert, da alle geforderten Parameter erfüllt waren.

Um die Robustheit der Methode zu überprüfen, wurden verschiedene Analysenparameter modifiziert. Beginnend mit dem Versuch Kammertyp/Plattentyp, wurden unterschiedliche Extrakte auf eine DC-Platte aufgetragen und in einer Flachbodenkammer entwickelt. Das Ergebnis wurde mit dem des Versuches Stabilität der Derivatisierung unter Standardbedingungen verglichen.

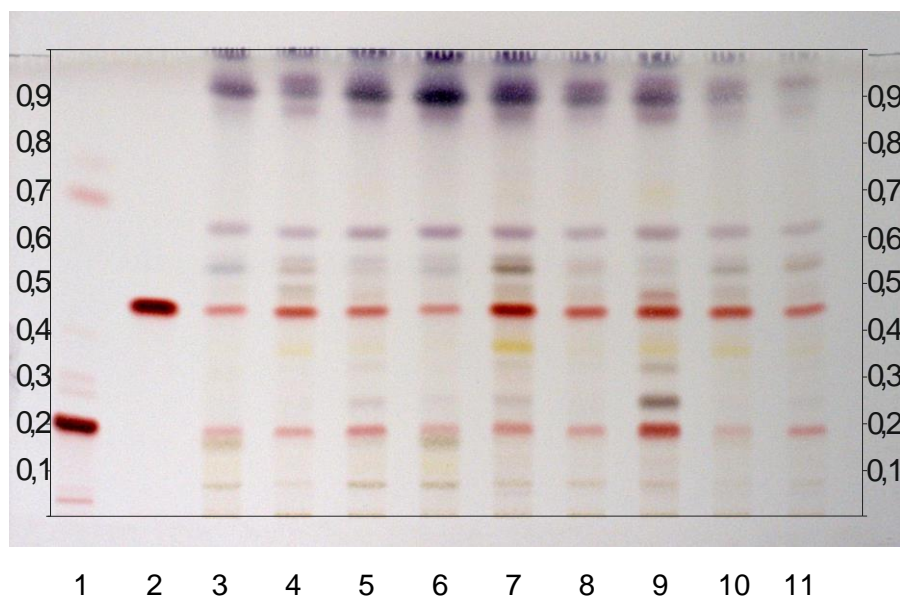


Abbildung 24 Versuch **Robustheit Kammertyp/Plattentyp**; Bahn 1: Harpagid (1 mg/ml, 10 μ l), Bahn 2: Harpagosid (1 mg/ml, 10 μ l), Bahn 3: Probe Chinamedica (10 μ l), Bahn 4: Probe Sinophyto (10 μ l), Bahn 5: Probe Yong (10 μ l), Bahn 6: Probe Herbasinica (10 μ l), Bahn 7: Probe Caelo (10 μ l), Bahn 8: Probe Arobemed (10 μ l), Bahn 9: Probe LfL 5 (10 μ l), Bahn 10: Probe Plantasia 780004 (10 μ l), Bahn 11: Probe Chongqing (10 μ l); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 11 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

Tabelle 29 Zusammenfassende Ergebnisse aus dem Versuch Robustheit Kammertyp/Plattentyp.

Versuch	Robustheit Kammertyp/Plattentyp (Flachbodenkammer, DC-Platte)	Stabilität der Derivatisierung (Doppeltrogkammer, HPTLC- Platte)	ΔR_f
Harpagid	0,18	0,15	0,03
Harpagosid	0,43	0,39	0,04

Das erhaltene Chromatogramm (Abbildung 24) zeigte im Vergleich zu Abbildung 18 Unterschiede in den R_f -Werten, die nicht größer als 0,06 Einheiten waren. Der Test auf Robustheit Kammertyp/Plattentyp konnte akzeptiert werden, somit war es möglich die Methode sowohl auf DC als auch auf HPTLC-Platten unter Verwendung unterschiedlicher Kammertypen durchzuführen.

Als weiterer Robustheitsparameter wurde die Entwicklungsdistanz evaluiert. Dazu wurden die Extrakte aufgearbeitet und auf zwei HPTLC-Platten aufgetragen. Die Entwicklungsdistanz wurde zur Entwicklung der ersten Platte auf 6 cm (vom unteren Plattenrand) verkürzt und zur Entwicklung der zweiten Platte auf 8 cm (vom unteren Plattenrand) verlängert. Im Anschluss sollten die R_f -Werte, Farben und Anzahl der Banden der beiden Platten mit einer Platte unter Standardbedingungen (Stabilität der Derivatisierung, Abbildung 18) verglichen werden.

Die Banden, die bei veränderten Entwicklungsstrecken (Abbildungen 25 und 26), im Vergleich zu Standardbedingungen (Abbildung 18) erhalten wurden, unterschieden sich nicht signifikant

in Bezug auf Anzahl, Position und Farbe der Banden. Der Unterschied der R_f -Einheiten war nicht größer als 0,06 (Tabelle 30), somit konnte der Test akzeptiert werden.

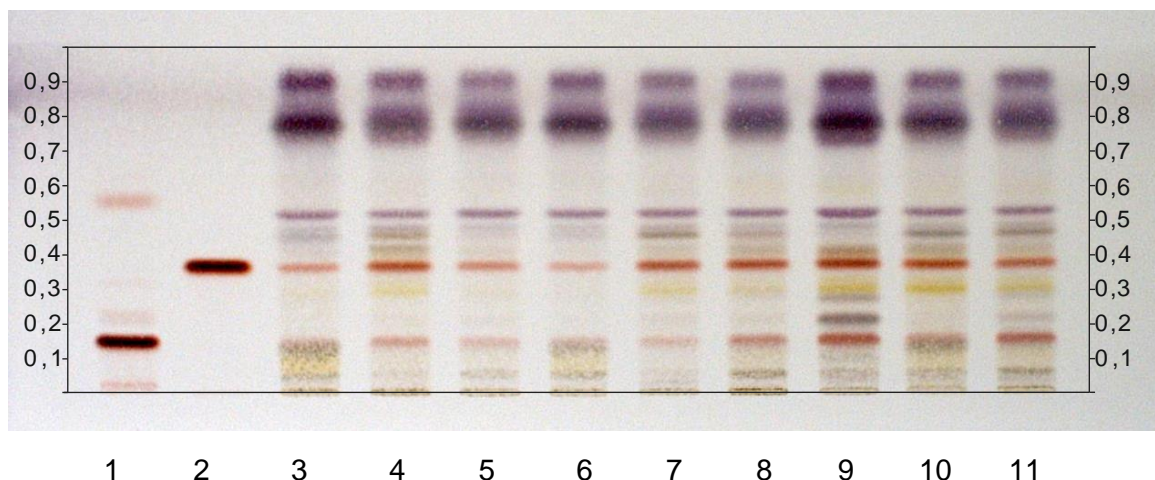


Abbildung 25 Versuch **Robustheit Entwicklungsstrecke**; Bahn 1: Harpagid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 2: Harpagosid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 3: Probe Chinamedica (10 µl), Bahn 4: Probe Sinophyto (10 µl), Bahn 5: Probe Yong (10 µl), Bahn 6: Probe Herbasinica (10 µl), Bahn 7: Probe Caelo (10 µl), Bahn 8: Probe Arobemed (10 µl), Bahn 9: Probe LfL 5 (10 µl), Bahn 10: Probe Plantasia 780004 (10 µl), Bahn 11: Probe Chongqing (10 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 6 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

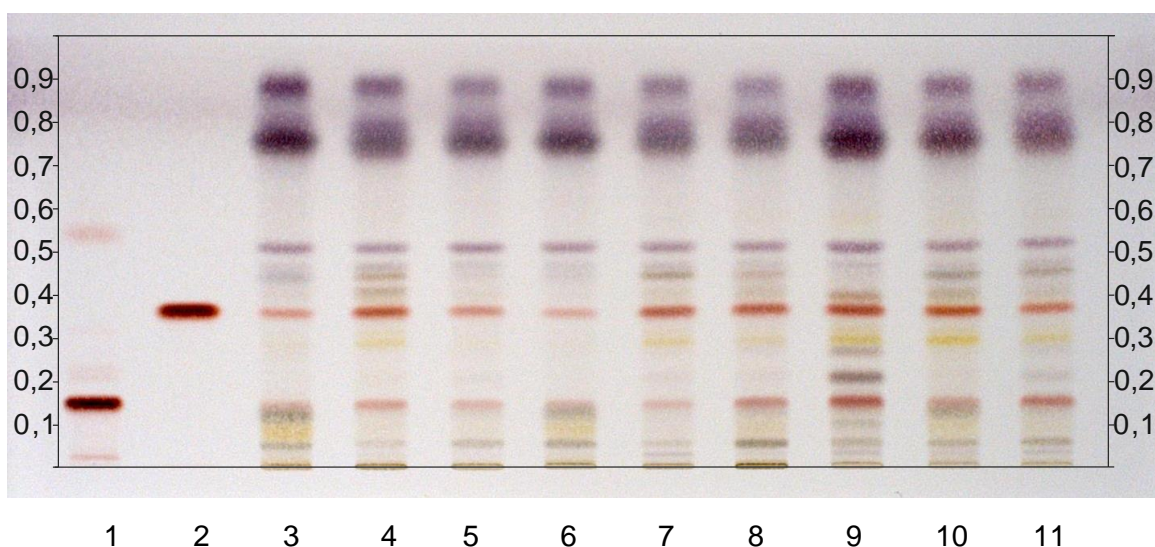


Abbildung 26 Versuch **Robustheit Entwicklungsstrecke**; Bahn 1: Harpagid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 2: Harpagosid (1 mg/ml, 10 µl), Bahn 3: Probe Chinamedica (10 µl), Bahn 4: Probe Sinophyto (10 µl), Bahn 5: Probe Yong (10 µl), Bahn 6: Probe Herbasinica (10 µl), Bahn 7: Probe Caelo (10 µl), Bahn 8: Probe Arobemed (10 µl), Bahn 9: Probe LfL 5 (10 µl), Bahn 10: Probe Plantasia 780004 (10 µl), Bahn 11: Probe Chongqing (10 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 8 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht.

Tabelle 30 Zusammenfassung des Versuches Robustheit Entwicklungsstrecke anhand der durchschnittlichen R_f -Werte je Platte, verglichen mit dem Versuch Stabilität der Derivatisierung.

Versuch	Robustheit Entwicklungsstrecke 5 cm	Stabilität der Derivatisierung Entwicklungsstrecke 6 cm	Robustheit Entwicklungsstrecke 7 cm	ΔR_f
Harpagid	0,13	0,15	0,14	0,02
Harpagosid	0,35	0,39	0,36	0,04

3.3.4 Bestimmung des Trocknungsverlustes

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes der Wurzelndroge erfolgte nach Ph.Eur. (2.2.32 Trocknungsverlust, 2017) im Trockenschrank und wurde berechnet als der in Prozent (m/m) angegebene Masseverlust.

Tabelle 31 Ergebnisse zur Bestimmung des Trocknungsverlustes der verschiedenen Proben mit Tara [g], Einwaage [g], Auswaage [g] und dem Trocknungsverlust in [%]

Yong	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	39,7090	1,0002	40,6031	0,8941	10,6
2. Einwaage	39,7086	1,0012	40,6041	0,8954	10,6
3. Einwaage	31,7331	1,0002	32,6252	0,8921	10,8
Mittelwert					10,7
StabW					0,133
V _K					1,24
Chongqing	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	33,6353	1,0004	34,5187	0,8835	11,7
2. Einwaage	33,6354	1,0070	34,5203	0,8849	12,1
3. Einwaage	33,6357	1,0007	34,5215	0,8858	11,5
Mittelwert					11,8
StabW					0,328
V _K					2,79
Sinophyto	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	31,9071	1,0034	32,8108	0,9037	9,94
2. Einwaage	31,9074	1,0007	32,8086	0,9012	9,94
3. Einwaage	31,7154	1,0022	32,6174	0,9012	9,99
Mittelwert					9,96
StabW					0,0275
V _K					0,277
Herbasinica	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	52,8914	1,0035	53,7819	0,8905	11,3
2. Einwaage	61,6715	1,0074	62,5689	0,8974	10,9
3. Einwaage	16,2229	1,0052	17,1194	0,8966	10,8
Mittelwert					11,00
StabW					0,238
V _K					2,17
Caelo	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	59,1184	0,9983	60,0091	0,8907	10,8
2. Einwaage	32,6971	0,9930	33,5856	0,8885	10,5
3. Einwaage	59,1156	1,0054	60,0146	0,8990	10,6
Mittelwert					10,6
StabW					0,131
V _K					1,24

LfL Probe 3	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	61,6715	0,9734	62,5765	0,9050	7,03
2. Einwaage	52,8873	0,9940	53,8096	0,9223	7,22
3. Einwaage	32,6980	1,0020	33,6285	0,9305	7,14
Mittelwert					7,13
StabW					0,0949
V_K					1,33
LfL Probe 1	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	51,9886	1,0085	52,8696	0,8809	12,6
2. Einwaage	51,9880	0,9972	52,8602	0,8722	12,5
3. Einwaage	32,6978	1,0124	33,5844	0,8866	12,4
Mittelwert					12,5
StabW					0,107
V_K					0,856

Die Trocknungsverluste (Tabelle 31) der vorhandenen Proben von *Scrophulariae radix* lagen ohne größere Abweichungen (%-StabW) zwischen 7,1% (m/m) und 12,5% (m/m), wobei die Gesamtheit der importierten Handelsproben einen Trocknungsverlust von durchschnittlich 10,8% (m/m) zeigte. Nach ChP wird für *Scrophulariae radix* ein Trocknungsverlust von maximal 16,0% (m/m) angegeben (*Scrophulariae Radix*, 2010).

Da der Wassergehalt einen eklatanten Einfluss auf die Qualität und Haltbarkeit von pflanzlichem Drogenmaterial hat und ein zu hoher Anteil an Feuchtigkeit die Gefahr eines mikrobiellen Befalles erhöht, sollte der Trocknungsverlust einer Droge bei maximal 12,0% (m/m) liegen (Sticher et al., 2015). Nach der Richtlinie des EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2007) zur Erstellung von Monographien von pflanzlichen Drogen und deren Zubereitungen, sollte, falls nicht anders begründet, der Trocknungsverlust nicht mehr als 10% betragen.

Basierend auf vorgestellten Ergebnissen kann der Maximalwert von 10% Trocknungsverlust nicht realisiert werden. Daher wurde für die DAB Monographie ein maximaler Trocknungsverlust von 12,0% (m/m) vorgeschlagen.

3.3.5 Bestimmung der Asche

Die Bestimmung der Asche erfolgte in Anlehnung an das Ph.Eur. (2.4.16 Asche, 2017) und wurde als prozentualer Anteil (m/m) an der eingewogenen Masse nach Durchführung des Experimentes bestimmt.

Tabelle 32 Ergebnisse aus der Bestimmung der Asche mit Probenname, Tara [g], Ein- und Auswaage [g] und dem Wert für die Asche [g/%].

Chongqing	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	Asche [%, (m/m)]
1. Einwaage	24,3065	1,0141	24,3411	0,0347	3,4
2. Einwaage	20,8095	0,9944	20,8440	0,0345	3,5
3. Einwaage	26,1592	1,0067	26,1936	0,0344	3,4
Mittelwert					3,4
StabW					0,031
V _K					0,89
Chinamedica	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	Asche [%, (m/m)]
1. Einwaage	20,7243	1,0012	20,7674	0,0431	4,3
2. Einwaage	20,2605	0,9896	20,3012	0,0406	4,1
3. Einwaage	20,1073	0,9984	20,1515	0,0442	4,4
Mittelwert					4,3
StabW					0,16
V _K					3,8
Herbasinica	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	21,9110	1,0043	21,9526	0,0417	4,2
2. Einwaage	21,8426	0,9966	21,8848	0,0423	4,2
3. Einwaage	21,7007	1,0034	21,7400	0,0393	3,9
Mittelwert					4,1
StabW					0,17
V _K					4,1
LfL Probe 1	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	19,7510	1,0189	19,7875	0,0365	3,6
2. Einwaage	21,3177	0,9797	21,3498	0,0321	3,3
3. Einwaage	20,1923	1,0046	20,2250	0,0327	3,3
Mittelwert					3,4
StabW					0,18
V _K					5,5
Sinophyto	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	20,1914	0,9986	20,2297	0,0383	3,8
2. Einwaage	21,3906	0,9981	21,4285	0,0378	3,8
3. Einwaage	20,7751	0,9970	20,8135	0,0384	3,8
Mittelwert					3,8
StabW					0,029
V _K					0,76

Plantasia 003/40	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	21,0180	0,9977	21,0580	0,0400	4,0
2. Einwaage	21,2873	0,9991	21,3273	0,0400	4,0
3. Einwaage	25,9822	1,0028	26,0228	0,0406	4,0
Mittelwert					4,0
StabW					0,023
V_K					0,58

Nach Durchführung des Experiments konnte ein durchschnittlicher Aschewert von 3,8% (m/m), ohne größere Abweichungen ermittelt werden (Tabelle 32). Das ChP (Scrophulariae Radix, **2010**) schlägt einen maximalen Aschewert von 5,0% (m/m) vor, dieser Höchstwert kann für den DAB Monographievorschlag übernommen werden.

3.3.6 Bestimmung der salzsäureunlöslichen Asche

Die Bestimmung der salzsäureunlöslichen Asche wurde gemäß Ph.Eur. durchgeführt (2.8.1 Salzsäureunlösliche Asche, **2017**).

Tabelle 33 Ergebnisse des Versuches Bestimmung der salzsäureunlöslichen Asche.

Chongqing	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	HCl-unlösliche Asche [g]	HCl-unlösliche Asche [%, (m/m)]
1. Einwaage	24,3065	1,0141	24,3135	0,0070	0,69
2. Einwaage	26,1592	1,0067	26,1652	0,0060	0,59
3. Einwaage	20,5481	1,0041	20,5524	0,0042	0,42
Mittelwert					0,57
StabW					0,14
V_K					24,56
Chinamedica	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	HCl-unlösliche Asche [g]	HCl-unlösliche Asche [%, (m/m)]
1. Einwaage	20,7243	1,0012	20,7345	0,0101	1,0
2. Einwaage	20,1073	0,9984	20,1207	0,0133	1,3
3. Einwaage	20,3700	1,0038	20,3836	0,0135	1,3
Mittelwert					1,2
StabW					0,19
V_K					15,83
Herbasinica	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	HCl-unlösliche Asche [g]	HCl-unlösliche Asche [%, (m/m)]
1. Einwaage	21,9110	1,0043	21,9213	0,0104	1,0
2. Einwaage	21,8426	0,9966	21,8539	0,0114	1,1
3. Einwaage	21,7007	1,0034	21,7090	0,0083	0,83
Mittelwert					1,0
StabW					0,16
V_K					16,00

LfL Probe 1	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	HCl-unlösliche Asche [g]	HCl-unlösliche Asche [% (m/m)]
1. Einwaage	19,7510	1,0189	19,7517	0,0007	0,070
2. Einwaage	21,3177	0,9797	21,3184	0,0006	0,065
3. Einwaage	20,1923	1,0046	20,1936	0,0013	0,13
Mittelwert					0,089
StabW					0,037
V_K					41,57
Sinophyto	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	HCl-unlösliche Asche [g]	HCl-unlösliche Asche [% (m/m)]
1. Einwaage	20,1914	0,9986	20,1968	0,0053	0,53
2. Einwaage	20,3906	0,9981	21,3960	0,0054	0,54
3. Einwaage	20,7751	0,9970	20,7806	0,0055	0,55
Mittelwert					0,54
StabW					0,010
V_K					1,9
Plantasia 003/40	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	HCl-unlösliche Asche [g]	HCl-unlösliche Asche [% (m/m)]
1. Einwaage	21,0180	0,9977	21,0251	0,0071	0,71
2. Einwaage	25,9822	1,0028	25,9890	0,0067	0,67
3. Einwaage	24,3075	0,9985	24,3138	0,0064	0,64
Mittelwert					0,67
StabW					0,038
V_K					5,6

Der durchschnittliche Wert für die salzsäureunlösliche Asche lag bei den durchgeführten Experimenten bei 0,68% (m/m) (Tabelle 33). Die Probe aus deutschem Versuchsanbau (LfL Probe 1) zeigte mit durchschnittlichen 0,089% (m/m) einen deutlich geringeren Ascherückstand im Vergleich zu Proben chinesischen Importes, wie z.B. Chinamedica mit 1,2% (m/m) oder Herbasinica mit 1,0% (m/m). Ein Grund für die teilweise beachtliche prozentuale Standardabweichung (LfL Probe 1,41%) könnte die statischen Aufladung des Rückstandes nach dem Glühen und die damit einhergehende Wägeungenauigkeit sein. Nach dem ChP wird für die Monographie von Scrophulariae radix ein prozentualer Anteil für die salzsäureunlösliche Asche von maximal 2,0% (m/m) vorgeschrieben (Scrophulariae Radix, **2010**). Dieser Wert konnte für den Monographievorschlag für das DAB übernommen werden.

3.3.7 Bestimmung der wasserlöslichen extrahierbaren Substanzen

In der Monographie von Scrophulariae radix im ChP (Scrophulariae Radix, **2010**) wird als weitere Reinheitsprüfung die Bestimmung der wasserlöslichen extrahierbaren Substanzen in der Hitze mit einem Minimalgehalt von 60,0% (m/m) vorgeschrieben. Die Versuchsdurchführung erfolgt gemäß dem ChP (X A Determination of extractives, **2010**)

(Kapitel 3.2.2.4) und wurde berechnet als prozentualer Anteil an der eingesetzten getrockneten Droge.

Tabelle 34 Ergebnisse des Versuches Bestimmung der wasserlöslichen extrahierbaren Substanzen.

Yong	Einwaage [g]	Auswaage; Extrahierbare Substanzen [g]	Aliquotierung [g]	Wasserlösliche Bestandteile [%]
1. Einwaage	4,07	0,74	2,96	72,7
2. Einwaage	3,99	0,71	2,84	71,2
3. Einwaage	3,93	0,72	2,88	73,3
Mittelwert				72,4
StabW				1,09
V_K				1,51
Arobemed	Einwaage [g]	Auswaage; Extrahierbare Substanzen [g]	Aliquotierung [g]	Wasserlösliche Bestandteile [%]
1. Einwaage	4,02	0,73	2,92	72,6
2. Einwaage	4,01	0,72	2,88	71,8
3. Einwaage	3,99	0,73	2,92	73,2
Mittelwert				72,5
StabW				0,686
V_K				0,945
Herbasinica	Einwaage [g]	Auswaage; Extrahierbare Substanzen [g]	Aliquotierung [g]	Wasserlösliche Bestandteile [%]
1. Einwaage	4,04	0,73	2,92	72,3
2. Einwaage	4,04	0,71	2,84	70,3
3. Einwaage	3,96	0,69	2,76	69,7
Mittelwert				70,8
StabW				1,35
V_K				1,91
Caelo	Einwaage [g]	Auswaage; Extrahierbare Substanzen [g]	Aliquotierung [g]	Wasserlösliche Bestandteile [%]
1. Einwaage	4,01	0,71	2,84	70,8
2. Einwaage	4,04	0,70	2,80	69,3
3. Einwaage	4,00	0,70	2,80	70,0
Mittelwert				70,0
StabW				0,759
V_K				1,08
Chinamedica	Einwaage [g]	Auswaage; Extrahierbare Substanzen [g]	Aliquotierung [g]	Wasserlösliche Bestandteile [%]
1. Einwaage	4,04	0,69	2,76	68,3
2. Einwaage	3,96	0,65	2,60	65,7
3. Einwaage	3,86	0,62	2,48	64,2
Mittelwert				66,1
StabW				2,07
V_K				3,13

LfL Probe 1	Einwaage [g]	Auswaage; Extrahierbare Substanzen [g]	Aliquotierung [g]	Wasserlösliche Bestandteile [%]
1. Einwaage	3,97	0,71	2,84	71,5
2. Einwaage	3,96	0,68	2,72	68,7
3. Einwaage	4,02	0,72	2,88	71,6
Mittelwert				70,6
StabW				1,68
V_K				2,37

Der durchschnittliche Gehalt an wasserlöslichen, extrahierbaren Stoffen lag bei 70,4% (m/m) und entsprach somit den Vorgaben des ChP (Ergebnisse aller Probenmuster, Tabelle 34). Im Ph.Eur. existiert keine allgemeine Vorschrift zur Bestimmung von extrahierbaren Stoffen, jedoch ist in manchen Monographien, wie z.B. bei der Enzianwurzel (Enzianwurzel, **2017**), eine Extraktivgehalt (mit Wasser extrahierbare Substanzen) aufgenommen, um zu überprüfen, ob die Droge bereits zur Schnapsherstellung vermaischt wurde (Sticher et al., **2015**).

3.3.8 Gehaltsbestimmung mittels HPTLC

3.3.8.1 Methodenentwicklung

Im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes bei der Firma Camag in Muttenz (Schweiz) sollte eine HPTLC Methode entwickelt werden, mit deren Hilfe eine densitometrische Quantifizierung der beiden Iridoide Harpagid und Harpagosid im Extrakt von *Scrophulariae radix* möglich ist. Die unter 3.2.1.3.1 (Methode IV) vorgestellte Fingerprint-Methode zur Identifizierung eignet sich jedoch nicht zur Quantifizierung. Eine geeignete Methode sollte eine Basislinientrennung der zu bestimmenden Analyten im Densitogramm aufweisen (Reich and Schibli, **2007**), was aufgrund der mangelnden Trennung des Harpagids im Chromatogramm (Abbildung 23, Kapitel 3.3.3.2) nicht gegeben ist. Im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit, der Homogenität der Ergebnisse und niedrigerer Nachweisgrenzen, sollte das Derivatisierungsreagenz nicht gesprüht, sondern durch Tauchen auf die Platte appliziert werden (Frey and Zieloff, **1993**; Hahn-Deinstrop, **1998**; Jork et al., **1993**; Reich and Schibli, **2007**).

Aufgrund der Instabilität des unter 3.2.1.3.1 (Methode IV) vorgestellten Sprüh-Derivatisierungsreagenzes Vanillin-Schwefelsäure (Jork et al., **1993**; Reich and Schibli, **2007**) sollte es durch das Anisaldehyd-Tauchreagenz (Kapitel 3.2.1.3.1) ersetzt werden.

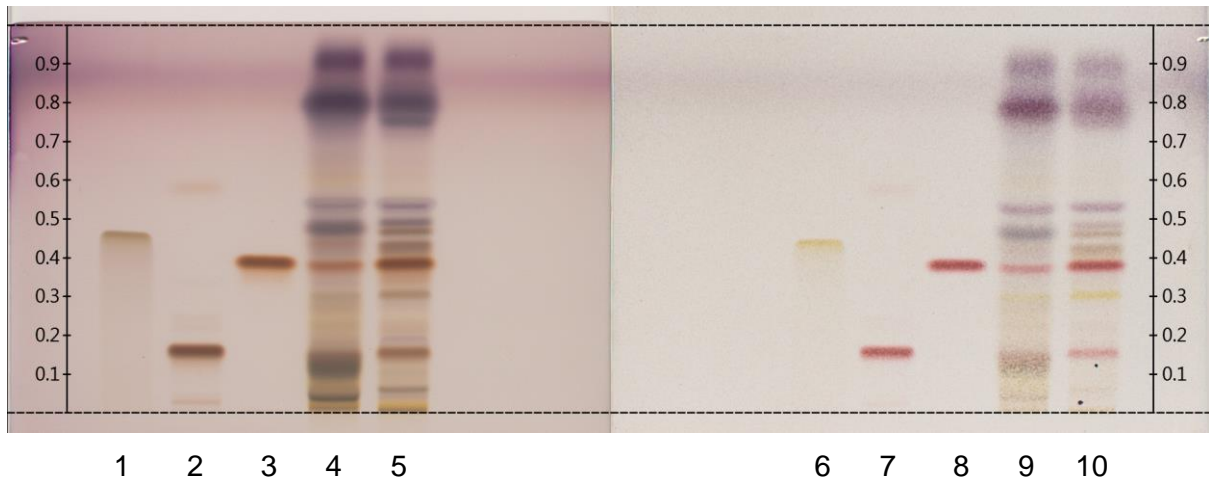


Abbildung 27 HPTLC-Fingerprint nach Aufarbeitung Methode IV (3.2.1.3.1): Bahn 1/6: Verbascosid (1 mg/ml, 5 µl), Bahn 2/7: Harpagid (1 mg/ml, 5 µl), Bahn 3/8: Harpagosid (1 mg/ml, 5 µl), Bahn 4/9: Probe Chinamedica (10 µl), Bahn 5/10: Probe Sinophyto (10 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Entwicklungsstrecke 7 cm (unterer Plattenrand); nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz bei Tageslicht (Bahn 1-5) und nach Derivatisierung Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht (Bahn 6-10).

Wie in Abbildung 27 (Bahn 6-10) dargestellt, führte Methode IV (CAMAG) zu den gleichen Ergebnissen wie im eigenen Labor (vgl. Abbildung 23, Kapitel 3.3.3.2). Die Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz (Abbildung 27, Bahn 1-5) statt Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (Abbildung 27, Bahn 6-10) liefert qualitativ ähnliche Ergebnisse, Unterschiede ergaben sich lediglich durch Farbtöne und Intensitäten.

Eine Vereinfachung der Extraktion sollte die Aufarbeitung zeitsparender gestalten. Dafür wurden je 0,5 g pulverisiertes Drogenmaterial nach Methode V (unter 3.2.3.1.1) in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität extrahiert, chromatographiert und im Anschluss derivatisiert (Abbildung 28). Gemäß den Erwartungen, wurden durch die Extraktion mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln verschiedene Fingerprints erhalten.

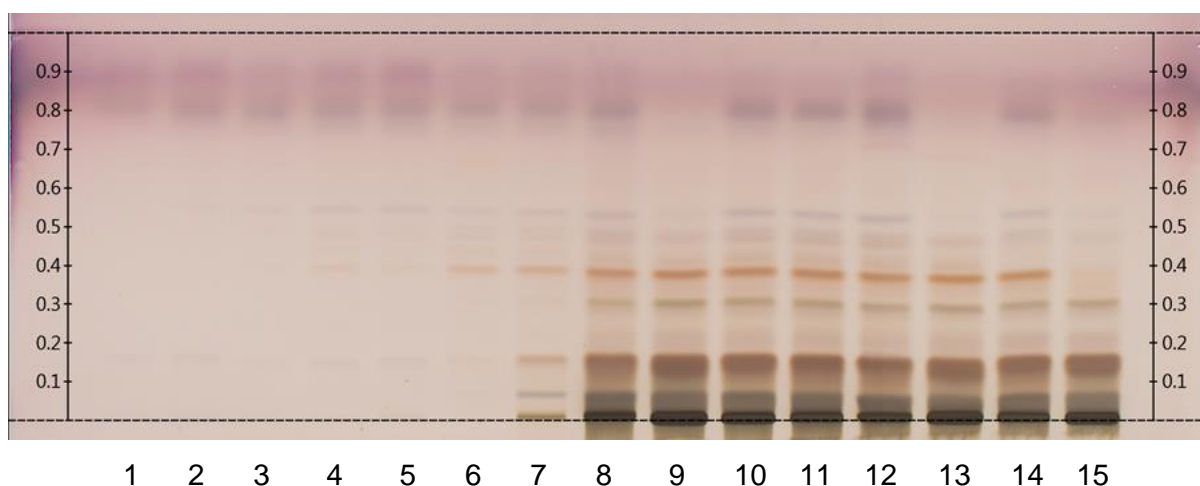


Abbildung 28 HPTLC-Fingerprint der Probe Sinophyto nach Methode V (3.2.3.1.1) extrahiert mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln: Bahn 1: Sinophyto/Heptan (5 µl), Bahn 2: Sinophyto/Toluol (5 µl), Bahn 3: Sinophyto/Methyl-*tert*-butylether (5 µl), Bahn 4: Sinophyto/Dichlormethan (5 µl), Bahn 5: Sinophyto/Chloroform (5 µl), Bahn 6: Sinophyto/Aceton (5 µl), Bahn 7: Sinophyto/Ethanol 99,8% (5 µl), Bahn 8: Sinophyto/Methanol (5 µl), Bahn 9: Sinophyto/Wasser (5 µl), Bahn 10: Sinophyto/Ethanol:Wasser (V/V, 7:3; 5 µl), Bahn 11: Sinophyto/Methanol:Wasser (V/V, 8:2; 5 µl), Bahn 12: Sinophyto/Methanol:Essigsäure (V/V, 9:1; 5 µl), Bahn 13: Sinophyto/Wasser:Essigsäure (V/V, 9:1; 5 µl), Bahn 14: Sinophyto/Methanol:Ammoniak 25% (V/V, 8:2; 5 µl), Bahn 15: Sinophyto/Wasser:Ammoniak 25% (V/V, 8:2; 5 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz bei Tageslicht.

Die Extraktion mit Ethanol (Abbildung 28, Bahn 7) zeigte einen klaren Fingerprint, bei dem die beiden Analyten Harpagid und Harpagosid voneinander getrennt werden. Die polaren Substanzen im unteren R_f -Bereich sind kaum extrahiert, was eine Auswertung des Chromatogramms vereinfacht. Um die optimale Zusammensetzung des Extraktionsmittels zu ermitteln, sollte daher die Extraktion mit unterschiedlichen Ethanol/Wasser-Gemischen evaluiert werden (Abbildung 29).

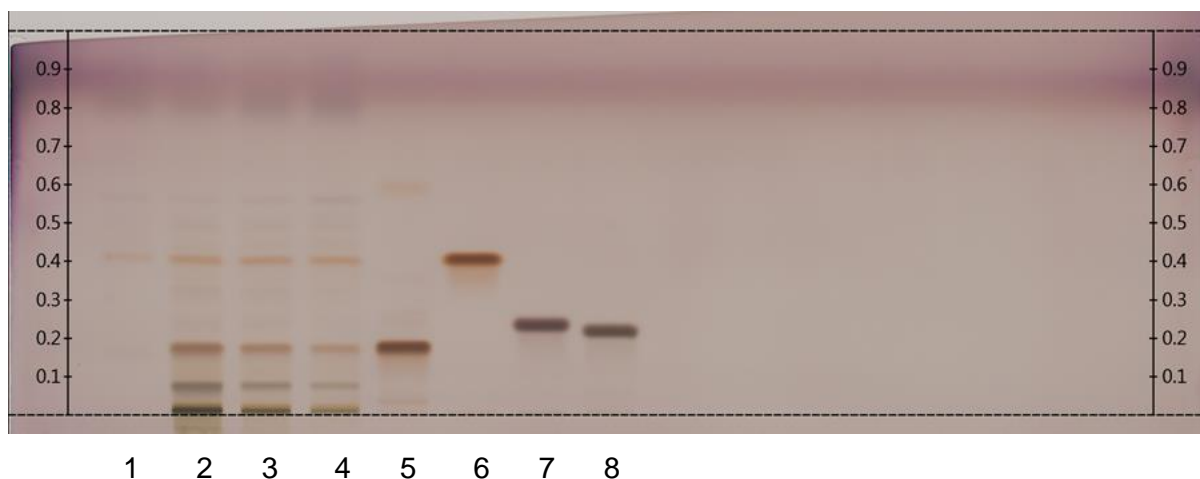


Abbildung 29 HPTLC-Fingerprint der Probe Sinophyto nach Methode V (3.2.3.1.1) extrahiert mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln: Bahn 1: Sinophyto/Ethylacetat (5 µl), Bahn 2: Sinophyto/Ethanol 90% (V/V) (5 µl), Bahn 3: Sinophyto/Ethanol 96% (V/V) (5 µl), Bahn 4: Sinophyto/Ethanol 99,8% (5 µl), Bahn 5: Harpagid (1 mg/ml, 5 µl), Bahn 6: Harpagosid (1 mg/ml, 5 µl), Bahn 7: Aucubin (1 mg/ml, 5 µl), Bahn 8: Catalpol (1 mg/ml, 5 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Entwicklungsstrecke 7 cm (unterer Plattenrand); nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz bei Tageslicht.

Nach Auswertung des Versuches konnte Ethanol 90% (V/V) (Abbildung 29, Bahn 2) als das geeignetste Extraktionsmittel bestimmt werden. Um die Methode abschließend beurteilen zu können, wurden alle verfügbaren *Scrophularia radix* Proben inkl. weiterer Drogen, als deren Leitstoffe u.a. Iridoide (*Valerianae radix*, *Harpagophyti radix* und *Plantaginis lanceolate herba*)

gelten (Sticher et al., 2015), extrahiert, chromatographiert und derivatisiert (3.2.3.1.1, Methode VI).

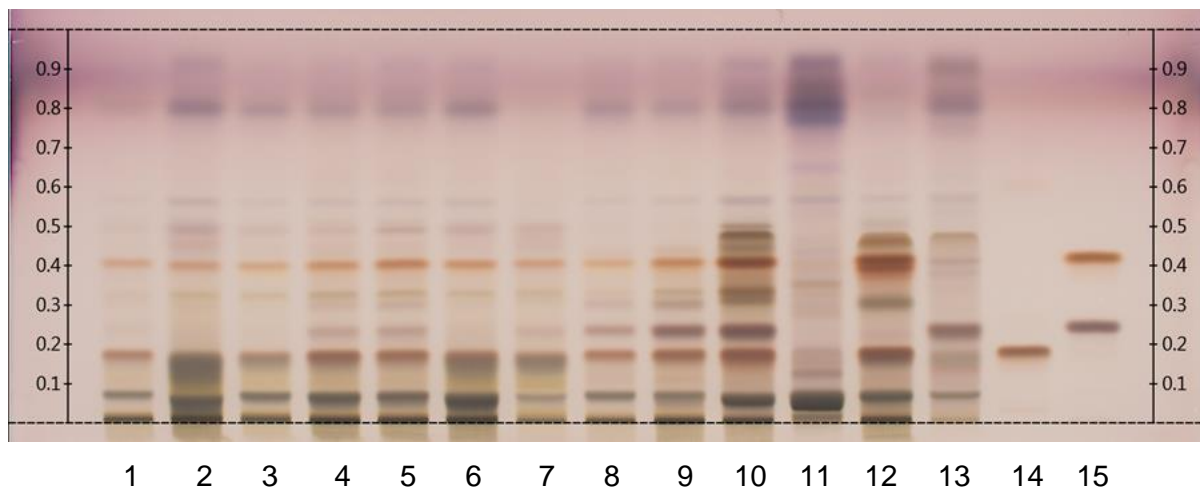


Abbildung 30 HPTLC-Fingerprint nach Methode VI (3.2.3.1.1): Bahn 1: Sinophyto (5 µl), Bahn 2: Chinamedica (5 µl), Bahn 3: Plantasia 780004 (5 µl), Bahn 4: Chongqing (5 µl), Bahn 5: Caelo (5 µl), Bahn 6: Herbasinica (5 µl), Bahn 7: Herbasinica Trockenextrakt (5 µl), Bahn 8: LfL Probe 1 (5 µl), Bahn 9: LfL Probe 5 (5 µl), Bahn 10: LfL Probe 7 (*Scrophularia nodosa*, 5 µl), Bahn 11: *Valeriana* (5 µl), Bahn 12: Harpagophyti radix Caelo (5 µl), Bahn 13: *Plantago* (5 µl), Bahn 14: Harpagid (1 mg/ml, 2 µl), Bahn 15: Harpagosid (1 mg/ml, 2 µl) und Aucubin (1 mg/ml, 2 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser (77:15:8, V/V/V), Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz bei Tageslicht.

Auf den Bahnen 1-9 (Abbildung 30) waren ausschließlich Proben von *Scrophulariae radix* unterschiedlicher Lieferanten/Importeure aufgetragen. Probe Sinophyto (Bahn 1) zeigt das gleiche zufriedenstellende Ergebnis, wie im Versuch (Abbildung 29) zuvor, mit dessen Fingerprint eine densitometrische Quantifizierung der beiden Iridoide möglich wäre. Betrachtet man jedoch die restlichen Proben in Bahn 2-7 wird die Harpagid-Bande im Bereich R_f 0,18-0,19 von grünen Banden mehr oder weniger stark überdeckt, die Auflösung ist nur noch ungenügend. Durch die Evaluierung verschiedenster Fließmittelsysteme sollte eine mobile Phase gefunden werden, mit der die beiden Iridoide, Harpagid und Harpagosid, mit einer ausreichenden Auflösung in Bezug auf andere Banden im Fingerprint-Chromatogramm in allen Proben detektiert werden können.

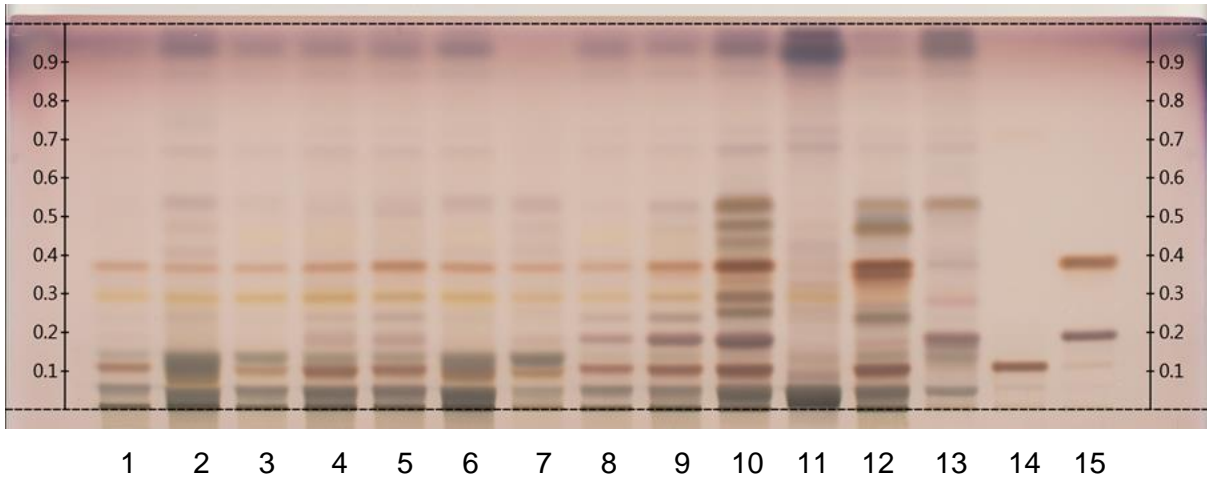


Abbildung 31 HPTLC-Fingerprint nach Methode VI (3.2.3.1.1): Bahn 1: Sinophyto (5 µl), Bahn 2: Chinamedica (5 µl), Bahn 3: Plantasia 780004 (5 µl), Bahn 4: Chongqing (5 µl), Bahn 5: Caelo (5 µl), Bahn 6: Herbasinica (5 µl), Bahn 7: Herbasinica Trockenextrakt (5 µl), Bahn 8: LfL Probe 1 (5 µl), Bahn 9: LfL Probe 5 (5 µl), Bahn 10: LfL Probe 7 (*Scrophularia nodosa*, 5 µl), Bahn 11: *Valeriana* (5 µl), Bahn 12: Harpagophyti radix Caelo (5 µl), Bahn 13: *Plantago* (5 µl), Bahn 14: Harpagid (1 mg/ml, 2 µl), Bahn 15: Harpagosid (1 mg/ml, 2 µl) und Aucubin (1 mg/ml, 2 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Ameisensäure:Wasser:Ethylmethylketon (50:10:10:30, V/V/V/V), Entwicklungsstrecke 7 cm (unterer Plattenrand); nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz bei Tageslicht.

Abbildung 31 zeigt die Proben nach Aufarbeitung gemäß Methode VI (3.2.3.1.1) und anschließender Entwicklung mit der mobilen Phase bestehend aus Ethylacetat, Ameisensäure, Wasser und Ethylmethylketon im Verhältnis 50:10:10:30 (V/V/V/V). Harpagosid (R_f 0,38/0,39) konnte mit einer ausreichenden Auflösung chromatographiert werden, lediglich Harpagid (R_f 0,11) war nach wie vor von grünen Banden direkt oberhalb (z.B. Abbildung 31, u.a. Bahn 2, 4, 5, und 7) und teilweise auch unterhalb (Abbildung 31, Bahn 2) überlagert. Auch dieses Fließmittelsystem eignet sich daher nicht zur densitometrischen Quantifizierung.

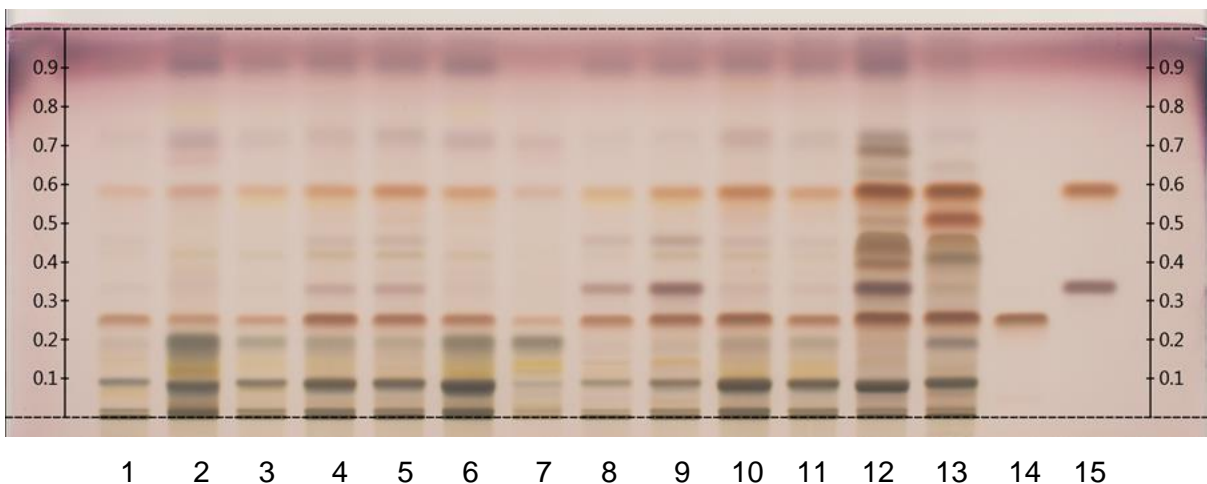


Abbildung 32 HPTLC-Fingerprint nach Methode VI (3.2.3.1.1): Bahn 1: Sinophyto (5 µl), Bahn 2: Chinamedica (5 µl), Bahn 3: Plantasia 780004 (5 µl), Bahn 4: Chongqing (5 µl), Bahn 5: Caelo (5 µl), Bahn 6: Herbasinica (5 µl), Bahn 7: Herbasinica Trockenextrakt (5 µl), Bahn 8: LfL Probe 1 (5 µl), Bahn 9: LfL Probe 5 (5 µl), Bahn 10: Arobemed (5 µl), Bahn 11: Yong (5 µl), Bahn 12: LfL Probe 7 (*Scrophularia nodosa*, 5 µl), Bahn 13: Harpagophyti radix Caelo (5 µl), Bahn 14: Harpagid (1 mg/ml, 2 µl), Bahn 15: Harpagosid (1 mg/ml, 2 µl) und Aucubin (1 mg/ml, 2 µl); Fließmittel: Dichlormethan:Ethanol:Wasser (70:45:6,5, V/V/V/V), Entwicklungsstrecke 7 cm (unterer Plattenrand); nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz bei Tageslicht.

Mit dem Fließmittelsystem Dichlormethan:Ethanol:Wasser (70:45:6,5, V/V/V/V) konnte die erwünschte Trennung im Chromatogramm, sowohl für Harpagid als auch für Harpagosid in

allen Proben (Abbildung 32) erreicht werden. Eine Quantifizierung der beiden Iridoidglykoside im derivatisierten Zustand ist somit möglich. Da Harpagosid, im Gegensatz zu Harpagid, eine Fluoreszenzlöschung zeigt, kann erstgenanntes ebenso ohne Derivatisierung bei 254 nm detektiert und quantifiziert werden (Abbildung 33, Bahn 15 R_f 0,59).

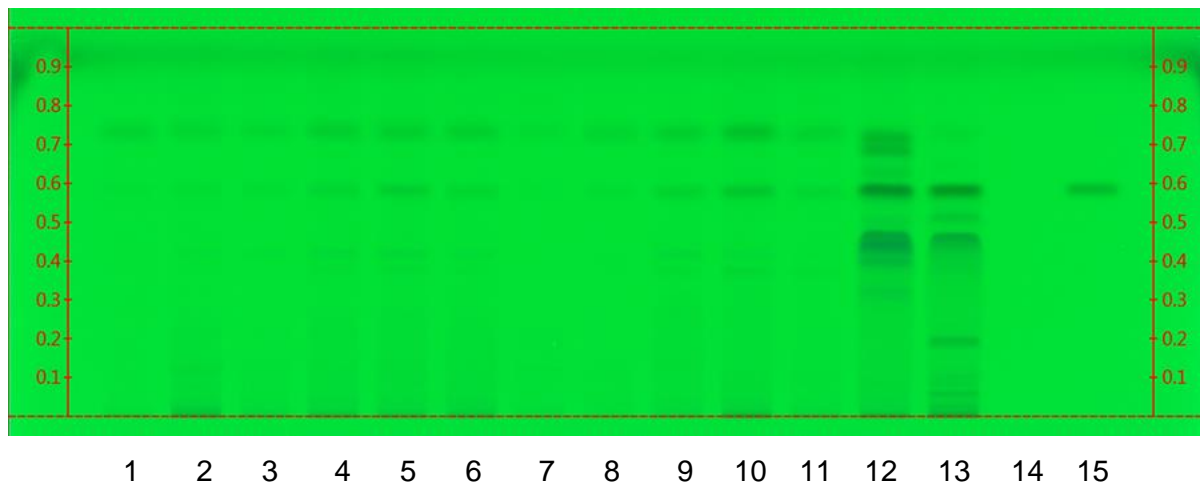


Abbildung 33 HPTLC-Fingerprint nach Methode VI (3.2.3.1.1): Bahn 1: Sinophyto (5 µl), Bahn 2: Chinamedica (5 µl), Bahn 3: Plantasia 780004 (5 µl), Bahn 4: Chongqing (5 µl), Bahn 5: Caelo (5 µl), Bahn 6: Herbasinica (5 µl), Bahn 7: Herbasinica Trockenextrakt (5 µl), Bahn 8: LfL Probe 1 (5 µl), Bahn 9: LfL Probe 5 (5 µl), Bahn 10: Arobemed (5 µl), Bahn 11: Yong (5 µl), Bahn 12: LfL Probe 7 (*Scrophularia nodosa*, 5 µl), Bahn 13: Harpagophyti radix Caelo (5 µl), Bahn 14: Harpagid (1 mg/ml, 2 µl), Bahn 15: Harpagosid (1 mg/ml, 2 µl) und Aucubin (1 mg/ml, 2 µl); Fließmittel: Dichlormethan:Ethanol:Wasser (70:45:6,5, V/V/V), Entwicklungsstrecke 7 cm (unterer Plattenrand); 254 nm.

3.3.8.2 Methodenvergleich

Wie in Kapitel 3.3.8.1 beschrieben wurde eine Methode entwickelt mittels derer die densitometrische Quantifizierung der beiden Iridoide im ethanolischen Extrakt (90% (V/V)) von *Scrophulariae radix* möglich ist. Harpagosid ist dabei sowohl im underivatisierten Zustand (284 nm) als auch nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz (507 nm) zu quantifizieren. Im Gegensatz dazu, kann die Quantifizierung des zweiten Iridoids, Harpagid nur im derivatisierten Zustand (507 nm) vorgenommen werden. Da das ChP in der Monographie von *Scrophulariae radix* (*Scrophulariae Radix*, **2010**) zur HPLC-DAD Gehaltsbestimmung als Extraktionsmittel jedoch Methanol 50% (V/V) verwendet und die Methoden (HPLC-HPTLC) zu vergleichbaren Ergebnissen führen sollten, war eine vergleichende Quantifizierung per HPLC und Densitometrie Gegenstand weiterführender Versuche. Zwei authentische Drogenmuster (Probe Caelo und Probe Arobemed) wurden je dreimal mit Ethanol 90% (V/V) und Methanol 50% (V/V) extrahiert (3.2.3.1.2, Methoden VII und VIII) und deren Gehalt an Harpagid und Harpagosid, mit Hilfe einer Kalibriergeraden, ermittelt. Abbildung 34 zeigt das zugehörige HPLC-Chromatogramm (210 nm) und Abbildung 35 das HPTLC-Chromatogramm mit den Referenzsubstanzen und Extrakten.

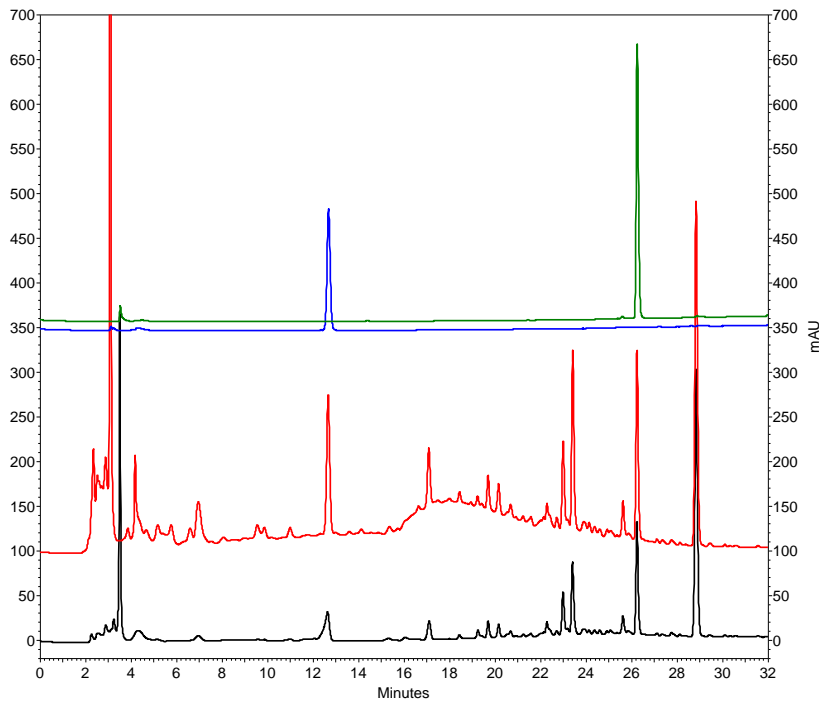
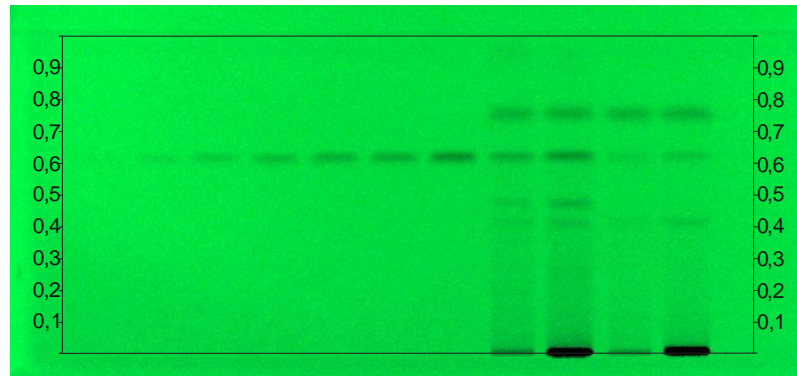
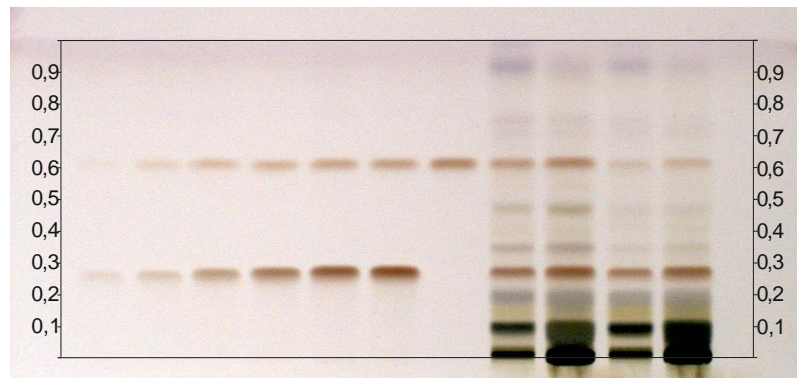


Abbildung 34 HPLC-Chromatogramm (210 nm, Methode VIII, 3.2.3.1.2) von einer *Scrophulariae radix* Probe (Arobemed) extrahiert mit Ethanol 90% (V/V, schwarze Linie), **Methanol 50% (V/V, rote Linie)**, **Harpagid** (0,338 mg/ml, blaue Linie) und **Harpagosid** (0,0994 mg/ml, grüne Linie), Injektionsvolumen je 10 μ l, mobile Phase bestehend aus 0,03% (V/V) wässr. Phosphorsäure (A) und Acetonitril (B), Gradient Tabelle 14 (3.2.3.1.2), 0,800 ml/min, 25 °C.

Teilabbildung A



Teilabbildung B



Bahn

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Abbildung 35 HPTLC-Chromatogramm (bei 254 nm \rightarrow Teilabbildung A, nach Derivatisierung bei Tageslicht \rightarrow Teilabbildung B) nach Methode VII (3.2.3.1.2): Bahn 1: Harpagosid 0,0124 mg/ml (5 μ l) und Harpagid 0,0338 mg/ml (5 μ l), Bahn 2 Harpagosid 0,0398 mg/ml (5 μ l) und Harpagid 0,0676 mg/ml (5 μ l), Bahn 3: Harpagosid 0,0795 mg/ml (5 μ l) und Harpagid 0,1690 mg/ml (5 μ l), Bahn 4: Harpagosid 0,0994 mg/ml (5 μ l) und Harpagid 0,3380 mg/ml (5 μ l), Bahn 5: Harpagosid 0,1243 mg/ml (5 μ l) und Harpagid 0,5408 mg/ml (5 μ l), Bahn 6: Harpagosid 0,1491 mg/ml (5 μ l) und Harpagid 0,6760 mg/ml (5 μ l), Bahn 7: Harpagosid 0,2485 mg/ml (5 μ l), Bahn 8: Caelo Ethanol 90% (V/V) (5 μ l), Bahn 9: Caelo Methanol 50% (V/V) (5 μ l), Bahn 10: Arobemed Ethanol 90% (V/V) (5 μ l), Bahn 11: Arobemed Methanol 50% (V/V); Fließmittel: Dichlormethan:Ethanol:Wasser (70:45:6,5, V/V/V), Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand).

Nach Auswertung der erhaltenen Chromatogramme konnten Kalibriergeraden der einzelnen zu quantifizierenden Substanzen aufgestellt (Tabellen 35 und 36) und die Gehalte der Analyten in den Extrakten berechnet werden.

Tabelle 35 Zur Quantifizierung von Harpagosid und Harpagid (HPTLC) verwendete Kalibrierfunktionen mit zugehöriger Detektionswellenlänge [nm].

HPTLC	Wellenlänge [nm]	Kalibrierfunktion
Harpagosid	284	$y = -103777,7754 x^2 + 66183,5533x + 117,3473$
Harpagosid	507	$y = -176481,9193 x^2 + 88802,5677x + 540,3040$
Harpagid	507	$y = -48470,8380 x^2 + 61535,9521x + 2369,6181$

Tabelle 36 Zur Quantifizierung von Harpagosid und Harpagid (HPLC) verwendete Kalibrierfunktionen mit zugehöriger Detektionswellenlänge [nm].

HPLC	Wellenlänge [nm]	Kalibrierfunktion
Harpagosid	280	$y = -76697393,8569x^2 + 161954929,1786x - 493248,5189$
Harpagid	205	$y = -4457714,0865 x^2 + 36110993,0582x - 4436,8696$

Da die Möglichkeit bestand, Harpagosid sowohl im underivatisierten Zustand als auch nach Derivatisierung zu quantifizieren und abschließend ein Vergleich zwischen den beiden Möglichkeiten gezogen werden sollte, wurden für dieses Iridoidglykosid zwei Kalibriergeraden erstellt.

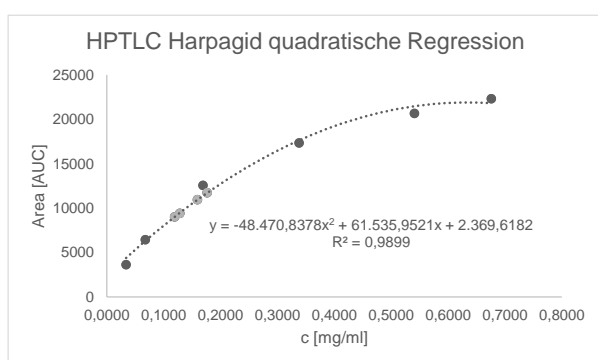
In Tabelle 37 ist der Gehalt [%] an Harpagid und Harpagosid in zwei verschiedenen Scrophulariae radix-Extrakten, erhalten mit den beiden Lösungsmitteln Ethanol 90% (V/V) und Methanol 50% (V/V) und ermittelt per HPLC-DAD bzw. Densitometrie, für zwei Herkünfte gegenübergestellt.

Tabelle 37 Durchschnittlicher Gehalt [%] (\pm Standardabweichungen) von Harpagid und Harpagosid in zwei verschiedenen Scrophulariae radix Proben, nach Extraktion mittels Ethanol 90% (V/V) und Methanol 50% (V/V), detektiert nach Methode VII und VIII (3.2.3.1.2, je n=3)

Probe	Gehalt [%] HPTLC (\pm Stabw)			Gehalt [%] HPLC (\pm Stabw)	
	Harpagosid 284 nm	Harpagosid 507 nm	Harpagid 507 nm	Harpagid 205 nm	Harpagosid 280 nm
Arobemed Ethanol 90% (V/V)	0,0487 \pm 0,0021	0,0397 \pm 0,0013	0,1190 \pm 0,0074	0,14058 \pm 0,0050	0,0387 \pm 0,0007
Arobemed Methanol 50% (V/V)	0,0684 \pm 0,0046	0,0620 \pm 0,0027	0,1763 \pm 0,0126	0,37731 \pm 0,0031	0,0599 \pm 0,0011
Caelo Ethanol 90% (V/V)	0,1192 \pm 0,0076	0,0989 \pm 0,0049	0,1282 \pm 0,0033	0,16364 \pm 0,0065	0,1315 \pm 0,0005
Caelo Methanol 50% (V/V)	0,1665 \pm 0,0089	0,1429 \pm 0,0046	0,1592 \pm 0,0052	0,46470 \pm 0,0033	0,2170 \pm 0,0038

Durch die Extraktion mit Methanol 50% (V/V) nach ChP Gehaltsbestimmung (Scrophulariae Radix, **2010**) wurden im Vergleich zu Ethanol 90% mit HPLC-UV-DAD höhere Gehalte sowohl für Harpagid, als auch für Harpagosid, detektiert. Im Gegensatz dazu verlor die Auftrennung des Methanol 50% Extraktes an Qualität, die Banden der beiden Iridoide im HPTLC-Densitogramm waren breiter und weniger scharf (Abbildung 35, Bahn 9/11 vs. 8/10). Da bei einer densitometrischen Quantifizierung, die Detektion im underivatisierten Zustand empfohlen wird (Reich and Schibli, **2007**), wurde der Gehalt an Harpagosid sowohl im un- als auch im derivatisierten Zustand ermittelt. Im Vergleich lagen die Gehalte, ermittelt durch die derivatisierte Platte durchweg unter denen der underivatisierten. Die Vermutung, dass durch den zusätzlichen Analysenschritt des Tauchens der Platte in Anisaldehyd größere Schwankungen in den Ergebnissen (\pm Standardabweichung) auftreten können, wurde in diesem kleinen Maßstab nicht bestätigt. Beim Vergleich der Gehalte nach Quantifizierung mittels unterschiedlicher Methoden (HPLC gegenüber HPTLC) fiel auf, dass die Ergebnisse von Harpagosid sich in ähnlichen Größenordnungen befanden, wohingegen der Gehalt an Harpagid, vor allem extrahiert mittels Methanol 50% (V/V) zu deutlichen Unterschieden je nach analytischer Methode führte. Mögliche Ursache könnte eine Sättigung der Harpagidbande sein, die eine exakte Quantifizierung erschwert (Reich and Schibli, **2007**). Obwohl für die Absorbanzmessung (Remissionstyp) eine polynomische Kalibrierfunktion am besten geeignet scheint (Reich and Schibli, **2007**), liegt in diesem Fall nahe, dass sowohl die Konzentration der Referenzlösungen, als auch die der Extrakte nicht mehr in einem korrekt detektierbaren Bereich außerhalb eines linearen oder zumindest pseudolinearen Bereich lagen (vgl. Abbildung 36 mit Teilabbildung A und B).

Teilabbildung A



Teilabbildung B

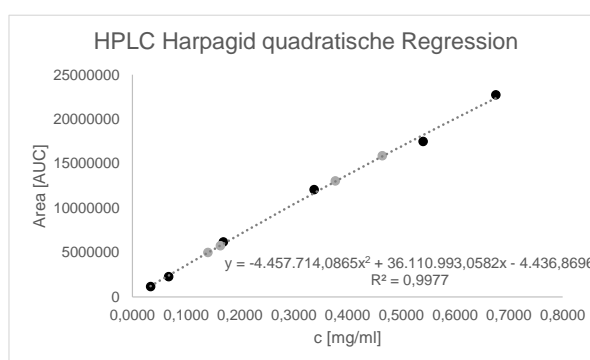


Abbildung 36 Kalibrierfunktion zur densitometrischen Quantifizierung von Harpagid (**Teilabbildung A**) und Kalibrierfunktion zur Gehaltsbestimmung per HPLC (**Teilabbildung B**) mit Signalen für die **Verdünnungen der Harpagidlösungen** (schwarz) und der **einzelnen Extrakte** (grau).

Obwohl sich in beiden Fällen eine polynomische Regression zweiten Grades angeboten hatte, lässt die Graphik erkennen, dass der Konzentrationsbereich für die Quantifizierung per Densitometrie (Teilabbildung A) nicht durchweg geeignet ist. Als Lösungsansatz wäre eine zusätzliche Verdünnung der Probe, oder eine Einengung des Kalibrierbereiches auf den unteren Bereich, zumindest zur Quantifizierung von Harpagosid denkbar, um in einen

pseudolinearen Bereich zu gelangen. Instabilitäten der Extrakte auf der Platte, in Lösung und während der Chromatographie wurden für beide Extraktionsmittel untersucht und konnten ausgeschlossen werden. Da jedoch in Rahmen der Monographieentwicklung für *Scrophulariae radix*, die Vorgaben des ChP (*Scrophulariae Radix*, **2010**) nicht außer Acht gelassen werden sollten, um bei der Gehaltsbestimmung vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurde Methanol 50% (V/V) als Extraktionsmittel ausgewählt. In Anbetracht der vorgestellten Ergebnisse, bringt dieses Lösungsmittel jedoch beträchtliche Nachteile, wie den Verlust an Bandenschärfe und eine übersättigte Harpagidbande mit sich, wodurch die densitometrische Quantifizierung der beiden Iridoide für die Monographie des DAB nicht weiterverfolgt wurde.

3.3.9 Gehaltsbestimmung mittels HPLC

3.3.9.1 Methodenevaluierung und Entwicklung

Für die Quantifizierung der beiden Iridoide, Harpagid und Harpagosid, per HPLC-DAD wurden existierende Methoden evaluiert, gegebenenfalls optimiert und eine geeignete Methode validiert.

Das Extraktionsprozedere der Methode nach dem ChP (*Scrophulariae Radix*, **2010**) (Methode IX und Methode X, 3.2.3.2.1) ist sehr zeitintensiv (105 min). Da das ChP keine Angaben zur Flussrate und Säulenofentemperatur macht, wurde die Analyse sowohl mit einem Flow von 0,800 ml/min in Kombination mit einer Säulenofentemperatur von 25 °C (Methode IX, 3.2.3.2.1, Abbildung 37) als auch mit einer Flussrate von 1,000 ml/min mit einer Säulenofentemperatur von 40 °C (Methode X, 3.2.3.2.1, Abbildung 38) durchgeführt. Die Retentionszeiten der beiden Analyten betragen 12,8 min für Harpagid und 26,3 min für Harpagosid nach Methode IX und 10,3 min für Harpagid und 25,0 min für Harpagosid nach Methode X. Wie den Abbildungen 37 und 38 zu entnehmen ist, sind die Signale der beiden Iridoide deutlich voneinander und auch von anderen Signalen im Chromatogramm des Extraktes getrennt. Die lange Extraktionszeit und die späte Elution von Harpagid und Harpagosid bieten mögliche Ansätze für die Optimierung der Methode.

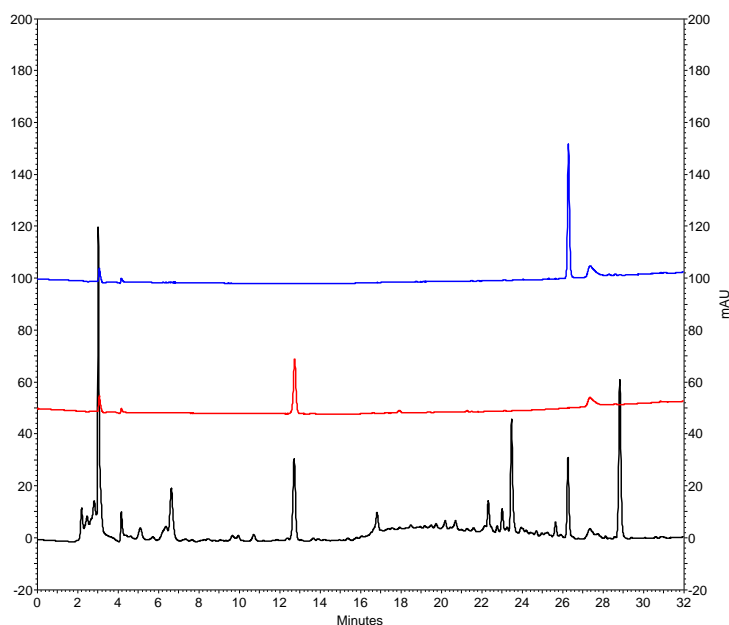


Abbildung 37 HPLC-Chromatogramm (210 nm, Methode IX, 3.2.3.2.1) von einer *Scrophulariae radix* Probe (**Sinophyto**, schwarz) mit den beiden Iridoiden **Harpagid** (60 µg/ml, rot) und **Harpagosid** (20 µg/ml, blau), Injektionsvolumen je 10 µl, mobile Phase bestehend aus 0,03% (V/V) Phosphorsäure (A) und Acetonitril (B), Gradient Tabelle 17 (3.2.3.2.1), 0,800 ml/min, 25 °C.

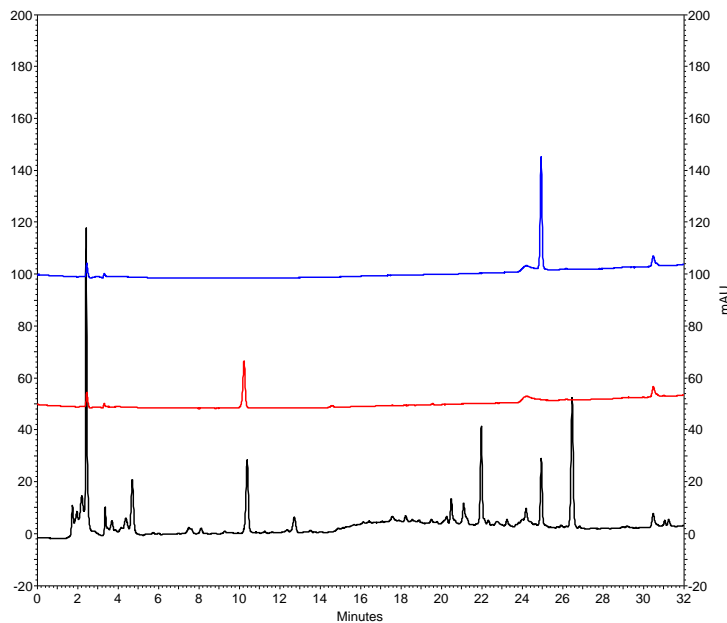


Abbildung 38 HPLC-Chromatogramm (210 nm, Methode X, 3.2.3.2.1) von einer Scrophulariae radix Probe (**Sinophyto**, schwarz) mit den beiden Iridoiden **Harpagid** (60 µg/ml, rot) und **Harpagosid** (20 µg/ml, blau), Injektionsvolumen je 10 µl, mobile Phase bestehend aus 0,03% (V/V) Phosphorsäure (A) und Acetonitril (B), Gradient Tabelle 18 (3.2.3.2.1), 1,000 ml/min, 40 °C.

Da das Ph.Eur. in der Monographie von Teufelskrallenwurzel (Teufelskrallenwurzel, **2017**) die Quantifizierung von Harpagosid vorschreibt, wurde auch diese Methode (Methode XI, 3.2.3.2.1) für Extrakte von Scrophulariae radix evaluiert. Wie Abbildung 39 zu entnehmen ist, konnte in beiden Extrakten Harpagosid deutlich mit einer Retentionszeit von 22,3 min detektiert werden. Da die Methode und der Gradient auf die Quantifizierung von Harpagosid ausgerichtet und Harpagid zudem bei einer Wellenlänge von 278 nm nicht zu detektieren ist, lässt sich kein Signal für dieses Iridoid erkennen. Da beide Iridoide mengenmäßig erfasst werden sollten sowie aufgrund der langen Extraktionszeit von vier Stunden wurde auch diese Methode als ungeeignet erachtet.

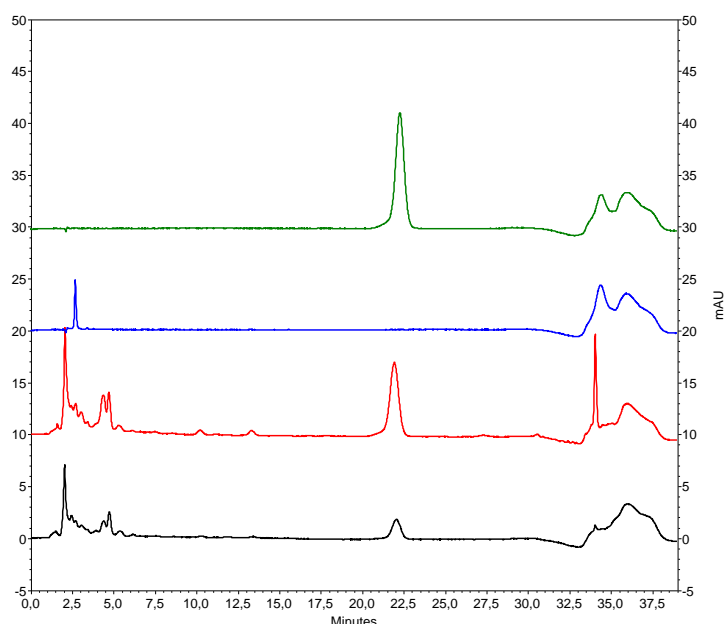


Abbildung 39 HPLC-Chromatogramm (278 nm, Methode XI, 3.2.3.2.1) von Scrophulariae radix Proben (**Chinamedica**, schwarz; **Caelo**, rot) mit den beiden Iridoiden **Harpagid** (60 µg/ml, blau) und **Harpagosid** (20 µg/ml, grün), Injektionsvolumen je 10 µl, mobile Phase bestehend aus Wasser (A) und Methanol (B), Gradient Tabelle 19 (3.2.3.2.1), 1,000 ml/min, 25 °C.

In einer Veröffentlichung von (Jing et al., 2011) wurde eine HPLC-MS-Methode entwickelt, mittels derer eine Identifizierung und Qualitätskontrolle per HPLC-Fingerprint von Scrophulariae radix Extrakten möglich sein sollte. Gegenstand der Untersuchungen waren die Verbindungen Zimtsäure, Harpagosid, Acteosid und Angorosid C. Auch diese Methode wurde evaluiert und in Abbildung 40 dargestellt.

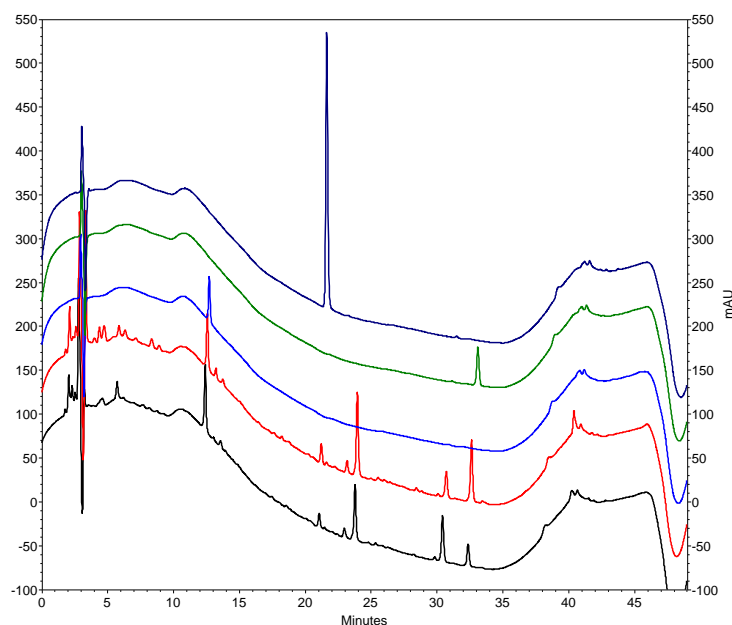


Abbildung 40 HPLC-Chromatogramm (205 nm, Methode XII, 3.2.3.2.1) von Scrophulariae radix Proben (**Sinophyto**, schwarz; **Caelo**, rot) mit **Harpagid** (60 µg/ml, blau), **Harpagosid** (20 µg/ml, grün) und **Verbascosid** (60 µg/ml, dunkelblau), Injektionsvolumen je 10 µl, mobile Phase bestehend aus 0,05% (V/V) Ameisensäure (A) und Methanol (B), Gradient Tabelle 20 (3.2.3.2.1), 1,000 ml/min, 25 °C.

Trotz der sauberen Auftrennung der Signale im Extrakt, ist auch dieser Gradient nicht geeignet, die beiden Iridoide Harpagid und Harpagosid mit einer Retentionszeit von 12,7 min

bzw. 33,1 min mittels HPLC zu quantifizieren, da durch die Zusammensetzung der mobilen Phase bei einer Auswertung bei 205 nm ein starker Basislinienshift erfolgt. Weitere Modifikationen bzgl. der Extraktion und des Gradienten orientierten sich an der Methode des ChP (Methoden IX und X, 3.2.3.2.1) (*Scrophulariae Radix*, **2010**) und führten zu einer neuen Methode (Methode XIII, 3.2.3.2.1) mittels derer die Quantifizierung der beiden Iridoide im Extrakt bei 210 nm möglich ist. Abbildung 41 zeigt einen Ausschnitt aus diesem Chromatogramm, in dem eine Probe von *Scrophulariae radix* neben den Referenzen Harpagid (R_f 8,3 min) und Harpagosid (R_f 21,9 min) dargestellt ist. Da an der ursprünglichen ChP Methode Änderungen (Extraktionsprozedur, Gradient) vorgenommen wurden, sind abschließend die beiden Methoden in einem Versuch gegenübergestellt worden. Dafür wurden je acht Proben authentischer Drogenmuster nach der Methode des ChP (Methode IX, 3.2.3.2.1) und der neu entwickelten Methode XIII (3.2.3.2.1) extrahiert und chromatographiert. Anhand einer einfachen Einpunktkalibrierung wurden die Ergebnisse der ermittelten Gehalte berechnet und miteinander verglichen.

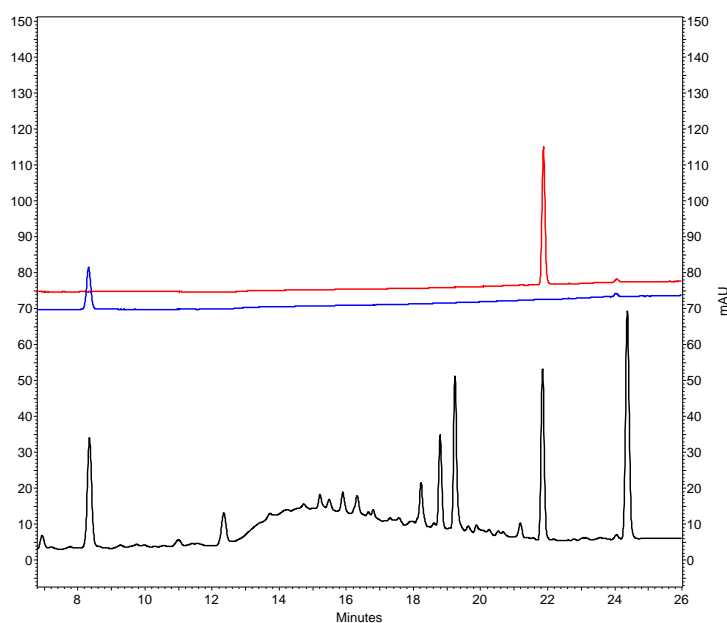


Abbildung 41 HPLC-Chromatogramm (210 nm, Methode XIII, 3.2.3.2.1) einer *Scrophulariae radix* Probe (**Yong**, schwarz) mit **Harpagid** (0,0327 mg/ml, blau) und **Harpagosid** (0,0327 mg/ml, rot), Injektionsvolumen je 10 μ l, mobile Phase bestehend aus 0,03% (V/V) wässr. Phosphorsäure (A) und Acetonitril (B), Gradient Tabelle 21 (3.2.3.2.1), 1,000 ml/min, 25 °C.

Tabelle 38 Ergebnisse (prozentualer Gehalt) aus der vergleichenden Messung von acht Proben eines *Scrophulariae radix* Extraktes, aufgearbeitet und vermessen nach Methode IX (3.2.3.2.1) und Methode XIII (3.2.3.2.1).

Methode (3.2.3.2.1)	IX (ChP)		XIII (neu)	
	Harpagid Gehalt [%]	Harpagosid Gehalt [%]	Harpagid Gehalt [%]	Harpagosid Gehalt [%]
Arobemed	0,4341	0,1009	0,4150	0,0980
Sinophyto	0,6716	0,1452	0,6418	0,1417
Caelo	0,4941	0,2540	0,4533	0,2324
Chinamedica	0,1652	0,0796	0,1664	0,0746
Yong	0,4360	0,0989	0,4127	0,0920
Herbasinica	0,2721	0,0929	0,2635	0,0841
Plantasia	0,1114	0,1669	0,1049	0,1585
Chong	0,5361	0,0961	0,5054	0,0950
Mittelwert	0,3901	0,1293	0,3704	0,1220

Tabelle 38 zeigt die Ergebnisse der Versuche anhand einer Gegenüberstellung der prozentualen Gehalte an Harpagid und Harpagosid in den verschiedenen Extrakten. Harpagid war durchschnittlich zu 0,3901% bzw. 0,3704% und Harpagosid zu 0,1293% bzw. 0,1220% enthalten. Die Gehalte, ermittelt durch Methode IX (3.2.3.2.1) lagen bei beiden Iridoiden geringfügig über den Gehalten, ermittelt durch Methode XIII (3.2.3.2.1).

Zusammenfassend betrachtet, führte die neu entwickelte Methode (Methode XIII, 3.2.3.2.1) zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Methode aus dem ChP (Methode IX, 3.2.3.2.1), mit dem Vorteil der deutlich kürzeren Extraktions- und auch Analysenzeit, so dass die neu entwickelte Methode validiert werden konnte.

3.3.9.2 Methodenvalidierung

Nachdem die Methode des ChP zur Quantifizierung der beiden Iridoide Harpagid und Harpagosid (Scrophulariae Radix, **2010**) optimiert werden konnte, wurde die neue Methode (Methode XIII, 3.2.3.2.1) nach den Vorschriften des Kapitels 3.2.3.2.2 auf die Parameter Stabilität, Spezifität, Präzision, Robustheit und Wiederfindung validiert.

Stabilität der Analyten in Lösung

Um die Stabilität der Analyten in Lösung zu untersuchen, wurde der Extrakt über einen Zeitraum von über zehn Stunden insgesamt sechzehnmal nacheinander in die HPLC injiziert und chromatographiert. Der Variationskoeffizient für die Messungen der Flächen der beiden Iridoide lag unter 5% (Tabellen 39 und 40). Die Stabilität des Extraktes über diesen Zeitraum konnte somit belegt werden.

Tabelle 39 Versuch Stabilität des Analyten in Lösung für Harpagid in einem Extrakt von Scrophulariae radix mit Ergebnissen (Fläche [AUC]) aus sechs verschiedenen Messungen mit Mittelwert, Standardabweichung (StabW) und Variationskoeffizient (V_k).

Harpagid	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6
<i>Zeit [min]</i>	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]
0-40	1117634	1124832	1131566	1158042	1177750	1138484
40-80	1118566	1124263	1123310	1104828	1156309	1116359
80-120	1114126	1129388	1124074	1142014	1183548	1170711
120-160	1122554	1132518	1129880	1148093	1199292	1135549
160-200	1118966	1132225	1133503	1120795	1150480	1178095
200-240	1122237	1128702	1129369	1120477	1198131	1118793
240-280	1123133	1131624	1124680	1117290	1175077	1126841
280-320	1120790	1135750	1126466	1131907	1178840	1125239
320-360	1120465	1137638	1124867	1168082	1142337	1130919
360-400	1121512	1136262	1114517	1152900	1155026	1109912
400-440	1123231	1130857	1125531	1113939	1161870	1119536
440-480	1118900	1155422	1121206	1166385	1153450	1151503
480-520	1122318	1132541	1123768	1166275	1151125	1104480
520-560	1115715	1130614	1121368	1170232	1148681	1162763
560-600	1119592	1134231	1112795	1164323	1156047	1158475
600-640	1122529	1125404	1115483	1171161	1163939	1163278
<i>Mittelwert</i>	1120142	1132642	1123899	1144796	1165744	1138184
<i>StabW</i>	2700	7245	5909	23227	17602	23044
V_k	0,24	0,64	0,53	2,03	1,51	2,02

Tabelle 40 Versuch Stabilität des Analyten in Lösung für Harpagosid in einem Extrakt von Scrophulariae radix mit Ergebnissen (Fläche [AUC]) aus sechs verschiedenen Messungen mit Mittelwert, Standardabweichung (StabW) und Variationskoeffizient (V_K).

Harpagosid	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6
Zeit [min]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]
0-40	1234213	1258480	1238382	1252058	1253706	1226846
40-80	1234646	1259561	1224885	1192205	1231311	1210316
80-120	1202683	1258926	1227775	1236156	1268925	1267879
120-160	1240262	1260010	1244732	1245150	1281611	1234644
160-200	1235213	1261480	1232523	1217147	1223847	1272162
200-240	1239006	1255872	1228925	1220349	1280456	1209939
240-280	1238248	1259394	1230810	1217386	1256690	1222233
280-320	1234933	1262954	1231848	1231700	1255070	1218267
320-360	1236284	1269548	1232589	1270439	1222283	1231343
360-400	1238038	1267104	1220713	1257528	1232934	1203809
400-440	1238930	1260371	1230261	1210888	1236984	1218592
440-480	1237597	1279839	1228947	1268568	1233552	1250814
480-520	1241937	1265680	1230426	1274444	1229197	1198084
520-560	1237185	1263005	1231325	1277684	1233814	1266138
560-600	1237575	1263005	1224307	1278689	1241318	1258881
600-640	1243789	1260420	1227093	1277390	1255575	1270213
Mittelwert	1235659	1262853	1230346	1245486	1246079	1235010
StabW	8883	5520	5391	27245	18468	24821
V_K	0,72	0,44	0,44	2,19	1,48	2,01

Spezifität

Um die Spezifität der Methode zu belegen, wurden zum einen die UV-Spektren der Referenzsubstanzen mit denen der zugehörigen Signale im Extrakt verglichen und zum anderen die Auflösung (R_s) der Peaks zu den nächstgelegenen Peaks im Extrakt graphisch ermittelt. Harpagid eluierte bei allen Proben zwischen 8,3 und 8,4 min und Harpagosid bei 21,8-21,9 min. Für die Auflösung R_s ergaben sich exemplarisch an einem charakteristischen Chromatogramm die Werte 1,27 (Harpagid) und 1,82 (Harpagosid). Die Spezifität der Methode war somit entsprechend den Anforderungen belegt.

Kalibrierung

Messbereich (Range)

Zur Festlegung des Messbereiches wurden zunächst Stammlösungen der Analyten angefertigt, verdünnt (1:10, 1:100 und 1:200; Tabelle 41) und zusammen mit acht frisch extrahierten authentischen Drogenextrakten chromatographiert (Tabelle 42).

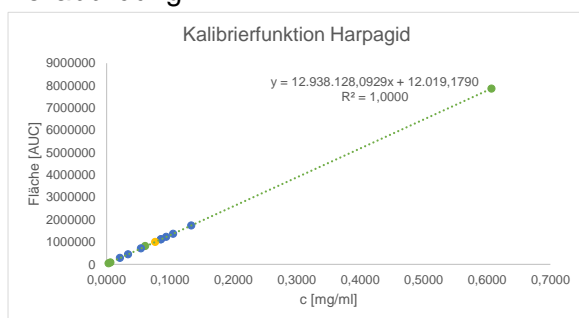
Scrophulariae radix (*Scrophularia ningpoensis* HEMSL.)

Tabelle 41 Konzentrationen [mg/ml] und Signalwerte [AUC] der beiden Iridoide zur Festlegung des Kalibrierbereiches.

Harpagid	<i>Stammlösung</i>	1:10	1:100	1:200
<i>c</i> [mg/ml]	0,6070	0,0607	0,0061	0,0030
Signal [AUC]	7863469	818719	81692	40787
Harpagosid	<i>Stammlösung</i>	1:10	1:100	1:200
<i>c</i> [mg/ml]	0,4280	0,0428	0,0043	0,0021
Signal [AUC]	28864891	2991986	299296	148534

Zur Veranschaulichung der ermittelten Daten wurde je eine Kalibriergerade erstellt, die Konzentrationen an Harpagid und Harpagosid der einzelnen Proben errechnet und eine Graphik angefertigt (Abbildung 42 mit Teilabbildungen A und B).

Teilabbildung A



Teilabbildung B

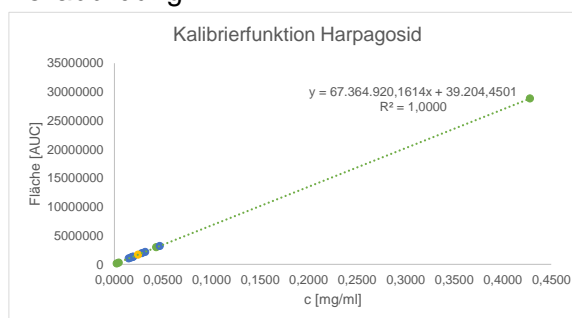


Abbildung 42 Kalibriergeraden der beiden Analyten Harpagid (**Teilabbildung A**) und Harpagosid (**Teilabbildung B**) erstellt aus den Messwerten Tabelle 41. In **grün** dargestellt sind die Kalibrierpunkte, **blau** die unterschiedlichen Proben und die Farbe **Gelb** soll den Mittelwert der Proben verdeutlichen.

Tabelle 42 Signal [AUC] und errechnete *c* [mg/ml] an Harpagid und Harpagosid in den verschiedenen Pflanzenextrakten bestimmt nach der Kalibrierfunktion aus Tabelle 41 und Abbildung 42.

Probe	<i>Signal</i> [AUC] <i>Harpagid</i>	<i>c</i> [mg/ml] <i>Harpagid</i>	<i>Signal</i> [AUC] <i>Harpagosid</i>	<i>c</i> [mg/ml] <i>Harpagosid</i>
<i>Arobermed</i>	1122971	0,0859	1338266	0,0193
<i>Sinophyto</i>	1736915	0,1333	1935411	0,0281
<i>Caelo</i>	1226598	0,0939	3174281	0,0465
<i>Chinamedica</i>	450170	0,0339	1018909	0,0145
<i>Yong</i>	1116748	0,0854	1256389	0,0181
<i>Herbasinica</i>	713083	0,0542	1148516	0,0165
<i>Plantasia</i>	283993	0,0210	2164283	0,0315
<i>Chong</i>	1367705	0,1048	1296903	0,0187

Ausgehend vom rechnerischen arithmetischen Mittel der Konzentrationen der Analyten in den Drogenproben wurde ein entsprechender Kalibrierbereich festgelegt und die einzelnen Kalibrierlösungen (Level 1-6, Tabelle 43) möglichst äquidistant über diesen Bereich verteilt.

Kapitel 3

Tabelle 43 Festgelegte Konzentrationen [mg/ml] für die Kalibrierfunktion der beiden Marker Harpagid und Harpagosid.

Harpagid	<i>Level 1</i>	<i>Level 2</i>	<i>Level 3</i>	<i>Level 4</i>	<i>Level 5</i>	<i>Level 6</i>
c [mg/ml]	0,0163	0,0327	0,0653	0,0980	0,1306	0,1633
Harpagosid	<i>Level 1</i>	<i>Level 2</i>	<i>Level 3</i>	<i>Level 4</i>	<i>Level 5</i>	<i>Level 6</i>
c [mg/ml]	0,0072	0,0144	0,0288	0,0431	0,0575	0,0719

Kalibrierfunktion

Die Kalibrierlösungen wurden jeweils aus zwei frisch angefertigten Stammlösungen von Harpagid und Harpagosid hergestellt. Ausgehend von jeder Stammlösung wurden in je drei unabhängigen Verdünnungsreihen drei Kalibriergeraden angefertigt und nach Methode XIII (3.2.3.2.1) chromatographiert. Somit wurde jeder Messpunkt in sechsfacher Ausführung (in Duplikaten) vermessen (Tabellen 44 und 45).

Tabelle 44 Gemessene Flächen [AUC] für die unterschiedlichen Kalibrierlösungen von Harpagid.

Harpagid		<i>Level 6</i>	<i>Level 5</i>	<i>Level 4</i>	<i>Level 3</i>	<i>Level 2</i>	<i>Level 1</i>
<i>Messung</i>	c [mg/ml]	0,1633	0,1306	0,0980	0,0653	0,0327	0,0163
1	Fläche [AUC]	2167861	1738736	1301039	891330	433352	214951
2	Fläche [AUC]	2207922	1738136	1315513	890795	440315	220837
3	Fläche [AUC]	2169040	1737672	1336498	877630	439224	220515
4	Fläche [AUC]	2104571	1669810	1240756	843855	411208	211642
5	Fläche [AUC]	2092322	1647029	1239983	831281	422392	212018
6	Fläche [AUC]	2094306	1654535	1241289	846809	413579	208342
Mittelwert	Fläche [AUC]	2139337	1697653	1279180	863616	426678	214717
StabW	Fläche [AUC]	48676	45001	43662	26160	12784	5070
V_K	[%]	2,28	2,65	3,41	3,03	3,00	2,36

Scrophulariae radix (*Scrophularia ningpoensis* HEMSL.)

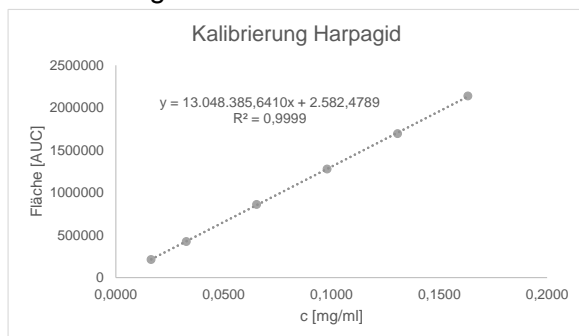
Tabelle 45 Gemessene Flächen [AUC] für die unterschiedlichen Kalibrierlösungen von Harpagosid.

Harpagosid		<i>Level 6</i>	<i>Level 5</i>	<i>Level 4</i>	<i>Level 3</i>	<i>Level 2</i>	<i>Level 1</i>
<i>Messung</i>	<i>c</i> [mg/ml]	0,0719	0,0575	0,0431	0,0288	0,0144	0,0072
1	Fläche [AUC]	5125292	4035482	3108320	2071738	1018341	528184
2	Fläche [AUC]	5172797	4106213	3068472	2045869	1030363	526210
3	Fläche [AUC]	5135546	4067764	3129748	2040694	1006660	517514
4	Fläche [AUC]	4811507	3789667	2892149	1952315	972629	487162
5	Fläche [AUC]	4965987	3775066	2957052	1963122	993838	493454
6	Fläche [AUC]	4863465	3817179	2896943	1914117	977631	498024
Mittelwert	Fläche [AUC]	5012432	3931895	3008781	1997976	999910	508425
StabW	Fläche [AUC]	153838	153337	106669	63074	22760	17741
V_k	[%]	3,07	3,90	3,55	3,16	2,28	3,49

a) Lineare Regression

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden die Mittelwerte aus den Flächenmessungen (Tabellen 44 und 45) gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Die lineare Regression wurde ebenfalls mit Hilfe der Formeln aus Kapitel 3.2.3.2.2 (Kalibrierung, Kalibrierfunktion, a) lineare Regression) rechnerisch erstellt.

Teilbildung A



Teilabbildung B

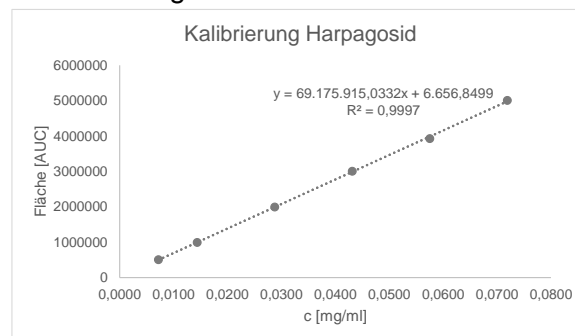


Abbildung 43 Lineare Kalibrierfunktionen der beiden Analyten Harpagid (**Teilabbildung A**) und Harpagosid (**Teilabbildung B**).

Für die Reststandardabweichung s_y (Formel 8) ergaben sich die Werte 7274,17 (Harpagid) und 32634,88 (Harpagosid).

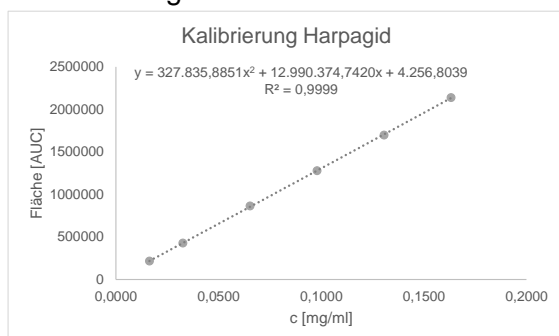
Zur Berechnung der Verfahrensstandardabweichung s_{x0} wurde Formel 9 verwendet und ergaben die Werte 0,0006 (Harpagid) und 0,0005 (Harpagosid).

Die relative Standardabweichung V_{x0} nach Formel 10 führte für Harpagid zu einem Wert von 0,66% und für Harpagosid zu 1,27%.

b) Quadratische Regression

Aus den gemessenen Werten (Tabellen 44 und 45) wurde eine quadratische Regression erstellt, zur Errechnung der Parameter wurden die Formeln aus Kapitel 3.2.3.2.2 (Kalibrierung, Kalibrierfunktion, b) quadratische Regression) verwendet.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

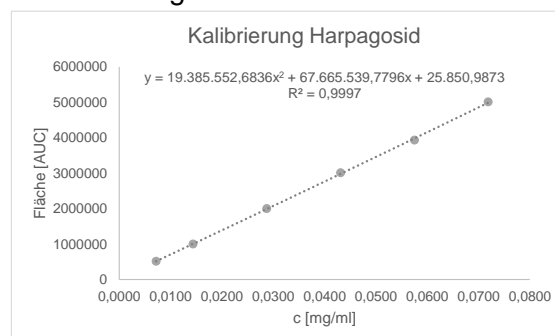


Abbildung 44 Quadratische Regression der beiden Analyten Harpagid (**Teilabbildung A**) und Harpagosid (**Teilabbildung B**).

Die Parameter Reststandardabweichung s_y , Verfahrensstandardabweichung s_{x0} und relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} wurden ebenfalls für die quadratische Regression berechnet und führten zu folgenden Ergebnissen:

- s_y : 8341,29 (Harpagid) und 35944,63 (Harpagosid)
- s_{x0} : 0,0006 (Harpagid) und 0,0005 (Harpagosid)
- V_{x0} : 0,76% (Harpagid) und 1,40% (Harpagosid).

Ein Anpassungstest nach Mandel für die quadratische und lineare Regressionskurve für Harpagid und Harpagosid entfiel, da die Verfahrensstandardabweichungen der linearen Regression kleiner waren als die der quadratischen. Aus diesem Grund wurde für beide Iridoide eine lineare Regression akzeptiert.

Wiederholpräzision

Für den Validierungsparameter Wiederholpräzision wurde eine Probe authentischen Drogenmaterials sechsmal an einem Tag unabhängig voneinander extrahiert und chromatographiert.

Scrophulariae radix (*Scrophularia ningpoensis* HEMSL.)

Tabelle 46 Ergebnisse mit Fläche [AUC], c [mg/ml] und Gehalt [%] aus dem Versuch Wiederholpräzision.

Harpagid	Fläche [AUC]	c [mg/ml]	Gehalt [%]
Yong 1	1118100	0,0855	0,4275
Yong 2	1116748	0,0854	0,4269
Yong 3	1121694	0,0858	0,4288
Yong 4	1129623	0,0864	0,4319
Yong 5	1124623	0,0860	0,4300
Yong 6	1127438	0,0862	0,4310
Mittelwert	1123038	0,0859	0,4293
StabW	5118	0,0004	0,0020
V_K	0,46	0,46	0,46
Harpagosid	Fläche [AUC]	c [mg/ml]	Gehalt [%]
Yong 1	1234430	0,0177	0,0887
Yong 2	1256389	0,0181	0,0903
Yong 3	1227582	0,0176	0,0882
Yong 4	1250535	0,0180	0,0899
Yong 5	1259105	0,0181	0,0905
Yong 6	1231633	0,0177	0,0885
Mittelwert	1243279	0,0179	0,0894
StabW	13677	0,0002	0,0010
V_K	1,10	1,11	1,11

Die Ergebnisse (Tabelle 46) aus dem Versuch Wiederholpräzision zeigten keine Abweichungen (V_K), die größer als 5% waren, der Test wurde somit akzeptiert.

Laborpräzision

Für den Versuch Laborpräzision wurde eine Probe chinesischer Importware an sechs verschiedenen Tagen extrahiert, chromatographiert und deren Gehalte an Harpagid und Harpagosid verglichen.

Tabelle 47 Ergebnisse mit Fläche [AUC], c [mg/ml] und Gehalt [%] aus dem Versuch Laborpräzision.

Harpagid	Area [AUC]	c [mg/ml]	Gehalt [%]
Yong 1	1129623	0,0864	0,4319
Yong 2	1137131	0,0869	0,4347
Yong 3	1127041	0,0862	0,4309
Yong 4	1119379	0,0856	0,4279
Yong 5	1124747	0,0860	0,4300
Yong 6	1110530	0,0849	0,4246
Mittelwert	1124742	0,0860	0,4300
StabW	9092	0,0007	0,0035
V_K	0,81	0,81	0,81

Harpagosid	Area [AUC]	c [mg/ml]	Gehalt [%]
<i>Yong 1</i>	1250535	0,0180	0,0899
<i>Yong 2</i>	1248329	0,0179	0,0897
<i>Yong 3</i>	1232933	0,0177	0,0886
<i>Yong 4</i>	1254708	0,0180	0,0902
<i>Yong 5</i>	1236207	0,0178	0,0889
<i>Yong 6</i>	1247999	0,0179	0,0897
Mittelwert	1245118	0,0179	0,0895
StabW	8577	0,0001	0,0006
V_K	0,69	0,69	0,69

Wie Tabelle 47 zu entnehmen ist, zeigten die Ergebnisse aus dem Versuch Laborpräzision keine größeren Abweichungen. Der Test konnte akzeptiert werden.

Probenauswertung und Prognoseintervall

Für den Versuch Probenauswertung und Prognoseintervall wurden zunächst alle Proben sechsmal unabhängig voneinander extrahiert, chromatographiert und deren Ergebnisse anhand der Konzentrationen [mg/ml] verglichen. Zur Abschätzung des statistischen Fehlers wurde zudem der Vertrauensbereich (VB; Formeln 34 und 35) jeder Probe mit Hilfe von Formel 36 berechnet. Ergebnisse dieses Experimentes und dieser Berechnungen sind in Tabelle 48 aufgeführt.

Tabelle 48 Konzentration [mg/ml], Standardabweichung [mg/ml] und V_K [%] der Proben nach Extraktion und Chromatographie (n=6). PI entspricht dem Prognoseintervall, berechnet nach Formel 36.

Harpagid	c [mg/ml]	StabW [mg/ml]	V_K [%]	±PI
<i>Yong</i>	0,0859	0,0004	0,46	0,0009
<i>Herbasinica</i>	0,0539	0,0014	2,64	0,0010
<i>Arobemed</i>	0,0854	0,0015	1,73	0,0009
<i>Chinamedica</i>	0,0337	0,0014	4,23	0,0011
<i>Caelo</i>	0,0933	0,0025	2,65	0,0009
<i>Sinophyto</i>	0,1303	0,0032	2,44	0,0011
<i>Chong</i>	0,1050	0,0016	1,50	0,0009
Harpagosid	c [mg/ml]	StabW [mg/ml]	V_K [%]	±PI
<i>Yong</i>	0,0179	0,0002	1,11	0,0009
<i>Herbasinica</i>	0,0171	0,0005	2,77	0,0009
<i>Arobemed</i>	0,0187	0,0004	2,39	0,0009
<i>Chinamedica</i>	0,0146	0,0004	2,87	0,0009
<i>Caelo</i>	0,0465	0,0009	1,98	0,0008
<i>Sinophyto</i>	0,0272	0,0007	2,41	0,0008
<i>Chong</i>	0,0182	0,0004	2,14	0,0009

Robustheit

Um die Methode auf ihre Robustheit hin zu überprüfen wurden die zwei Parameter, Säulenofentemperatur ($\pm 5\text{ °C}$) und Extraktionszeit im Ultraschallbad (+ 10 min), in der Methode variiert.

Tabelle 49 Mittelwerte der Konzentration [mg/ml] an Harpagid und Harpagosid vermessen zu drei verschiedenen Säulenofentemperaturen (je n=6) und Vergleich der drei Mittelwerte ebenfalls per Mittelwert [MW] und V_K .

Harpagid	30 °C	25 °C	20 °C	MW	V_K
c [mg/ml]	0,0843	0,0833	0,0826	0,0834	1,00
StabW	0,0019	0,0018	0,0014		
V_K	2,23	2,18	1,75		
Harpagosid	30 °C	25 °C	20 °C	MW	V_K
c [mg/ml]	0,0174	0,0170	0,0170	0,0171	1,15
StabW	0,0004	0,0004	0,0004		
V_K	2,44	2,07	2,18		

Die gemessenen Signale bzw. die daraus errechneten Konzentrationen zeigen V_K s unter 5%. Zudem wurden die Daten statistisch ausgewertet. Sowohl für Harpagid als auch für Harpagosid ergaben sich nach Durchführung einer einfaktoriellen ANOVA (Daten sind normalverteilt und Varianzen homogen) keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die errechneten Konzentrationen. Die Robustheit der Methode in Bezug auf die Säulenofentemperatur 25 °C ($\pm 5\text{ °C}$) war somit gegeben.

Weiterhin sollte die Extraktionszeit im Ultraschallbad um 10 min verlängert werden und so ein weiterer Robustheitsparameter untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 50 aufgeführt.

Tabelle 50 Mittelwerte der Konzentrationen [mg/ml] an Harpagid und Harpagosid vermessen nach 30 und 40 min Extraktion im Ultraschallbad (n=6) mit Standardabweichung und Variationskoeffizient.

Harpagid	40 min	30 min
c [mg/ml]	0,0879	0,0859
StabW	0,0012	0,0004
V_K	1,37	0,46
Harpagosid		
c [mg/ml]	0,0179	0,0179
StabW	0,0003	0,0002
V_K	1,82	1,11

Für die statistische Auswertung der Konzentrationsdaten von Harpagosid konnte bei einer Verlängerung der Extraktionszeit im Ultraschallbad kein signifikanter Unterschied verzeichnet werden (Daten normalverteilt, Varianzen homogen und einfaktorielle ANOVA p -Wert 0,917). Jedoch ergab die statistische Evaluation der Daten für Harpagid einen signifikanten Unterschied (Daten normalverteilt, Varianzen inhomogen daher nicht parametrischer Mann-Whitney Test p -Wert 0,010), so dass dieser Robustheitsparameter für die Konzentration an Harpagid nicht erfüllt ist.

Wiederfindungsrate

Zur experimentellen Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde der Einwaage an pulverisierter Droge an *Scrophulariae radix* zusätzlich eine definierte Menge an Harpagid (1,0 ml der Lösung 9,06 µg/ml) und Harpagosid (1,0 ml der Lösung 1,80 µg/ml) zugesetzt und dem gewohnten Extraktionsprozedere ($n=6$) unterzogen. Die errechnete und gefundene Menge an Analyt wurde in Relation zur theoretisch enthaltenen Menge gesetzt (Formel 37) und so der Quotient [%] als Wiederfindungsrate berechnet.

Tabelle 51 Ergebnisse aus dem Versuch Wiederfindung für Harpagid und Harpagosid mit Mittelwerten (MW) Standardabweichung (StabW, [%]) und V_K .

Versuch	1	2	3	4	5	6	MW	StabW	V_K
<i>Harpagid</i>	100,77	102,72	102,20	101,72	103,91	102,01	102,22	1,05	1,03
<i>Harpagosid</i>	99,71	96,91	101,60	101,52	102,37	98,56	100,11	2,10	2,10

Tabelle 51 zeigt das Ergebnis aus dem Versuch Wiederfindung. Die Rate liegt für Harpagid bei 102,22% mit einem V_K von 1,03 und für Harpagosid bei 100,11% mit einem V_K von 2,10. Der Test auf den Validierungsparameter Wiederfindung konnte akzeptiert werden.

Nachweisgrenze

Gemäß Formel 38 beträgt die Nachweisgrenze (LOD/DL) für Harpagid 1,84 µg/ml und für Harpagosid 1,56 µg/ml.

Quantifizierungsgrenze

Die Quantifizierungsgrenze (LOQ/QL) berechnet nach Formel 39 beträgt für Harpagid 5,57 µg/ml und für Harpagosid 4,72 µg/ml.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zu Scrophulariae radix

Nach der ChP Monographie von Scrophulariae radix (Scrophulariae Radix, **2010**) wird zur Herstellung der Schnittdroge die Wurzeldroge von Rhizomteilen und Verunreinigungen befreit, gewaschen, durchfeuchtet und in dünne runde oder ovale Scheiben geschnitten und getrocknet. Alternativ kann die Droge nach ChP (Scrophulariae Radix, **2010**) kurz in Wasser eingelegt, gedämpft und nach kurzem Abkühlen vor dem Trocknen in dünne Scheiben geschnitten werden. Unter dem Begriff dünne Scheiben (slices) versteht das ChP ein bis zwei mm dicke Scheiben. Der Großteil der Importware zeigte ein homogenes Erscheinungsbild mit einer hellbraunen Rinde geprägt von tiefen Längsfurchen und der schwarz gefärbten Schnittfläche. Die Schnittdicke bewegte sich zwischen 1-4 mm. Die Scheiben waren eher von ovaler oder elliptischer Form. Die wenigen Ausnahmen importierter Ware zeigten eine etwas hellere Schnittfläche und waren in annähernd runden Scheiben von 1-6 mm Dicke geschnitten.

Die Ware aus den Versuchen des Anbaus in Bayern (Baumannshof, Manching) entsprach morphologisch den Anforderungen des ChP, lediglich die Schnittform und -maße wichen ab, dies hatte aber den banalen Grund, dass die maschinellen Gegebenheiten zu diesem Zeitpunkt zum Schneiden der geforderten „Slices“ noch nicht gegeben waren (Heuberger). Da das oben beschriebene Verfahren des „Schwitzen lassens“ Auswirkungen auf das Inhaltsstoffspektrum der Droge hat, sollte dies unter standardisierten Bedingungen ablaufen. Vergleichende Untersuchungen von 44 Proben der Rohdroge und der verarbeiteten Droge, ohne genaue Darstellung der „processing“-Methoden zeigten, dass beispielsweise der Gehalt an Acteosid, Harpagosid und Zimtsäure deutlich schwanken kann (Zhang et al., **2011**). Wang und Mitarbeiter entwickelten eine UPLC-QTRAP-MS/MS Methode, um den Gehalt an Iridoidglykosiden, Phenylpropanoidglykosiden und organischen Säure in Proben von Scrophulariae radix, nach verschiedenen Methoden des „Schwitzen lassens“ zu untersuchen. Die Qualität des Drogenmaterials nach Trocknen im Ofen bei 35 °C und „Schwitzen lassen“ für drei Tage wurde als qualitativ besser im Gegensatz zu anderen Methoden (Wang et al., **2016**) bewertet. Die Arbeitsgruppe um Gang Cao, konnte eine Abnahme des Gehaltes an Harpagid und Harpagosid und eine Zunahme des Gehaltes an Catalpol und Acteosid nach dem „processing“ der Probe gemäß den Vorgaben des ChP aus verschiedenen Anbaugebieten nachweisen (Cao et al., **2015**).

Die mikroskopische Untersuchung des Drogenmaterials lieferte homogene Ergebnisse. Strukturen wie Steinzellen, Tracheen- bzw. Tracheenfragmente und parenchymatische Gewebeteile konnten in allen untersuchten Drogenproben nachgewiesen werden.

Zur Identifizierung des Drogenmaterials per Dünnschichtchromatographie (DC/HPTLC) wurden bereits bestehende Methoden aus den Monographien von Scrophulariae radix, wie die

der HKCMMS (*Scrophulariae Radix*, **2011**), des ChPs (*Scrophulariae Radix*, **2010**) und nach Wagner (*Radix Scrophulariae*, **2011**) evaluiert und auf eine praktikable und möglichst ungefährliche/untoxische Handhabung hin untersucht. Da die Methode der HKCMMS keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte, die Aufarbeitung und Chromatographie des ChPs zu zeitaufwendig und mit toxikologisch bedenklicher Fließmittelzusammensetzung (International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, **2016**) durchgeführt wird, wurde die Methode nach Wagner (*Radix Scrophulariae*, **2011**) leicht modifiziert und im Anschluss validiert. Die Identitätsbestimmung von *Scrophulariae radix* mittels der beiden Referenzsubstanzen Harpagid und Harpagosid per DC/HPTLC lieferte stabile, präzise und robuste Ergebnisse und konnte somit als Identitätsnachweis C für das DAB vorgeschlagen werden.

Die Reinheitsuntersuchungen wie Trocknungsverlust, Asche, salzsäureunlösliche Asche und wasserlösliche extrahierbare Substanzen werden vom ChP (*Scrophulariae Radix*, **2010**) sowohl für die Rohdroge als auch für die „prepared slices“ in gleicher Weise gefordert. Die Maximalwerte für die Bestimmung der Asche und salzsäureunlöslichen Asche wurden für den Monographievorschlag für das DAB übernommen. Der Wert für den maximalen Trocknungsverlust von 16,0% aus dem ChP konnte nicht übernommen werden, da ein zu hoher Wassergehalt die Qualität des Drogenmaterials wesentlich beeinträchtigen würde (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, **2007**; Sticher et al., **2015**). Der vorgeschlagene Wert wurde, in Übereinstimmung mit den durchgeführten Analyseergebnissen, auf 12,0% (m/m) korrigiert.

Da der Versuch zur Bestimmung der wasserlöslichen extrahierbaren Substanzen nach den Anforderungen des ChP durchgeführt wurde (X A Determination of extractives, **2010**) und dieses Verfahren nicht im Ph.Eur. vorhanden ist (nur in ähnlicher/angewandelter Form wie beispielsweise in der Monographie von *Poria-cocos*-Fruchtkörper (*Poria-cocos*-Fruchtkörper, **2017**)), wurde diese Reinheitsprüfung für die Implementierung der Monographie im DAB nicht übernommen.

Weiterhin sollte für die Monographie von *Scrophulariae radix* eine Gehaltsbestimmungsmethode via HPTLC/Densitometrie entwickelt werden. Die bereits vorhandene HPTLC Methode zur Identitätsbestimmung eignete sich nicht für die Quantifizierung, aufgrund der ungenügenden Auflösung der Harpagid-Bande im Fingerprint. In Zusammenarbeit mit der Firma Camag (Muttens, Schweiz), konnte eine Methode zur Quantifizierung erfolgreich entwickelt werden, die es ermöglichte, Harpagosid sowohl im derivatisierten als auch im underivatisierten Zustand und Harpagid im derivatisierten Zustand zu quantifizieren. In einem weiteren Experiment sollten die beiden Methoden, die Quantifizierung von Harpagid und Harpagosid via HPLC nach dem ChP (*Scrophulariae Radix*,

2010) mit Modifikationen und die neu entwickelte densitometrische Methode verglichen werden. Das ChP schreibt eine Extraktion mittels Methanol 50% (V/V) vor, worunter jedoch die Auftrennung bzw. Auflösung der Analyten im Densitogramm litt und zusätzliche eine relativ große Diskrepanz zwischen den Gehalten vermessen nach HPLC-Methode und HPTLC-Methode entstand. Das für die densitometrische Bestimmung gewählte und besser geeignete Extraktionsmittel Ethanol 90% (V/V) jedoch führte für Harpagid und Harpagosid zu vergleichsweise geringeren Gehalten. Da, in Anlehnung an das ChP, das Extraktionsmittel beibehalten werden sollte, die Densitometrie mit Methanol 50% (V/V) extrahiert jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte, wurde die densitometrische Methode nicht weiterverfolgt.

Um eine geeignete Methode zur Quantifizierung der beiden Iridoide, Harpagid und Harpagosid, für das DAB vorzuschlagen, wurden ebenfalls verschiedene Methoden evaluiert. Die lange Extraktionszeit und die relativ späte Elution der beiden Analyten erwiesen sich als Nachteile der Methode aus dem ChP (Scrophulariae Radix, **2010**). Die Ph. Eur. Methode für Teufelskrallenwurzel (Teufelskrallenwurzel, **2017**) schreibt nur eine Quantifizierung von Harpagosid vor und ist mit einer Extraktionszeit von vier Stunden ebenfalls zu zeitintensiv. Eine Methode aus der Literatur nach (Jing et al., **2011**) lieferte aufgrund des starken Basislinienshifts ebenfalls unzureichende Ergebnisse. Nach Modifikationen an der Methode aus dem ChP (Scrophulariae Radix, **2010**) war es möglich die beiden Analyten in einer akzeptablen Analysenzeit (Harpagid R_f 8,3 min und Harpagosid R_f 21,9 min) und nach einer verkürzten Extraktionszeit (10 min mazerieren, 30 min extrahieren) zu detektieren. Die Validierung der Methode lieferte stabile, präzise und robuste Ergebnisse sowohl für Harpagid, als auch für Harpagosid. Die Vermessung aller Proben (n=6) führte zu Ergebnissen zwischen 0,0337 und 0,1303 mg/ml für Harpagid und zwischen 0,0146 und 0,0465 mg/ml für Harpagosid. Der mittlere Gesamtgehalt beider Iridoide aller Proben lag bei 0,53% und erstreckte sich über einen Bereich von 0,24% bis 0,79%. Der nach ChP (Scrophulariae Radix, **2010**) geforderte Mindestgehalt an Harpagid und Harpagosid von 0,45% wurde entsprechend für den DAB Monographievorschlag übernommen.

4 Xanthii fructus (*Xanthium sibiricum* PATR.)

4.1 Einleitung

Xanthii fructus, auch Siberian cocklebur fruit oder zu Deutsch Sibirische Spitzklettenfrucht genannt, ist die getrocknete Frucht inklusive deren Involukren von *Xanthium sibiricum* PATR. (Abbildung 45). Nach der Ernte im Herbst, werden die Früchte getrocknet und von Fruchtsielen, Blättern und fremden Bestandteilen befreit (Xanthii Fructus, **2015**; Chen and Chen, **2012**; Arzneibuch der Chinesischen Medizin, **2005, 2010 und 2015**). Bei der Stammpflanze *Xanthium sibiricum* PATR. (Synonym: *Xanthium strumarium* subsp. *sibiricum* (PATRIN ex WIDDER) GREUTER nach (*Xanthium sibiricum* Patrin ex Widder), handelt es sich um eine einjährige 30 bis 90 cm hohe Pflanze, deren Blätter oval oder herzförmig mit einer Länge von 4-10 cm und einer Breite von 5-12 cm sind. Die Blattspreite ist ungeteilt oder unauffällig drei bis fünf lappig und zu beiden Seiten behaart. Die Blütezeit der Pflanze ist von Juli bis August, mit nachfolgender Fruchtbildung im August bis September. (Xanthii fructus, **2010**; *Xanthium sibiricum* Patrin ex Widder)

Die Chinese Herbal Medicine Materia Medica gibt als Synonyme *Xanthium indicum*, *Xanthium strumarium* und *Xanthium japonicum* für *Xanthium sibiricum* an (Xanthii Fructus, **2004**).

Teilabbildung A



Teilabbildung B



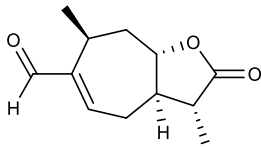
Abbildung 45 Teilabbildungen A und B mit Aufnahmen von *Xanthium sibiricum* PATR. (Xanthii fructus, **2010**).

Als Inhaltstoffe der Sibirischen Spitzklettenfrucht werden in der Literatur Fettsäuren wie z.B. Palmitin-/oder Stearinsäure (Ruan and Li, **2007**), ätherisches Öl (Ghahari et al., **2017**) und Isoflavone wie Ononin und Formononetin (Han et al., **2006**) angegeben.

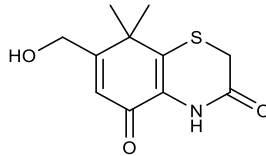
Die Arbeitsgruppe um Yu-Sheng Shi isolierte aus den Früchten sieben Sesquiterpene (u.a. Norxanthantolid E; Abbildung 46, Teilabbildung A) und zwei Lignane (u.a. (-)-7'-Dehydrosismbrifolin) (Shi et al., **2015**).

Die Isolierung von Thiazindionen aus *X. strumarium* (beispielsweise Xanthiazon, Abbildung 46, Teilabbildung B) wurden ebenso in der Literatur beschrieben (Han et al., **2006**; Ma et al., **1998**), wie das Vorkommen von Kaffeesäure, Chinasäurederivaten (1,3-O-Dicaffeoylchinasäure, 1,5-O-Dicaffeoylchinasäure) (Jiang et al., **2018**; Yang et al., **2012**) und Chlorogensäure (Abbildung 46, Teilabbildung C) (Han et al., **2007**; Han et al., **2006**; Yang et al., **2012**).

Teilabbildung A



Teilabbildung B



Teilabbildung C

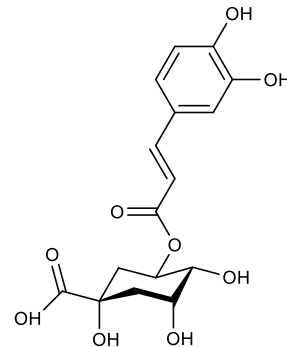


Abbildung 46 Nachgewiesene Strukturen in *Xanthii fructus*; **Teilabbildung A** Norxanthantolid E, **Teilabbildung B** Xanthiazon, **Teilabbildung C** Chlorogensäure.

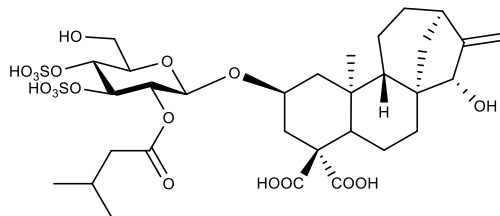
Der wässrige Extrakt der Früchte zeigt antiinflammatorische Eigenschaften in murinen Peritonealmakrophagen durch Hemmung der IFN- γ und LPS-induzierten NO Produktion und durch Hemmung der TNF- α Produktion (An et al., **2004**). Weiterhin konnte eine Mastzellvermittelte antiallergische Wirkung im Mäusemodell nachgewiesen werden (Hong et al., **2003**). Die Arbeitsgruppe um Huang Ming-Hsing zeigte in unterschiedlichen Testsystemen eine antioxidative (DPPH Radikalfängerassay), antinociceptive (Formalin-Test, Essigsäure-induzierter Krümmungstest) und anti-inflammatorische Wirkung (Carrageen-induziertes Ödem) des wässrigen Extraktes von *Xanthii fructus* (Huang et al., **2011**). Neben einem protektiven Effekt auf β -Zellen bei Typ-1-Diabetes (Song et al., **2009**) zeigte der wässrige Extrakt an Ratten u.a. eine verbesserte Glucosetoleranz und einen hemmenden Effekt auf die Fettsäureakkumulation in der Leber, was in der Therapie der nicht-alkoholischen Fettleber (NAFLD) eingesetzt werden könnte (Li et al., **2013**). Antimikrobielle, antioxidative Eigenschaften und hemmende Effekte auf die α -Glucosidase des methanolischen Extraktes der Früchte von *X. strumarium* L. wurden von (Botha et al., **2014**; Hwang et al., **2016**; Ingawale et al., **2018**) evaluiert und bestätigt.

In der TCM werden Drogen mit Stacheln oder spitziger Gestalt wie *Xanthii fructus* oder auch *Tribuli fructus* dazu verwendet die „Leitbahnen und Netzgefäße durchgängig zu machen“ (Kalg, **2009**). Daher werden die Früchte bei allergischer Rhinitis, Sinusitis oder Erkrankungen der Nasennebenhöhlen, verbunden mit einem dickflüssigen Sekret, ferner bei Kopfschmerzen

und Juckreiz durch Röteln oder Hautausschlägen eingesetzt (Xanthii Fructus, **2015**; Xanthii Fructus, **2004**; Chen and Chen, **2012**).

Neben den genannten Inhaltsstoffen und deren positiven pharmakologischen Effekten, müssen, aufgrund der (Hepato-) Toxizität die beiden Diterpene CATR und ATR (Abbildung 47 mit Teilabbildung A und B) besonders erwähnt werden (Cutler and Cole, **1983**; Obatomi et al., **1998**; Stewart and Steenkamp, **2000**; Turgut et al., **2005**; Wang et al., **2011**; Xue et al., **2014**). Die Toxizität beruht auf einer Hemmung des ADP/ATP-Transportsystemes entlang der inneren Mitochondrienmembran (Dahout-Gonzalez et al., **2006**). Detaillierter wird diese Thematik in Kapitel 4.4 (v.a. Kapitel 4.4.1) behandelt.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

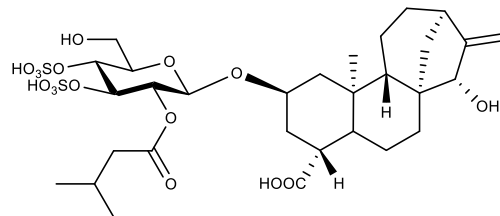


Abbildung 47 Strukturformeln der beiden Diterpene Carboxyatractylosid (CATR, C₃₁H₄₆O₁₈S₂, **Teilabbildung A**) und Atractylosid (ATR, C₃₀H₄₆O₁₆S₂, **Teilabbildung B**).

4.2 Qualitative und quantitative Analytik

4.2.1 Material und Methoden

In den Tabellen 52 und 53 finden jeweils nur Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software Erwähnung, die nicht unter 3.2 in den Tabellen 5 und 6 aufgelistet wurden.

Tabelle 52 In Kapitel 4 verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Ammoniak	Ammoniaklösung 25%, p.a.	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Ammoniumacetat	Emsure®, p.a.	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Ammoniumformiat	LC-MS	VWR, Darmstadt (Deutschland)
Diphenylboryloxyethylamin	≥ 97% (2-Aminoethyl-diphenylborinat)	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Iod	doppelt sublimiert	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Kaliumjodid	reinst	Merck, Darmstadt (Deutschland)
NaOH 1 N	0,1 mol/l, Titripur	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat	p.a.	Merck, Darmstadt (Deutschland)
<i>n</i>-Butylacetat	p.a.	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Polyethylenglykol 400	PEG 400	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Safranin	high purity (0,95%)	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Wasser	entionisiert	Universität Regensburg, Regensburg (Deutschland)
Wasser für Injektionszwecke	Wasser für Injektionszwecke Aqua ad iniectionabilia Ph.Eur.	Bayer, Leverkusen (Deutschland)
Zinkchlorid	p.a.	Merck, Darmstadt (Deutschland)

Tabelle 53 In Kapitel 4 verwendete Geräte und Software.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Biphenyl Säule (HPLC, analytisch)	LC Column 250x4,6 mm 5 µm Biphenyl 100 Å mit Vorsäule, S/No. H15-168734, B/No. 5627-0019	Phenomenex, Aschaffenburg (Deutschland)

C-18 Polar (HPLC)	Luna® Omega 3 µm Polar C18 100 Å, 150x4,6 mm, mit Vorsäule Polar C18 4x3,0 mmID, S/N H17-230424, B/N 5761-0012	Phenomenex, Aschaffenburg (Deutschland)
Elektrode (Halbmikromesselektrode)	SenTix® Mic pH 0..14/0..100 °C; Schaft: Länge 40/80 mm, Durchmesser 12/5 mm, Material Glas	WTW, Weilheim (Deutschland)
Magnetrührer	Typ REO (220 V, 50/60 Hz, 20 W)	IKA-Werke, Staufen (Deutschland)
Magnetrührstäbchen	Diverse Größen	Brand, Wertheim (Deutschland)
Massenspektromter	Agilent MS Q-TOF 6540 UHD, Ionenquelle: AJS ESI G6540A	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
pH-Meter	inoLab® pH Level 1	WTW, Weilheim (Deutschland)
UHPLC-DAD-MS (analytisch) software	Masshunter Qualitative Analysis (B. 05.00)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
UHPLC-DAD-MS, analytisch	Agilent, Binary Pump G4220A, HiP Sampler G4226A, Column Comp. G1316C, DAD G4212A	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Tabelle 54 In Kapitel 4 verwendete Referenzsubstanzen, inklusive deren Reinheit.

Bezeichnung	Reinheit; Charge	Anbieter
1,5-Dicaffeoylchinasäure	97%, absolut; 7400	Phytolab, Vestenbergsgreuth (Deutschland)
Atractylosid	94,4%, HPLC	Isolat, siehe Kapitel 4.3
Carboxyatractylosid (Dikaliumsalz)	86%, absolut; 12938	Phytolab, Vestenbergsgreuth (Deutschland)
Carboxyatractylosid (Kaliumsalz; 2,2 K)	99,7%, HPLC; 104M4749V	Sigma-Aldrich, Schnelldorf (Deutschland)
Carboxyatractylosid (Kaliumsalz; 2,2 K)	99,7%, HPLC; 105M4762V	Sigma-Aldrich, Schnelldorf (Deutschland)
Carboxyatractylosid (Kaliumsalz; 2,9 K)	99,8%, HPLC; 096M4766V	Sigma-Aldrich, Schnelldorf (Deutschland)
Chlorogensäure	97%, absolut; 9455	Phytolab, Vestenbergsgreuth (Deutschland)
Chlorogensäure	96%, absolut; 4549	Phytolab, Vestenbergsgreuth (Deutschland)

Tabelle 55 In Kapitel 4 verwendetes Pflanzenmaterial von Xanthii fructus.

Bezeichnung/Anbieter	Charge; ggf. Herkunft	geröstet (praep.)/ungeröstet (processed/ unprocessed)
Arobemed	2878	ungeröstet
Chinamedica	220306; Anhui	geröstet (Chaocang'erzi)
Dr. Mei Wang 130401	130401; Jilin	processed/geröstet
Dr. Mei Wang 140528	140528; Anhui	processed/geröstet
Dr. Mei Wang 20131101	20131101; Hebei	processed/geröstet
Herbasinica 100401H164	100401H164; Jilin	geröstet (Chaocang'erzi)
Herbasinica 150801H164	150801H164; Jilin	geröstet (Chaocang'erzi)
Kainz	-	ungeröstet
Phytax	11404201	ungeröstet
Plantasia	P011/105	praep.
Sinophyto 01270638	01270638; Shadong	geröstet (Chaocang'erzi)
Sinophyto 02310340	02310340; Neimenggu	geröstet (Chaocang'erzi)
Yong	1501501	ungeröstet

Tabelle 56 Unter 4.2.2.3.2 verwendetes getrocknetes Pflanzenmaterial.

Bezeichnung	Charge; Anbieter	Stammpflanze
Althaeae folium	14345703; Caelo, Hilden (Deutschland)	<i>Althaea officinalis</i>
Cynarae folium	13310713; Caelo, Hilden (Deutschland)	<i>Cynara scolymus</i>
Echinaceae pallidae radix	28398; Alfred Galke, Bad Grund (Deutschland)	<i>Echinacea pallida</i>
Echinaceae purpureae radix	19998; Alfred Galke, Bad Grund (Deutschland)	<i>Echinacea purpureae</i>
Rubi idaei folium	14018803; Caelo, Hilden (Deutschland)	<i>Rubus idaeus</i>

Alle Drogenproben wurde gemahlen und anschließend durch ein Sieb der Maschenweite 500 µm gesiebt.

Die Angaben bzgl. Röstung wurden entweder der Verpackung, dem Analysenzertifikat entnommen oder nach Rücksprache mit dem jeweiligen Lieferanten vermerkt. Bei den meisten Drogenmustern wurde angegeben, dass es sich um Xanthii fructus praeparata, *Cang'erzi* oder *Chaocang'erzi* handelt.

4.2.1.1 Mikroskopische Untersuchungen

Die mikroskopischen Untersuchungen des Drogenmaterials zu Xanthii fructus (pulverisiertes und gesiebt (500 µm) Drogenmaterial) wurden gemäß 3.2.1.2 durchgeführt und um folgende Reagenzien, inklusive deren Anwendung erweitert.

- **Chlorzinkjod-Lösung:** 30 g Zinkchlorid, 2 g Iod, 10 g Kaliumjodid, 15 g Wasser wurden vermischt, nach Sedimentation folgte ein Filtrationsschritt.
 - Das Pulver wurde direkt auf 2-3 Tropfen Chlorzinkjod-Lösung aufgebracht und mikroskopiert. (Wanner, **2004**)
- **Safranin-Lösung:** 1% Safranin in Wasser.
 - Verdünnte Safranin-Lösung (ca. 1:10 mit Wasser) wurde auf einen Objektträger aufgebracht, das Pulver dazugegeben. Nach wenigen min wurde das Präparat gewaschen. (Wanner, **2004**)

4.2.1.2 Dünnschichtchromatographische Untersuchung

Die Auftragung der Prüf- und Referenzlösungen erfolgte bandenförmig mit einer Bandenlänge von 8 mm in einem Abstand von 8 bzw. 10 mm vom unteren Plattenrand und wurde automatisch mit dem Linomaten auf Kieselgelplatten (DC oder HPTLC) durchgeführt. Nach Trocknung der Platte (5 min) wurde die Entwicklung nach Erreichen der Kammersättigung (Filterpapier) entweder in einer Doppeltrogkammer per automatischer Entwicklungskammer oder nicht automatisch in einer Flachbodenkammer durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Auswertung mit Hilfe des Reprstars vor oder nach Derivatisierung bei 254, 366 nm und bei Weißlicht. Das Derivatisierungsreagenz wurde mit Hilfe einer Tauchkammer auf die Platte aufgebracht.

Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung von Xanthii fructus wurden folgende **Derivatisierungsreagenzien, inklusive ihrer Anwendung**, verwendet:

Anisaldehyd-Reagenz (Reich and Schibli, **2007**)

Bestandteile: 170 ml Methanol wurden unter Eiskühlung langsam mit 20 ml Essigsäure und 10 ml Schwefelsäure versetzt und vermischt. Nachdem die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde 1 ml Anisaldehyd (*p*-Methoxybenzaldehyd) hinzugegeben.

Derivatisierung: Die Platte wurde in das Reagenz getaucht und für 3 min, bei ca. 100 °C auf der Heizplatte getrocknet. Die Auswertung erfolgte unter Weißlicht.

Ammoniak-Dampf

Bestandteile: Ammoniak 25%.

Derivatisierung: Die Platte wurde für 3 min bei Kammerfüllung (15 min) mit Ammoniak bedampft. Die Auswertung erfolgte bei Tageslicht und 366 nm.

Naturstoffreagenz/Macrogol (Europäisches Arzneibuch, 2017)

Bestandteile: Das Reagenz setzt sich aus einer Diphenylboryloxyethylamin-Lösung (\cong Naturstoffreagenz; 10 g/L in Methanol) und einer Macrogol-Lösung (50 g/L in Methanol) zusammen.

Derivatisierung: Die Platte wurde für ca. 1 min bei 100-110 °C auf der Heizplatte erwärmt, in das Naturstoffreagenz getaucht und im kalten Luftstrom getrocknet (ca. 5 min). Abschließend wurde die Platte ebenfalls in eine Macrogol-Lösung getaucht und bis zur optimalen Farbentwicklung im kalten Luftstrom getrocknet (ca. 5 min).

Für die Evaluierung und Entwicklung einer Identitätsbestimmungsmethode (HPTLC) für *Xanthii fructus* wurden folgende **Methoden** verwendet:

Methode I ChP (Xanthii Fructus, 2015)

Extraktion: 2 g pulverisiertes Drogenmaterial (500 μ m) wurden nach Zugabe von 25 ml Methanol unter Rückfluss für 20 min extrahiert und filtriert. Das Filtrat wurde auf ca. 2 ml eingeeengt und stellt so die Prüflösung dar.

Mobile Phase: *n*-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5, V:V:V), die obere Phase wurde verwendet.

Derivatisierungsreagenz: Ammoniak-Dampf.

Auswertung: Als Referenz zur Auswertung der Chromatographie wurden 2 g Referenzdroge auf die gleiche Art und Weise behandelt wie die Prüfdroge. Die Fingerprintchromatogramme wurden in Bezug auf Lage und Farbe verglichen. Die Auswertung erfolgte bei 366 nm.

Methode II HKCMMS (Xanthii fructus, 2012)

- Extraktion: 1,0 g gepulvertes Drogenmaterial (500 µm) wurden mit 10 ml Methanol 70% für 30 min im Ultraschallbad extrahiert, zentrifugiert (2800xg, 10 min) und der Überstand wurde zur Trockne eingedampft. Die Proben wurden je in 2 ml Methanol 70% gelöst und filtriert.
- Mobile Phase: *n*-Butylacetat:Wasser:Ameisensäure (7:2,5:2,5, V:V:V), die obere Phase wurde verwendet.
- Derivatisierungsreagenz: es wird keine Derivatisierung vorgeschrieben.
- Auswertung: Als Referenzen wurden Chlorogensäure und 1,5-Dicaffeoylchinasäure, je in einer Konzentration von 1 mg/ml bzw. 0,1 mg/ml (genaue Angabe erfolgt im Text) aufgetragen und chromatographiert. Die Auswertung erfolgte bei 366 nm.

Methode III (in Anlehnung an (Xanthii fructus, 2012))

- Extraktion: 0,5 g gepulvertes Drogenmaterial (500 µm) wurden mit 5,0 ml Methanol 70% (V/V) versetzt, im Ultraschallbad für 30 min extrahiert und zentrifugiert (2800xg, 10 min). Der Überstand wurde nochmals filtriert.
- Mobile Phase: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V:V:V:V)
- Derivatisierungsreagenz: es wird keine Derivatisierung vorgeschrieben.
- Auswertung: Als Referenzen wurden Chlorogensäure und 1,5-Dicaffeoylchinasäure, je in einer Konzentration von 1 mg/ml aufgetragen und chromatographiert. Die Auswertung erfolgte bei 366 nm.

Methode IV (in Anlehnung an (Xanthii fructus, 2012))

- Extraktion: 0,5 g gepulvertes Drogenmaterial (500 µm) wurden mit 10,0 ml Methanol 70% (V/V) versetzt, im Ultraschallbad für 30 min

extrahiert, zentrifugiert (2800xg, 10 min) und der Überstand nochmals filtriert.

Mobile Phase: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27, V:V:V:V)

Derivatisierungsreagenz: es wird keine Derivatisierung vorgeschrieben.

Auswertung: Als Referenzen wurden Chlorogensäure und 1,5-Dicaffeoylchinasäure, je in einer Konzentration von 1 mg/ml aufgetragen und chromatographiert. Die Auswertung erfolgte bei 366 nm.

4.2.1.3 Methodenevaluierung und Entwicklung zur Quantifizierung der beiden Diterpene Carboxyatractylosid und Atractylosid

Für die Evaluierung und Entwicklung einer Gehaltsbestimmungsmethode der beiden Diterpene Carboxyatractylosid und Atractylosid in Xanthii fructus Extrakten wurden folgende **Methoden** verwendet:

Methode V (Xanthii Fructus, 2015)

Bei Methode V handelt es sich um die Methode zur Reinheitsbestimmung der unbehandelten Droge in der Monographie von Xanthii fructus aus dem ChP 2015.

Extraktion: 1,000 g pulverisiertes Drogenmaterial (500 µm) wurden in 20,0 ml Wasser suspendiert und in einem verschließbaren Gefäß für 40 min im Ultraschallbad extrahiert. Verlorengegangenes Volumen wurde nach dem Abkühlen des Extraktes ergänzt, die Mischung zentrifugiert und der Überstand filtriert. Das Filtrat stellt die Untersuchungslösung dar.

Stationäre Phase: Biphenyl (das ChP schreibt eine phenylmodifizierte Kieselgelsäule vor).

Injektionsvolumen: 5 µl (Proben- und Referenzlösungen).

Mobile Phase: Natriumdihydrogenphosphatlösung (0,01 mol/l, pH 5,4 mittels NaOH) → Eluent A.

Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 57 Gradient zur Quantifizierung von Carboxyatractylosid per HPLC-DAD nach Methode V.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	90	10
20	90	10
25	10	90
30	10	90
32	90	10
40	90	10

Das ChP sieht eine isokratische Elution vor. Da in Tabelle 57 der komplette Gradient, inklusive Spülschritt und Equilibrierung dargestellt ist, wird trotzdem von einem Gradienten gesprochen.

Säulenofentemperatur: 25 °C.

Detektion: 203 nm.
 Referenzlösung: Carboxyatractylosid (1 mg/ml, in Methanol 70% (V/V)).

Methode VI (Xanthii Fructus, 2015)

Bei Methode VI handelt es sich um die Methode zur Reinheitsbestimmung der behandelten oder gerösteten Droge in der Monographie von Xanthii fructus aus dem ChP.

Extraktion: 1,000 g pulverisiertes Drogenmaterial (500 µm) wurden in 20,0 ml Wasser suspendiert und in einem verschließbaren Gefäß für 40 min im Ultraschallbad extrahiert. Verlorengegangenes Volumen wurde nach dem Abkühlen des Extraktes ergänzt, die Mischung zentrifugiert und der Überstand filtriert. Das Filtrat stellt die Untersuchungslösung dar.

Stationäre Phase: Biphenyl (das ChP schreibt eine phenylmodifizierte Kieselgelsäule vor).

Injektionsvolumen: 5 µl (Proben- und Referenzlösungen).

Mobile Phase: Natriumdihydrogenphosphatlösung (0,01 mol/l, pH 5,4 mittels NaOH) → Eluent A.
 Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 58 Gradient zur Quantifizierung von Atractylosid per HPLC-DAD nach Methode VI.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	80	20
20	80	20
25	10	90
30	10	90
32	80	20
40	80	20

Das ChP sieht eine isokratische Elution vor. Da in Tabelle 58 der komplette Gradient, inklusive Spülschritt und Equilibrierung dargestellt ist, wird trotzdem von einem Gradienten gesprochen.

Säulenofentemperatur: 25 °C.

Detektion: 203 nm.
Referenzlösung: Atractylosid (5 mg/ml, in Methanol 50% (V/V)).

Methode VII (Modifikationen in Anlehnung an (Xanthii Fructus, 2015)

Extraktion: 1,000 g pulverisiertes Drogenmaterial (500 µm) wurden in 20,0 ml Wasser suspendiert und in einem verschließbaren Gefäß für 40 min im Ultraschallbad extrahiert ($T_{\text{Beginn}}=25\text{ °C}$). Nachdem die Suspension 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die Mischung filtriert und das verloren gegangene Volumen, unter Nachspülen des Filters auf 20,0 ml aufgefüllt.

Stationäre Phase: Biphenyl.

Injektionsvolumen: 20 µl Probenlösungen, 2 µl Referenzlösungen.

Mobile Phase: Natriumdihydrogenphosphatlösung (0,01 mol/l, pH 5,4 mittels NaOH) → Eluent A.
Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 59 Gradient zur Quantifizierung der beiden Diterpene Atractylosid und Carboxyatractylosid per HPLC-DAD nach Methode VII.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	90	10
5	90	10
20	75	25
26	10	90
29	10	90
35	90	10
43	90	10

Säulenofentemperatur: 25 °C.
Detektion: 203 nm.
Referenzlösung: Carboxyatractylosid (1 mg/ml, in Methanol 70% (V/V)),
Atractylosid (1 mM, in Wasser für Injektionszwecke).

Methode VIII (Modifikationen in Anlehnung an (Nikles, 2012; Steenkamp et al., 2006)

Extraktion: 1,000 g pulverisiertes Drogenmaterial (500 µm) wurden mit 20,0 ml Wasser versetzt und für 40 min im Ultraschallbad ($T_{\text{Beginn}}=25\text{ °C}$) extrahiert. Nach zehnminütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde der Extrakt in einen 20,0 ml Messkolben filtriert und unter Nachspülen des Filters auf 20,0 ml aufgefüllt. Die erhaltene Lösung stellt die Untersuchungslösung dar.

Stationäre Phase: C-18 Polar.

Injektionsvolumen: 10 µl Probenlösungen, 6 µl Referenzlösung.

Mobile Phase: Ammoniumacetat-Lösung (10 mM, pH 4,5 mittels Essigsäure)
→ Eluent A.
Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 60 Gradient zur Quantifizierung der beiden Diterpene Atractylosid und Carboxyatractylosid per HPLC-DAD nach Methode VIII.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	90	10
5	90	10
20	70	30
25	70	30
28	10	90
33	10	90
37	90	10
43	90	10

Säulenofentemperatur: 40 °C.

Detektion: 203 nm.

Referenzlösung: Carboxyatractylosid (1 mM, in Wasser für Injektionszwecke) und Atractylosid (1 mM, in Wasser für Injektionszwecke) wurden zu gleichen Teilen vermischt und die Injektion erfolgte aus der Mischung.

Methode IX

- Extraktion*: 1,000 g pulverisiertes Drogenmaterial (500 µm) wurden mit 20,0 ml Wasser versetzt und für 40 min im Ultraschallbad (T_{Beginn}=25 °C) extrahiert. Nach zehnmütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde der Extrakt in einen 20,0 ml Messkolben filtriert und unter Nachspülen des Filters auf 20,0 ml aufgefüllt. Die erhaltene Lösung stellt die Untersuchungslösung dar.
- Stationäre Phase: C-18 Polar.
- Injektionsvolumen: 10 µl Probenlösungen, 6 µl Referenzlösung (HPLC-DAD); 2 µl Probenlösung, 1 µl Referenzlösung (UPLC-DAD-MS).
- Mobile Phase: Ammoniumformiat-Lösung (10 mM, pH 4,5 mittels Ameisensäure) → Eluent A.
Acetonitril → Eluent B.
- Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 61 oben: Gradient zur Quantifizierung der beiden Diterpene Atractylosid und Carboxyatractylosid per HPLC-DAD nach Methode IX; unten: modifizierter Gradient zur Überprüfung einer Coelution und Spezifität der Methode per LC(UPLC)-MS.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	90	10
5	90	10
25	75	25
28	10	90
33	10	90
37	90	10
43	90	10

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	90	10
5	90	10
25	75	25
28	10	90
31	10	90
32	90	10
35	90	10

Säulenofentemperatur: 40 °C.
Detektion: 203 nm.
Referenzlösung: Carboxyatractylosid (1 mM, in Wasser für Injektionszwecke) und Atractylosid (1 mM, in Wasser für Injektionszwecke) wurden zu gleichen Teilen vermischt und die Injektion erfolgte aus dieser Mischung.

* die Extraktion erfolgte nach Modifikation der Methode von (Xanthii Fructus, **2015**).

4.2.1.4 Methodenevaluierung und Entwicklung zur Quantifizierung von Chlorogensäure

Für die Evaluierung und Entwicklung einer arzneibuchgerechten Gehaltsbestimmungsmethode (HPLC-DAD) für Xanthii fructus wurden folgende **Methoden** verwendet:

Methode X (Xanthii Fructus, 2015)

Extraktion: 0,500 g pulverisiertes Drogenmaterial (500 µm) wurden mit 25,0 ml Methanol 50% (welches 5% Ameisensäure enthält) versetzt und für 40 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Suspension wurde filtriert und stellte die Prüflösung dar.

Stationäre Phase: RP-18.

Injektionsvolumen: 10 µl.

Mobile Phase: 0,4% (V/V) Phosphorsäure → Eluent A
Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 62 Gradient für die Quantifizierung von Chlorogensäure in Xanthii fructus nach ChP (Xanthii Fructus, 2015).

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	90	10
30	90	10
35	10	90
40	10	90
45	90	10
50	90	10

Das ChP sieht eine isokratische Elution vor. Da in Tabelle 62 der komplette Gradient, inklusive Spülschritt und Equilibrierung dargestellt ist, wird trotzdem von einem Gradienten gesprochen.

Säulenofentemperatur: 25 °C.

Detektion: 327 nm.

Referenzlösung: 0,1 mg/ml (Methanol 70% (V/V)) Chlorogensäure.

Methode XI (Methode X modifiziert)

Extraktion: 0,500 g pulverisiertes Drogenmaterial (500 µm) wurden mit 25,0 ml Methanol 50% (welches 5% Ameisensäure enthält) versetzt und für 20, 30 und 40 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (2500 U/min, 3 min). Der Überstand wurde in einen 25,0 ml Messkolben filtriert und auf 25,0 ml mit Extraktionsmittel aufgefüllt.

Stationäre Phase: RP-18.

Injektionsvolumen: 10 µl.

Mobile Phase: 0,4% (V/V) Phosphorsäure → Eluent A

Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 63 Gradient für die Quantifizierung von Chlorogensäure in Xanthii fructus nach ChP (Xanthii Fructus, 2015).

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	90	10
15	90	10
20	10	90
25	10	90
30	90	10
35	90	10

Da in Tabelle 63 der komplette Gradient, inklusive Spülschritt und Equilibrierung dargestellt ist, wird trotzdem von einem Gradienten gesprochen.

Säulenofentemperatur: 25 °C.

Detektion: 327 nm.

Methode XII (Methode X modifiziert)

Extraktion: 0,500 g pulverisiertes Drogenmaterial (500 µm) wurden entweder mit 25,0 ml Methanol 50% (welches 5% Ameisensäure enthält) oder mit 25,0 ml Methanol 50% (ohne Ameisensäure) versetzt und für 40 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Suspension wurde filtriert und mit dem jeweiligen Extraktionsmittel auf 25,0 ml aufgefüllt.

Stationäre Phase: RP-18.

Injektionsvolumen: 10 µl.

Mobile Phase: 0,4% (V/V) Phosphorsäure → Eluent A
 Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Xanthii fructus (*Xanthium sibiricum* PATR.)

Tabelle 64 Gradient für die Quantifizierung von Chlorogensäure in Xanthii fructus nach ChP (Xanthii Fructus, 2015).

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	90	10
15	90	10
20	10	90
25	10	90
30	90	10
35	90	10

Da in Tabelle 64 der komplette Gradient, inklusive Spülschritt und Equilibrierung dargestellt ist, wird trotzdem von einem Gradienten gesprochen.

Säulenofentemperatur: 25 °C.

Detektion: 327 nm.

Methode XIII (Brennnesselblätter, 2017)

Extraktion: 0,200 g pulverisiertes Drogenmaterial (500 µm) wurden mit 25,0 ml Methanol 40% (V/V) versetzt und 30 min im Ultraschallbad bei 40 °C erhitzt. Der Extrakt wurde filtriert, das Filtrat stellte die Testlösung dar.

Stationäre Phase: RP-18.

Injektionsvolumen: 20 µl.

Mobile Phase: 15 Volumenteile Methanol + 85 Volumenteile Wasser, Mischung anschließend mit Phosphorsäure 10% auf pH 2,0

→ Eluent A

Methanol

→ Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 65 Gradient zur Quantifizierung von Chlorogensäure in Xanthii fructus nach Ph.Eur. (Brennnesselblätter, 2017).

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	100	0
1	100	0
25	85	15
35	85	15
36	0	100
41	0	100
45	100	0
53	100	0

Säulenofentemperatur: 25 °C.

Detektion: 330 nm.

Referenzlösung: Chlorogensäure 0,200 mg/ml (Methanol 50% (V/V)).

Methode XIV (Artischockenblätter, 2017)

Extraktion: 0,500 g pulverisierte Droge (500 µm) wurden mit 50,0 ml Methanol versetzt, eine Stunde lang im Wasserbad (70 °C) unter Rückflusskühlung erhitzt und zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Kolben überführt und die Extraktion wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden mit Wasser zu 200,0 ml verdünnt.

Stationäre Phase: RP-18 (das Ph.Eur. schreibt an dieser Stelle eine Säule mit einem Durchmesser von 4,6 mm vor, aufgrund eines Defektes wurde eine Säule mit einem Innendurchmesser von 4 mm verwendet).

Injektionsvolumen: 25 µl.

Mobile Phase: 0,5 Volumenteile Phosphorsäure 85% + 99,5 Volumenteile Wasser → Eluent A

0,5 Volumenteile Phosphorsäure 85% + 99,5 Volumenteile Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 1,200 ml/min.

Xanthii fructus (*Xanthium sibiricum* PATR.)

Tabelle 66 Gradient zur Quantifizierung der Chlorogensäure in Xanthii fructus nach Ph.Eur. (Artischockenblätter, 2017)

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	92	8
1	92	8
20	75	25
33	75	25
35	10	90
40	10	90
42	92	8
49	92	8

Nach Ph.Eur. wird der Spülschritt bei 100%B durchgeführt. In vorliegendem Gradienten wurde die Säule lediglich bei 90%B gespült.

Säulenofentemperatur: 40 °C.

Detektion: 330 nm.

Referenzlösung: Chlorogensäure 0,200 mg/ml (Methanol 50% (V/V)).

Methode XV (nach Modifikation und in Anlehnung an (Xanthii Fructus, 2015))

Extraktion: 0,500 g pulverisiertes Drogenmaterial (500 µm) wurden mit 25,0 ml Methanol 50% (V/V) versetzt und 30 min im Ultraschallbad bei 40 °C extrahiert. Nach der Extraktion wurde die Probe ca. 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt und in einen 25,0 ml Messkolben filtriert. Unter Nachspülen des Filters wurde der Extrakt mit Methanol 50% (V/V) auf 25,0 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde vor der Injektion nochmals filtriert (0,2 µm).

Stationäre Phase: RP-18.

Injektionsvolumen: 10 µl.

Mobile Phase: 0,4% (V/V) Phosphorsäure → Eluent A

Acetonitril → Eluent B.

Flussrate: 1,000 ml/min.

Tabelle 67 Gradient zur Quantifizierung von Chlorogensäure in Xanthii fructus für den Monographievorschlag DAB.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	90	10
15	90	10
20	10	90
25	10	90
30	90	10
40	90	10

Säulenofentemperatur: 25 °C.

Detektion: 327 nm.

Referenzlösung: Chlorogensäure; Konzentration und Lösungsmittel jeweils angegeben.

4.2.2 Ergebnisse der Prüfung auf Identität

4.2.2.1 Makroskopische Untersuchung

Die makroskopische Untersuchung wurde wie unter Kapitel 3.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Bei der zu untersuchenden Droge handelte es sich um die getrockneten Früchte von *Xanthium sibiricum* PATR.. In der Monographie zu Xanthii fructus aus dem ChP ist für die Identifizierung der gerösteten Droge der Verweis auf die Vorschriften für die ungeröstete („crude“) Droge, deren Fruchtformen sich weitestgehend ähnlich sind. Die geröstete Droge unterscheidet sich lediglich, aufgrund des Röstvorganges, durch die gelbbraune Färbung, hat sichtbare Narben der abgebrochenen Stacheln und einen schwachen aromatischen Geruch. (Xanthii Fructus, **2015**; Xanthii fructus, **2005, 2010 und 2015**)

Die Form der Früchte war spindelförmig, oval bis eiförmig mit einer Länge von 0,7 bis 1,7 cm und einer Breite von 0,4 bis 0,8 cm. Die Oberfläche der gerösteten Früchten war gelbbraun bis hin zu kräftigem braun (Abbildung 48, Teilabbildung A und B) mit partiell schwarz verfärbten Anteilen (Abbildung 48, Teilabbildung C). Durch das „processing“ der Früchte sollen die Stacheln weitestgehend entfernt werden, jedoch zeigte das makroskopische Erscheinungsbild der verschiedenen Drogenmuster ein inhomogenes Bild und reichte von wenigen oder keinen Stacheln (Abbildung 48, Teilabbildung C) bis hin zu deutlichen Stachelrückständen (Abbildung 48, Teilabbildung D). Am Scheitel der Frucht sind zwei deutlich größere Stacheln bzw. Stachelreste zu erkennen, die entweder einzeln stehen oder miteinander verwachsen sind (Abbildung 48, Teilabbildung E). Im Querschnitt der harten Frucht lassen sich eine Trennwand und zwei Kammern finden, in welcher sich je eine schmale spindelförmige Frucht mit einem ebenen Ende, umgeben von einer dünnen, grauschwarzen Fruchtschale mit Längsfurchen befindet (Abbildung 48, Teilabbildung F). Im Inneren ist eine hellgraue membranartige Samenschale mit zwei Keimblättern zu erkennen.

Teilabbildung A



Teilabbildung B



Teilabbildung C



Teilabbildung D



Teilabbildung E



Teilabbildung F



Abbildung 48 Xanthii fructus Handelsmuster unterschiedlicher Anbieter/Importeure. **Teilabbildung A:** Probe Sinophyto 01270638, **Teilabbildung B:** Probe Sinophyto 02310340, **Teilabbildung C:** Probe Plantasia, **Teilabbildung D:** Probe Herbasinica 100401H164, **Teilabbildung E:** Probe Arobemed, **Teilabbildung F:** Probe Herbasinica 100401H164.

4.2.2.2 Mikroskopische Untersuchung

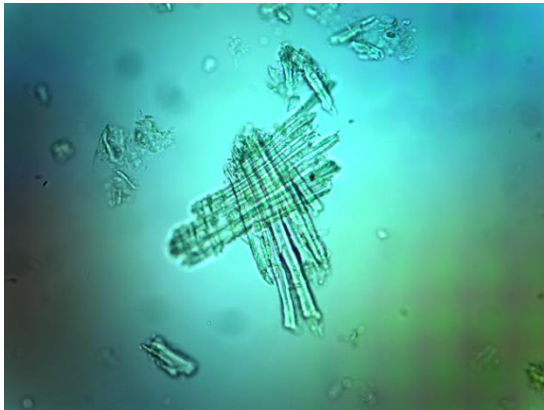
Die mikroskopische Untersuchung des gemahlene und gesiebte (500 µm) Drogenmaterials von Xanthii fructus erfolgte nach Kapitel 3.2.1.2. und 4.2.1.1 in Anlehnung an die Monographien von Xanthii fructus aus der deutschen Übersetzung des ChP und der HKCMMS (Xanthii Fructus, **2015**; Xanthii fructus, **2012**; Xanthii fructus, **2005, 2010 und 2015**). Im hellbraunen bis graugelben Pulver sind Fasern der Fruchthülle in Bündeln, oftmals kreuzweise angeordnet (Abbildung 49, Teilabbildung A) vorzufinden. Weiterhin weist das Pulver annähernd rechteckige Epidermiszellen des Perikarps auf, die oft mit Fasern der darunterliegenden Schicht verbunden sind (Abbildung 49, Teilabbildung B). Die langgezogenen spindelförmigen Fasern des Perikarps, mit mehr oder weniger deutlichen Tüpfeln und Tüpfelkanälen sind in Bündeln angeordnet, können aber auch einzeln vorliegen (Abbildung 49, Teilabbildung C). Annähernd rechteckige bis abgerundete Epidermiszellen der Testa mit Wandverdickungen prägen ebenfalls das mikroskopische Erscheinungsbild (Abbildung 49, Teilabbildung D). Neben Fragmenten von Keimblattzellen (Abbildung 49,

Teilabbildung E) können, die für Fruchtdrogen typischen Öltropfen und Aleuronkörper vorgefunden werden.

Mittels Färbereagenzien sollten diese beiden Inhaltstoffe/Inhaltstoffgruppen nachgewiesen bzw. unterschieden werden. Durch Chlorzinkjod wurden große gelb gefärbte Tropfen als Lipidtropfen sichtbar (Abbildung 49, Teilabbildung F). Mit Hilfe von Safranin wurden sowohl Aleuronkörner als auch das Cytoplasma rot, im Gegensatz dazu, waren die Fetttropfen oder Lipidkörper als helle und runde Strukturen deutlicher zu erkennen (Abbildung 49, Teilabbildung G) (Wanner, 2004).

Neben lignifizierten, länglichen und annähernd rechteckigen getüpfelten Parenchymzellen (Abbildung 49, Teilabbildung H) liegen Fragmente des Leitgewebes in Form von Schraub- /bzw. Spiralgefäßen (Abbildung 49, Teilabbildung D) vor.

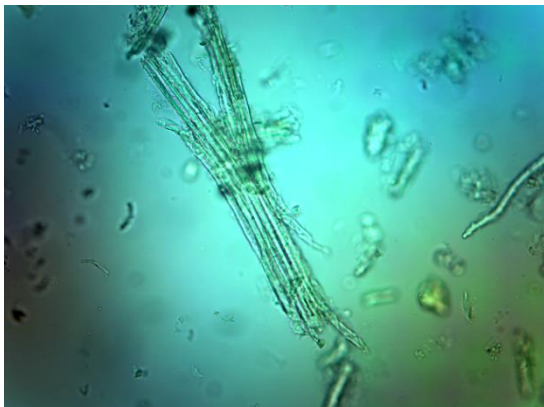
Teilabbildung A



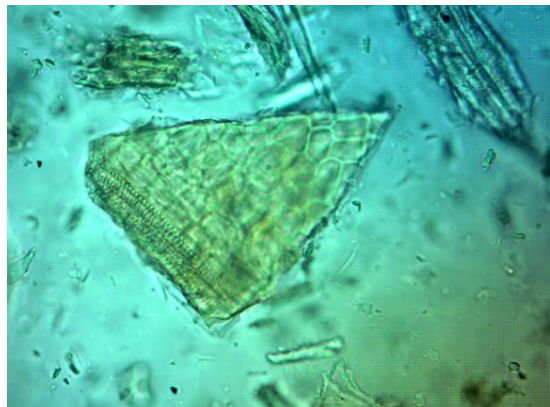
Teilabbildung B



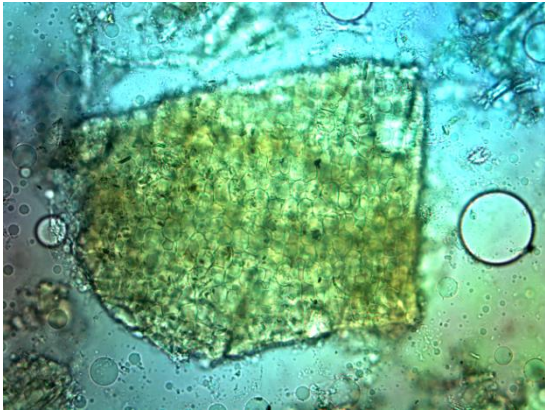
Teilabbildung C



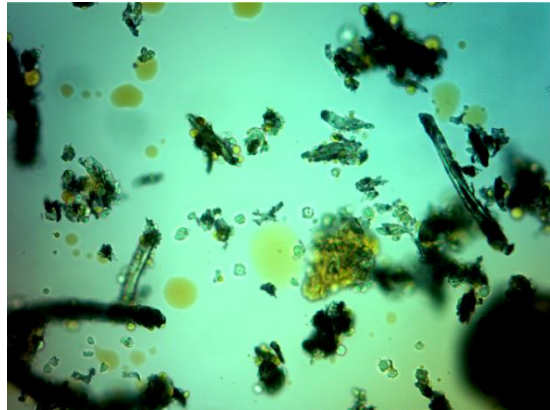
Teilabbildung D



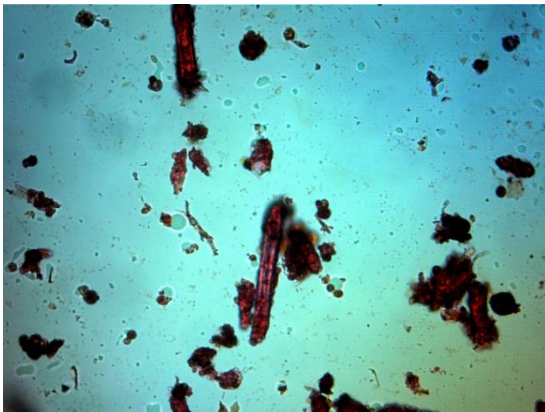
Teilabbildung E



Teilabbildung F



Teilabbildung G



Teilabbildung H



Abbildung 49 Mikroskopische Aufnahmen der Pulverbestandteile (500 μm) von *Xanthii fructus*. **Teilabbildung A:** Faserbündel (200-fache Vergrößerung, Chloralhydrat-Präparat), **Teilabbildung B:** Epidermiszellen des Perikarps (200-fache Vergrößerung, Chloralhydrat-Präparat), **Teilabbildung C:** (Perikarp-)faserbündel (200-fache Vergrößerung, Chloralhydrat-Präparat), **Teilabbildung D:** Testazellen (200-fache Vergrößerung, Chloralhydrat-Präparat), **Teilabbildung E:** Fragmente der Keimblätter (200-fache Vergrößerung, Chloralhydrat-Präparat), **Teilabbildung F:** kugelige, gelbe Lipidtropfen (200-fache Vergrößerung, Chlorzinkjod-Färbung), **Teilabbildung G:** Lipidtropfen und Aleuronkörper (200-fache Vergrößerung, Safranin-Färbung), **Teilabbildung H:** länglich rechteckige Parenchymzelle (200-fache Vergrößerung, Chloralhydrat-Präparat).

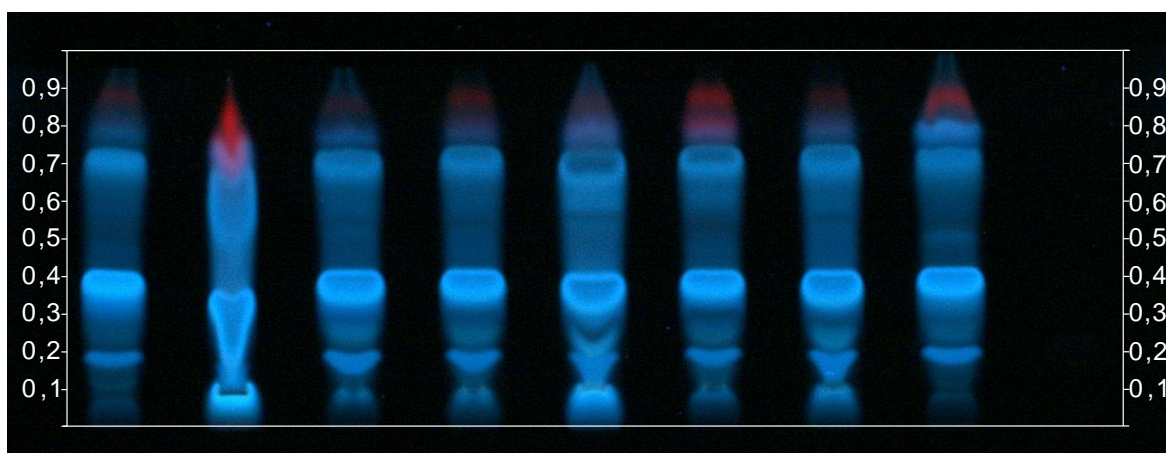
4.2.2.3 Dünnschichtchromatographie

4.2.2.3.1 Methodenevaluierung und Entwicklung

Um eine dünnschichtchromatographische Identitätsbestimmung für die Monographie von Xanthii fructus für das DAB vorzuschlagen, wurden zunächst vorhandene Vorschriften evaluiert und bei Bedarf modifiziert.

Nach der Vorschrift des ChP 2015 (Methode I ChP, 4.2.1.2) wurden nach einer methanolischen Extraktion des Drogenmaterials die Prüflösungen aufgetragen, entwickelt, mittels Ammoniak-Dampf derivatisiert und bei Tageslicht bzw. 366 nm ausgewertet. Das Ergebnis der Chromatographie ist in Abbildung 50 dargestellt.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

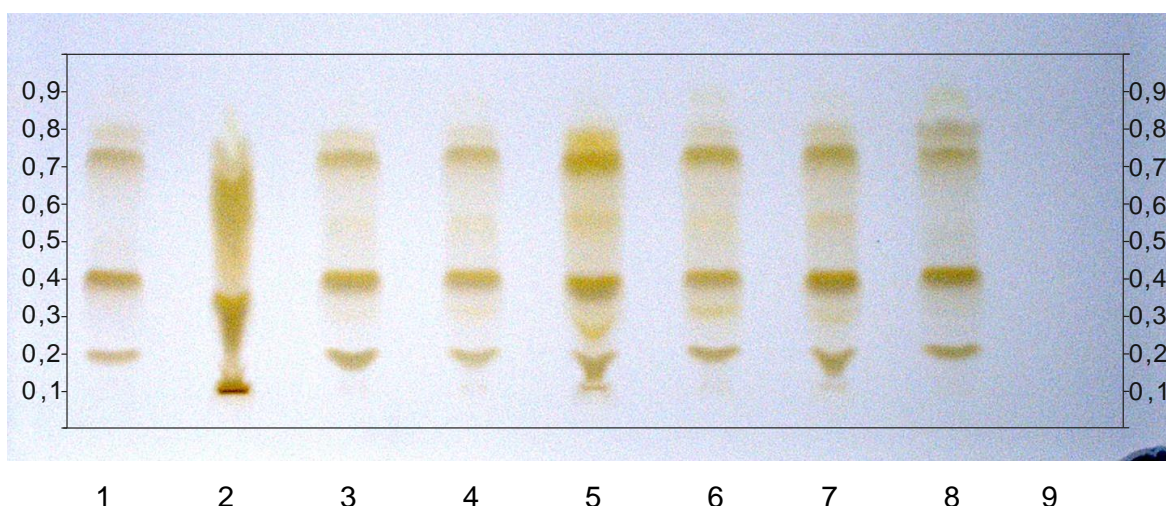
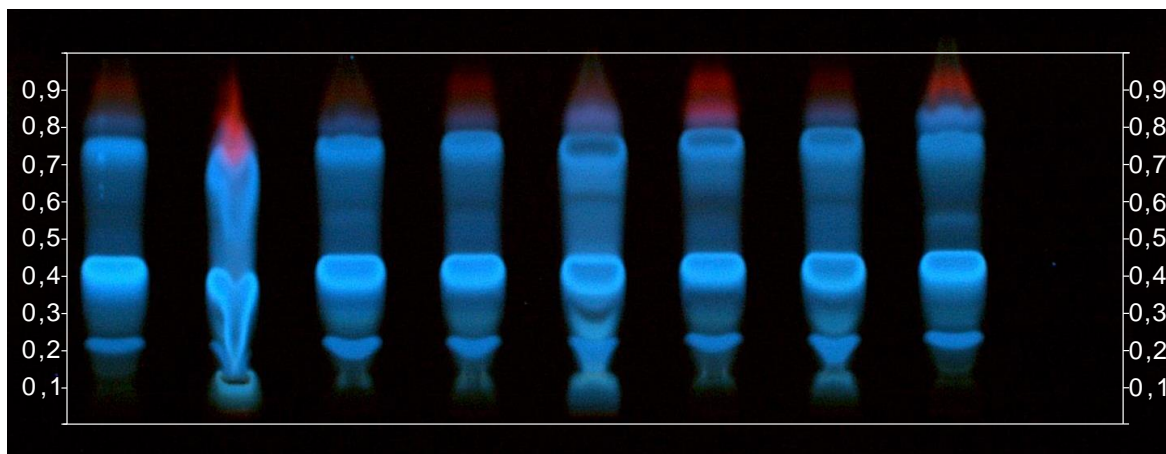


Abbildung 50 HPTLC Fingerprint nach Aufarbeitung Methode I ChP (4.2.1.2), Derivatisierung mit Ammoniak-Dampf: Bahn 1: Probe Sinophyto 02310340 (4 µl), Bahn 2: Probe Phytax (4 µl), Bahn 3: Probe Arobemed (4 µl), Bahn 4: Probe Plantasia (4 µl), Bahn 5: Herbasinica 100401H164 (4 µl), Bahn 6: Probe Yong (4 µl), Bahn 7: Probe Chinamedica (4 µl), Bahn 8: Probe Kainz (4 µl), Bahn 9: Carboxyatractylosid (1 mg/ml, 4 µl); Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); **Teilabbildung A**: nach Entwicklung bei 366 nm, **Teilabbildung B**: nach Derivatisierung bei Tageslicht.

Zusätzlich zur Auswertung nach Ammoniak-Dampf Behandlung wurde die Chromatographie erneut unter gleichen Bedingungen durchgeführt und mittels Anisaldehyd-Reagenz derivatisiert. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 51 abgebildet.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

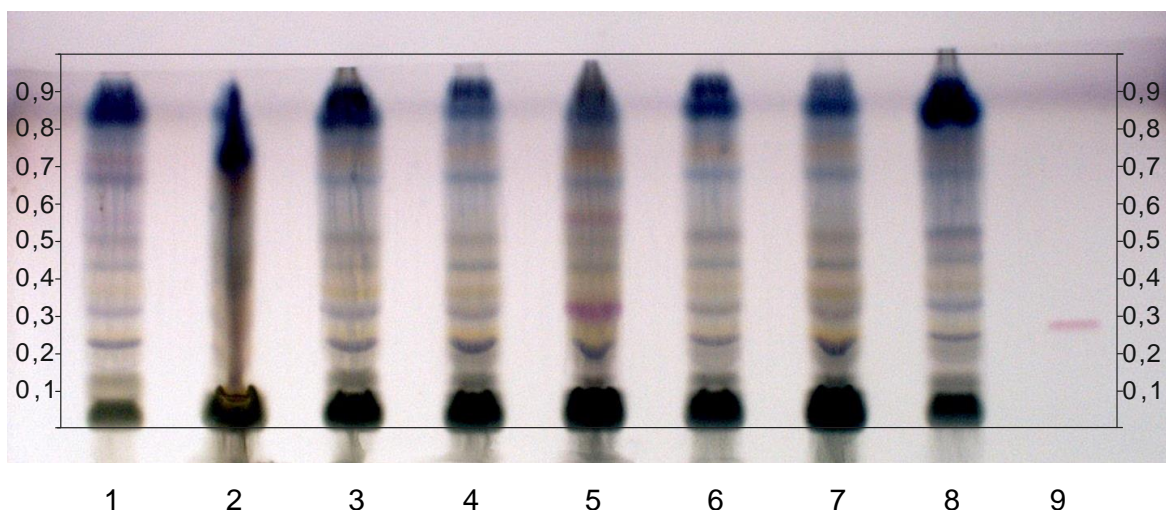


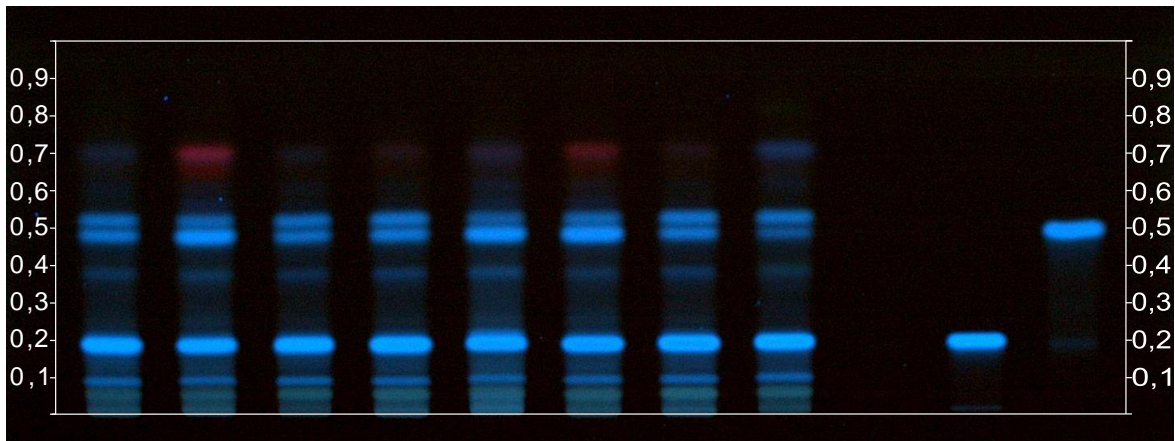
Abbildung 51 HPTLC Fingerprint nach Aufarbeitung Methode I ChP (4.2.1.2), Derivatisierung mit Anisaldehyd: Bahn 1: Probe Sinophyto 02310340 (4 μ l), Bahn 2: Probe Phytax (4 μ l), Bahn 3: Probe Arobemed (4 μ l), Bahn 4: Probe Plantasia (4 μ l), Bahn 5: Herbasinica 100401H164 (4 μ l), Bahn 6: Probe Yong (4 μ l), Bahn 7: Probe Chinamedica (4 μ l), Bahn 8: Probe Kainz (4 μ l), Bahn 9: Carboxyatractylosid (1 mg/ml, 4 μ l); Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); **Teilabbildung A**: nach Derivatisierung bei 366 nm, **Teilabbildung B**: nach Derivatisierung bei Tageslicht.

Die Extraktion des Drogenmaterials nach ChP ist relativ unkompliziert und wenig zeitaufwendig. Die Angabe in der Vorschrift, die Prüflösung auf ungefähr 2 ml einzuengen, ist jedoch unpräzise und kann Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Methode verursachen. Die Entwicklung mit einem zweiphasigen Fließmittel ist ebenfalls problematisch. Zudem bedeutet es durch das Ausschütteln einen weiteren Arbeitsschritt. Die Entwicklung der Platte dauert über eine Stunde, ist damit sehr zeitintensiv und sollte möglichst verkürzt werden. Im Endergebnis sind die Proben auf den Platten überladen. Nach einer Derivatisierung mittels Ammoniak-Dampf (Abbildung 50, Teilabbildung B) sind nur wenig diffuse Banden zu erkennen. Da, zur Auswertung, wie gefordert, keine Referenzdroge („Xanthii fructus reference drug“,

(Xanthii Fructus, **2015**) verfügbar war, musste in der Methodenentwicklung für das DAB auf Referenzdrogenmaterial verzichtet werden. Stattdessen wurden Referenzsubstanzen eingesetzt.

Die Evaluation der Methode aus dem HKCMMS (Methode II HKCMMS, 4.2.1.2) führte zu den Chromatogrammen, wie sie in Abbildung 52 dargestellt sind.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

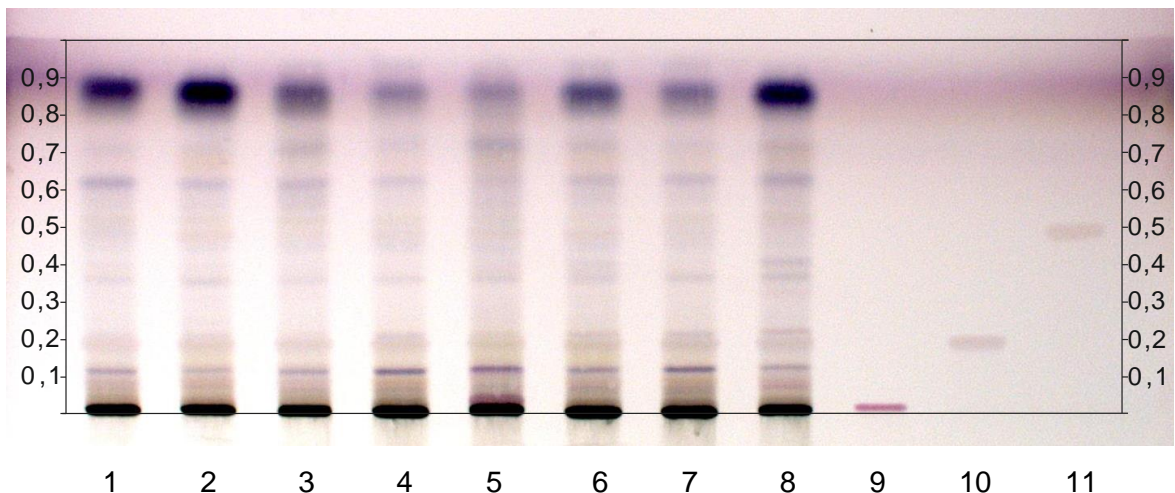


Abbildung 52 HPTLC Fingerprint nach Aufarbeitung Methode II HKCMMS (4.2.1.2), Derivatisierung mit Anisaldehyd: Bahn 1: Probe Sinophyto 02310340 (4 µl), Bahn 2: Probe Phytax (4 µl), Bahn 3: Probe Arobemed (4 µl), Bahn 4: Probe Plantasia (4 µl), Bahn 5: Herbasinica 100401H164 (4 µl), Bahn 6: Probe Yong (4 µl), Bahn 7: Probe Chinamedica (4 µl), Bahn 8: Probe Kainz (4 µl), Bahn 9: Carboxyatractylosid (1 mg/ml, 4 µl), Bahn 10: Chlorogensäure (1 mg/ml, 4 µl), Bahn 11: 1,5-Dicaffeoylchinasäure; Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand); **Teilabbildung A**: ohne Derivatisierung bei 366 nm, **Teilabbildung B**: nach Derivatisierung bei Tageslicht.

Die Aufarbeitung ist unkompliziert, enthält jedoch durch das Eindampfen der Probe einen zusätzlichen Aufkonzentrierungsschritt. Die Entwicklung mit dem vorgeschriebenen Fließmittel ist wesentlich zeitsparender. Es handelte sich dennoch um ein zweiphasiges System, das erst durch Ausschütteln verwendet werden kann. Nach HKCMMS wurden die beiden Marker Chlorogensäure und 1,5-Dicaffeoylchinasäure zur Identifizierung verwendet, die in allen Drogenproben (Abbildung 52, Teilabbildung A) nachgewiesen werden konnten. Beide Methoden, sowohl nach ChP (2015), als auch nach HKCMMS, weisen somit Defizite auf.

Entsprechend war es erforderlich eine neue, einfache, zeitsparende und ebenso präzise dünnschichtchromatographische Methode zur Identifizierung von *Xanthii fructus*, mit Hilfe der Referenzsubstanzen Chlorogensäure und 1,5-Dicaffeoylchinasäure zu entwickeln. Methode III (4.2.1.2) sollte die Vorteile der beschriebenen Methoden kombinieren und mit Hilfe eines bewährten Fließmittels zur Harmonisierung der Methoden im Arzneibuch beitragen. In den Abbildungen 53 und 54 sind HPTLC Chromatogramme, entwickelt mit unterschiedlichen Fließmitteln, gegenübergestellt (Methode II HKCMMS und Methode III; 4.2.1.2).

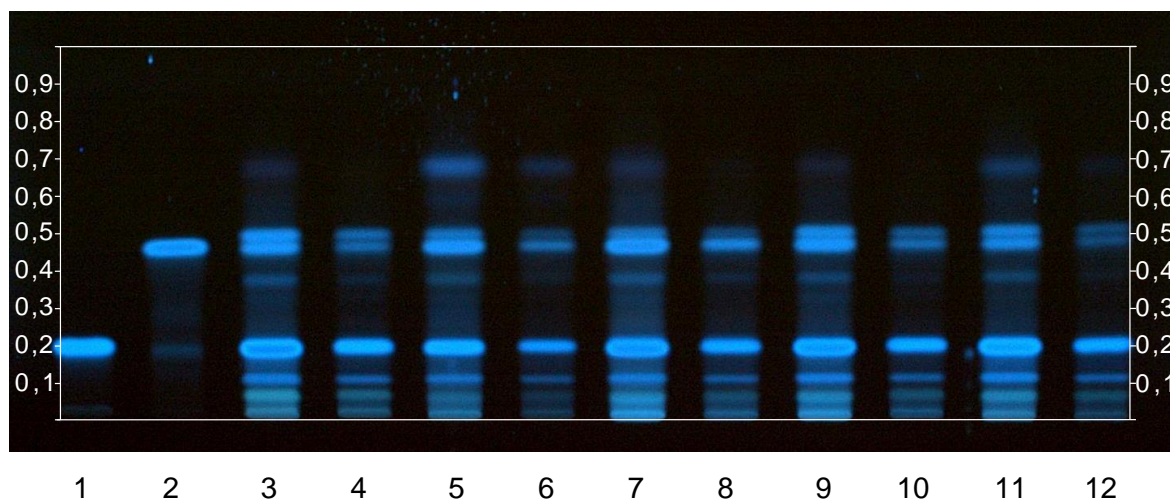


Abbildung 53 HPTLC Fingerprint nach Aufarbeitung Methode II und III (4.2.1.2), 366 nm; Bahn 1: Chlorogensäure (1 mg/ml, 5 μ l), Bahn 2: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (1 mg/ml, 5 μ l), Bahn 3: Probe Chinamedica nach Methode II (5 μ l), Bahn 4: Probe Chinamedica nach Methode III (5 μ l), Bahn 5: Probe Dr. Mei Wang 20131101 nach Methode II (5 μ l), Bahn 6: Probe Dr. Mei Wang 20131101 nach Methode III (5 μ l), Bahn 7: Probe Herbasinica 150801H164 nach Methode II (5 μ l), Bahn 8: Probe Herbasinica 150801H164 nach Methode III (5 μ l), Bahn 9: Probe Plantasia nach Methode II (5 μ l), Bahn 10: Probe Plantasia nach Methode III (5 μ l), Bahn 11: Probe Sinophyto 02310340 nach Methode II (5 μ l), Bahn 12: Probe Sinophyto 02310340 nach Methode III (5 μ l); Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand), mobile Phase: *n*-Butylacetat:Wasser:Ameisensäure (7:2,5:2,5; V:V:V), die obere Phase wird verwendet.

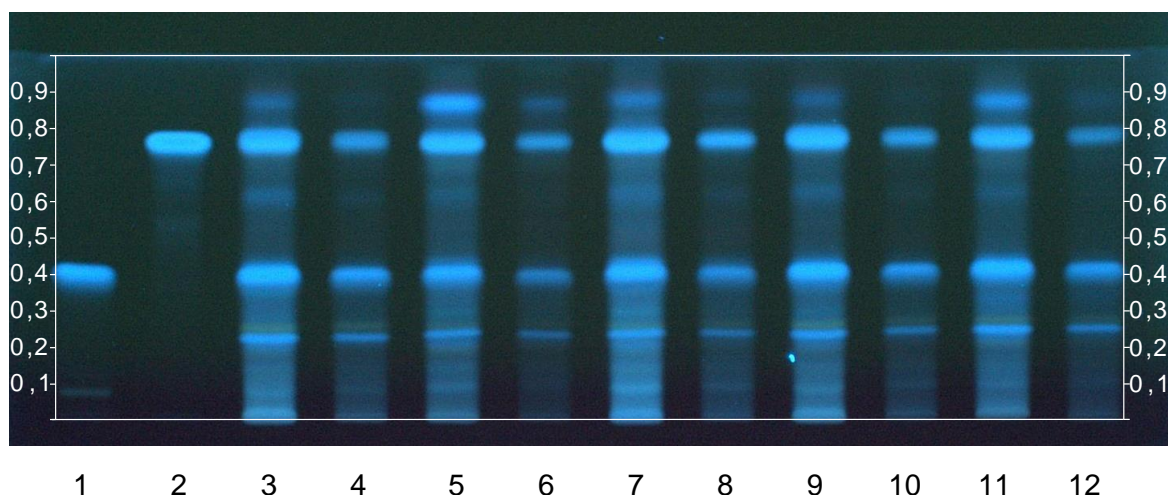


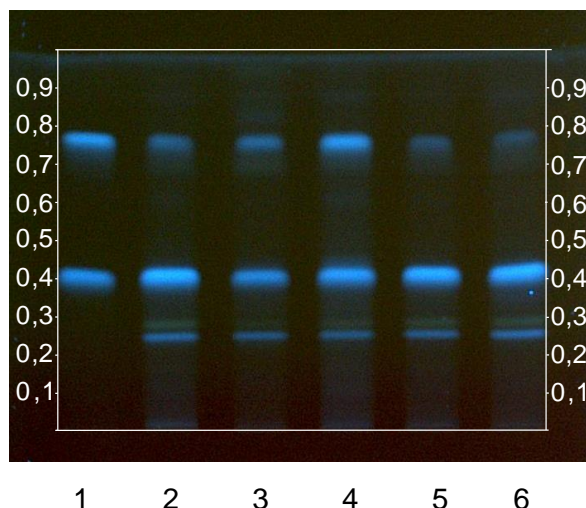
Abbildung 54 HPTLC Fingerprint nach Aufarbeitung Methode II und III (4.2.1.2), 366 nm; Bahn 1: Chlorogensäure (1 mg/ml, 5 μ l), Bahn 2: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (1 mg/ml, 5 μ l), Bahn 3: Probe Chinamedica nach Methode II (5 μ l), Bahn 4: Probe Chinamedica nach Methode III (5 μ l), Bahn 5: Probe Dr. Mei Wang 20131101 nach Methode II (5 μ l), Bahn 6: Probe Dr. Mei Wang 20131101 nach Methode III (5 μ l), Bahn 7: Probe Herbasinica 150801H164 nach Methode II (5 μ l), Bahn 8: Probe Herbasinica 150801H164 nach Methode III (5 μ l), Bahn 9: Probe Plantasia nach Methode II (5 μ l), Bahn 10: Probe Plantasia nach Methode III (5 μ l), Bahn 11: Probe Sinophyto 02310340 nach Methode II (5 μ l), Bahn 12: Probe Sinophyto 02310340 nach Methode III (5 μ l); Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand), mobile Phase: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V:V:V:V).

Die neu entwickelte Methode III erwies sich als schnell und unkompliziert. Die Entwicklung erfolgte in einem etablierten Fließmittelsystem, wie es auch zur Auftrennung und Detektion von Flavonoiden, Kohlenhydraten, Pflanzensäuren und Anthocyanen verwendet wird (Reich and Schibli, **2007**; Wagner et al., **1983**). Zur Identitätsbestimmung verschiedener Drogen wird es auch im Ph.Eur. verwendet (Artischockenblätter, **2017**; Bocksdornfrüchte, **2017**; Eibischblätter, **2017**; Eisenkraut, **2017**).

Beide Marker, Chlorogensäure und 1,5-Dicaffeoylchinasäure, sind nach Methode II und Methode III (beide Methoden Kapitel 4.2.1.2) eindeutig identifizierbar, auch wenn die Bandenschärfe im Fließmittelsystem der Methode III grundsätzlich etwas abnimmt. Da die neu entwickelte Methode III zeitsparender ist und auf ein zweiphasiges Fließmittel verzichtet, wurde der Fokus auf diese Methode gelegt.

In einem letzten Schritt der Evaluation sollte untersucht werden, ob eine Derivatisierung mit Naturstoffreagenz/Macrogol einen Vorteil gegenüber einer underivatisierten Auswertung hat. Das Ergebnis ist in Abbildung 55 mit den Teilabbildungen A, Entwicklung und Auswertung ohne Derivatisierung, und B, Entwicklung und Auswertung nach Derivatisierung mit Naturstoffreagenz/Macrogol, dargestellt. Da eine Derivatisierung keinen deutlichen Vorteil für die Auswertbarkeit brachte, wurde auf diesen zusätzlichen Analysenschritt verzichtet und Methode III nach Modifizierung des Extraktionsvolumens als Methode IV (4.2.1.2) für das DAB validiert (4.2.2.3.2).

Teilabbildung A



Teilabbildung B

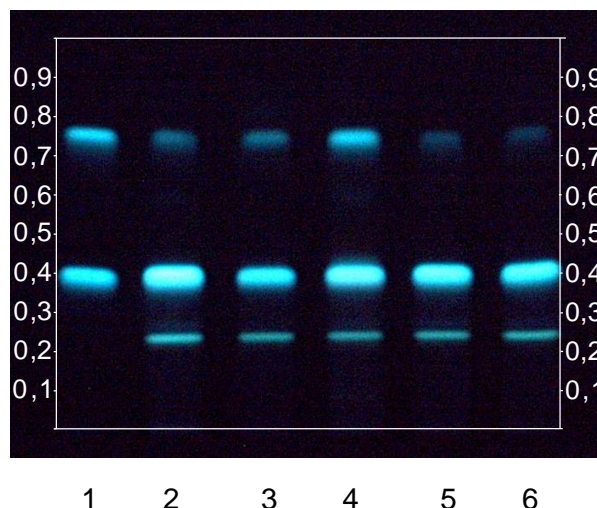


Abbildung 55 HPTLC Fingerprint nach Aufarbeitung Methode IV (4.2.1.2), Bahn 1: Chlorogensäure (0,1 mg/ml, 5 µl) und 1,5-Dicaffeoylchinasäure (0,1 mg/ml, 5 µl), Bahn 2: Probe Chinamedica (5 µl), Bahn 3: Probe Dr. Mei Wang 20131101 (5 µl), Bahn 4: Probe Herbasinica 150801H164 (5 µl), Bahn 5: Probe Plantasia (5 µl), Bahn 6: Sinophyto 02310340 (5 µl); Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand), mobile Phase: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V:V:V:V); **Teilabbildung A:** 366 nm, **Teilabbildung B:** nach Derivatisierung mit Naturstoffreagenz/Macrogol bei 366 nm.

4.2.2.3.2 Methodenvalidierung

Um die unter 4.2.1.2/4.2.2.3.1 vorgestellte Methode IV zur Identitätsbestimmung von *Xanthii fructus* auf ihre Stabilität, Spezifität, Präzision und Robustheit zu untersuchen, wurde sie nach dem unter 3.2.1.3.2 vorgestellten Validierungsschema validiert.

Um die Stabilität der Probe während der Chromatographie zu untersuchen, wurde eine authentische Drogenprobe (Probe Sinophyto 01270638) nach Methode IV extrahiert, 2 µl der Lösung punktförmig auf den rechten unteren Plattenrand (10 mm von jeder Ecke entfernt) aufgetragen und mittels 2D-HPTLC (Durchführung 3.2.1.3.2.2) untersucht. Abbildung 56 zeigt das zugehörige HPTLC-Chromatogramm.

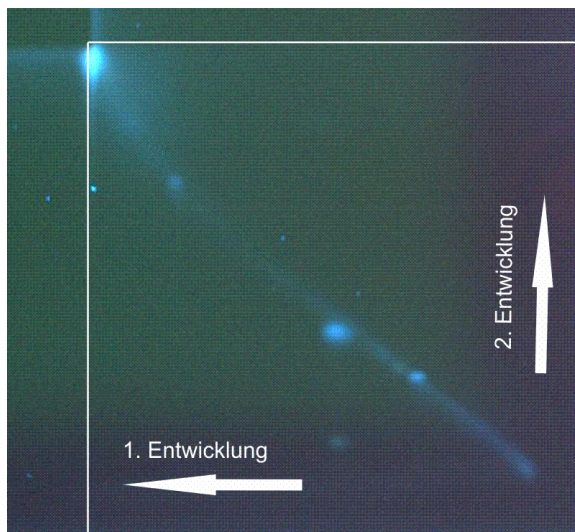


Abbildung 56 **2D-HPTLC-Chromatogramm** eines Extraktes von *Xanthii fructus* (Probe Sinophyto 01270638, 2 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V/V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke je 7 cm (vom unteren Plattenrand), 366 nm.

Während der Entwicklung ergaben sich minimale Veränderungen der Inhaltsstoffe des Extraktes. Die Bande/Zone der Chlorogensäure befindet sich teilweise nicht auf der Winkelhalbierenden, was auf eine (partielle) Instabilität der Substanz hinweist. Eine stabile Substanz hat nach beiden Entwicklungen den gleichen R_F -Wert und liegt auf der Winkelhalbierenden (Reich and Schibli, **2007**). Da die zu validierende Methode nicht der Quantifizierung dienen sollte und zudem das Fließmittelsystem Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27, V/V/V/V), mit dem Marker Chlorogensäure ein etabliertes System, auch im Arzneibuch (Artischockenblätter, **2017**; Artischockenblättertrockenextrakt, **2017**; Eibischblätter, **2017**; Scherübl, **2014**) darstellt, wurde der Stabilitätstest, trotz leichter Abweichung von der Winkelhalbierenden akzeptiert.

Die Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung wurde beurteilt, indem Drogenmaterial extrahiert und auf eine HPTLC-Platte (10x10 cm) aufgetragen wurde. Die Platte wurde mit Aluminiumfolie umwickelt und zusammen mit dem Extrakt drei Stunden gelagert. Drogenmaterial des gleichen Lieferanten wurde nach drei Stunden erneut extrahiert und

zusammen mit dem gelagerten Extrakt auf die Platte aufgetragen, chromatographiert und ausgewertet. Es ergaben sich keine Unterschiede (Abbildung 57) bezüglich der Intensität, Farbe und Lage der Banden im Fingerprint, der Stabilitätstest konnte akzeptiert werden.

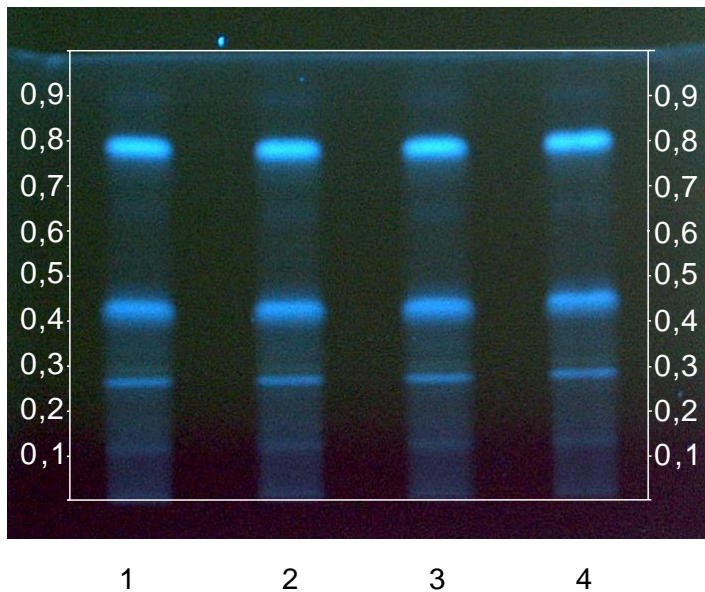


Abbildung 57 HPTLC-Fingerprint zur Überprüfung der **Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung** von Xanthii fructus (Herbasinica 150801H164); Bahn 1: Probe Herbasinica drei Stunden vor der Chromatographie aufgetragen (5 µl), Bahn 2: Probe Herbasinica frisch vor der Chromatographie extrahiert und aufgetragen (5 µl), Bahn 3: Probe Herbasinica frisch vor der Chromatographie extrahiert und aufgetragen (5 µl), Bahn 4: Probe Herbasinica drei Stunden in Lösung (5 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V/V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand), 366 nm.

Die Stabilität der Ergebnisse wurde überprüft, indem verschiedene Proben des Drogenmaterials von Xanthii fructus extrahiert, chromatographiert und die HPTLC-Platte nach 1 (Abbildung 58), 5, 10, 20, 30 und 60 min (Abbildung 59) bei 366 nm dokumentiert und deren Ergebnisse verglichen wurden.

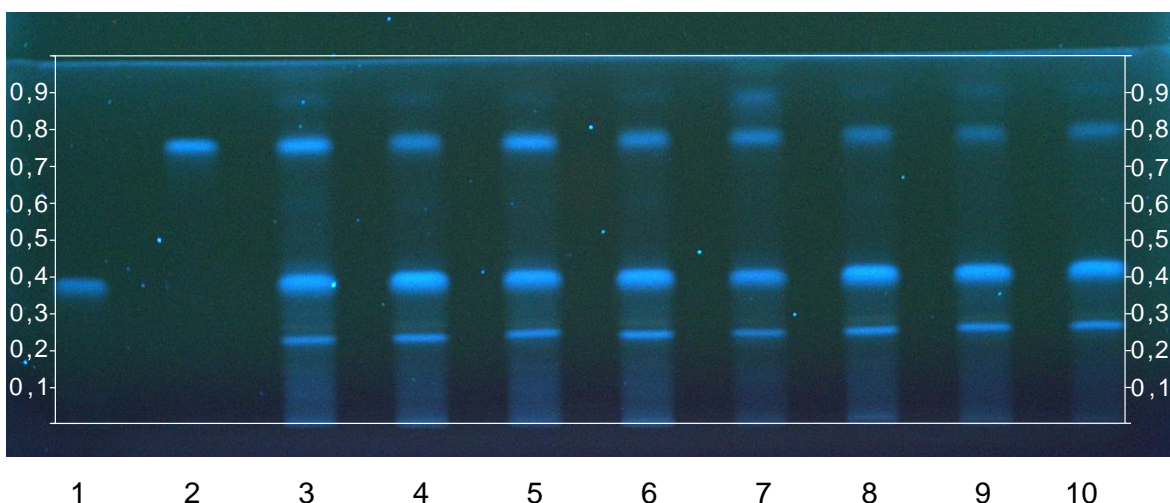


Abbildung 58 **Stabilität der Ergebnisse** nach 1 min; Bahn 1: Chlorogensäure (0,1 mg/ml, 5 µl), Bahn 2: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (0,1 mg/ml, 5 µl), Bahn 3: Probe Herbasinica 150801H164 (5 µl), Bahn 4: Probe Plantasia (5 µl), Bahn 5: Probe Dr. Mei Wang 130401 (5 µl), Bahn 6: Probe Dr. Mei Wang 140528 (5 µl), Bahn 7: Probe Dr. Mei Wang 20131101 (5 µl), Bahn 8: Probe Chinamedica (5 µl), Bahn 9: Probe Sinophyto 02310340 (5 µl), Bahn 10: Probe Sinophyto 01270638 (5 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V/V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand), 366 nm.

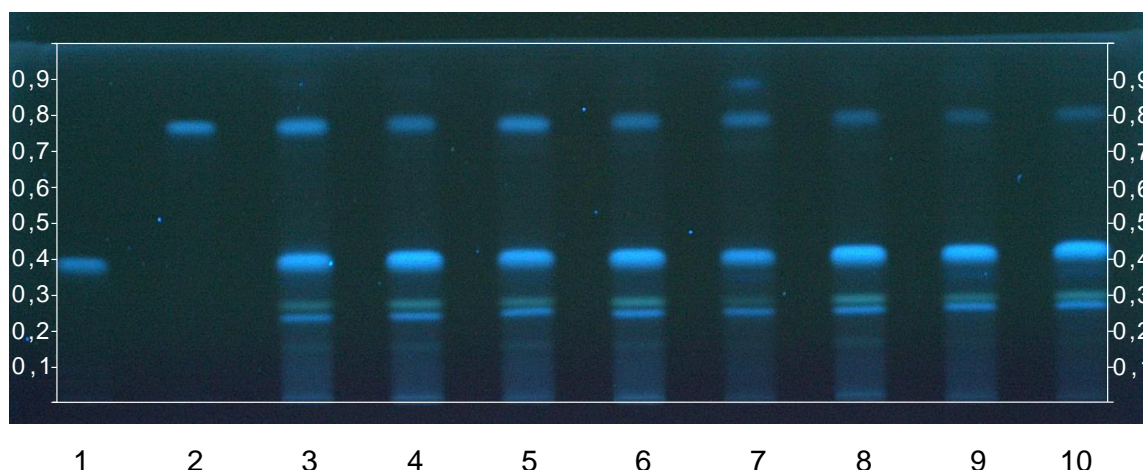


Abbildung 59 **Stabilität der Ergebnisse** nach 60 min; Bahn 1: Chlorogensäure (0,1 mg/ml, 5 μ l), Bahn 2: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (0,1 mg/ml, 5 μ l), Bahn 3: Probe Herbasinica 150801H164 (5 μ l), Bahn 4: Probe Plantasia (5 μ l), Bahn 5: Probe Dr. Mei Wang 130401 (5 μ l), Bahn 6: Probe Dr. Mei Wang 140528 (5 μ l), Bahn 7: Probe Dr. Mei Wang 20131101 (5 μ l), Bahn 8: Probe Chinamedica (5 μ l), Bahn 9: Probe Sinophyto 02310340 (5 μ l), Bahn 10: Probe Sinophyto 01270638 (5 μ l); Fließmittel: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V/V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand), 366 nm.

Die Ergebnisse zur Überprüfung der Stabilität zeigten keine Veränderungen des Fingerprints innerhalb von 60 min (minimale Unterschiede sind der unterschiedlichen Belichtung geschuldet). Das Chromatogramm ließ sich auch nach einer Stunde, in Bezug auf die beiden Referenzsubstanzen (Chlorogensäure R_f 0,38 und 1,5-Dicaffeoylchinasäure R_f 0,75), einwandfrei auswerten. Die Stabilität der Ergebnisse konnte somit belegt werden.

Um die Spezifität der Methode zu überprüfen, sollte einerseits Drogenmaterial mit den Referenzsubstanzen verglichen und andererseits der Vergleich zu Verfälschungen bzw. Verwechslungen gezogen werden. Die nach *Materia Medica* in der Monographie von *Xanthii fructus* (*Xanthii Fructus*, 2004) als Verfälschungen aufgeführten Arten *X. mongolicum* und *X. spinosum* waren jedoch nicht verfügbar und konnten demnach nicht vergleichsweise untersucht werden. Aus diesem Grund wurde die Untersuchung Spezifität durchgeführt, indem Drogenproben von *Xanthii fructus* mit Referenzsubstanzen und Drogenmaterial verglichen wurden, bei denen unter anderem ebenfalls Chlorogensäure und/oder 1,5-Dicaffeoylchinasäure enthalten sind.

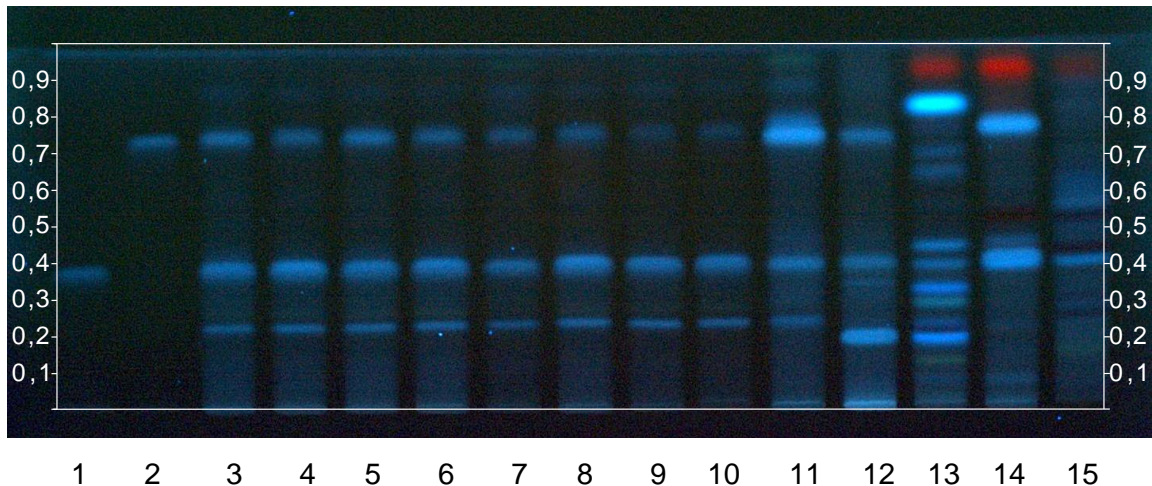


Abbildung 60 HPTLC-Chromatogramm zum Versuch **Spezifität/Verfälschungen**; Bahn 1: Chlorogensäure (0,1 mg/ml, 5 µl), Bahn 2: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (0,1 mg/ml, 5 µl), Bahn 3: Probe Herbasinica 150801H164 (5 µl), Bahn 4: Probe Plantasia (5 µl), Bahn 5: Probe Dr. Mei Wang 130401 (5 µl), Bahn 6: Probe Dr. Mei Wang 140528 (5 µl), Bahn 7: Probe Dr. Mei Wang 20131101 (5 µl), Bahn 8: Probe Chinamedica (5 µl), Bahn 9: Probe Sinophyto 02310340 (5 µl), Bahn 10: Probe Sinophyto 01270638 (5 µl), Bahn 11: Echinaceae purpurea radix (5 µl), Bahn 12: Echinaceae pallidae radix (5 µl), Bahn 13: Althaeae radix (5 µl), Bahn 14: Cynarae folium (5 µl), Bahn 15: Rubi idaei folium (5 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V/V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand), 366 nm.

Die Auswertung des Bandenmusters bei 366 nm ergab bei allen neun Drogenextrakten von *Xanthii fructus* (Abbildung 60, Bahn 3-10) einen ähnlichen Fingerprint, der sich lediglich in der Intensität der 1,5-Dicaffeoylchinasäurebande (R_f 0,74) unterschied. Der Fingerprint von *Echinaceae purpureae radix* (Abbildung 60, Bahn 11) ist dem von *Xanthii fructus* am Ähnlichsten und unterschied sich nur durch die Bande direkt oberhalb von 1,5-Dicaffeoylchinasäure (R_f 0,75) bei R_f 0,79. Bei dem Fingerprint von *Echinaceae pallidae radix* war zusätzlich eine Bande bei R_f 0,20 zu erkennen, die eine Unterscheidung zu den *Xanthium* Proben möglich macht. Die gleiche Bande bei R_f 0,20, mit zwei weiteren Banden bei R_f 0,29 und R_f 0,33 waren im Fingerprint des Eibischblätter-Extraktes zu erkennen und grenzen, zusammen mit einer blau fluoreszierenden Bande bei R_f 0,84, einer roten Bande bei R_f 0,94 und der fehlenden 1,5-Dicaffeoylchinasäurebande (R_f 0,75) den Fingerprint von dem der Sibirischen Spitzklettenfrucht ab. Der Extrakt von *Cynarae folium* zeigte ebenfalls eine Chlorogensäurebande, unterschied sich jedoch durch eine blau fluoreszierende Bande bei R_f 0,79 und einer roten Bande bei R_f 0,94. Im Fingerprint von *Rubi idaei folium* fehlte die Bande für 1,5-Dicaffeoylchinasäure. Zusammenfassend konnte der Test auf Spezifität akzeptiert werden, da eine Unterscheidung der *Xanthium* Proben von anderen officinellen Arzneipflanzen möglich war.

Zur Untersuchung des Validierungsparameters Wiederholpräzision wurde Drogenmaterial unterschiedlicher Herkünfte dreimal an einem Tag (Versuch Wiederholpräzision 1-3) unabhängig voneinander extrahiert, chromatographiert und ausgewertet (Abbildung 61).

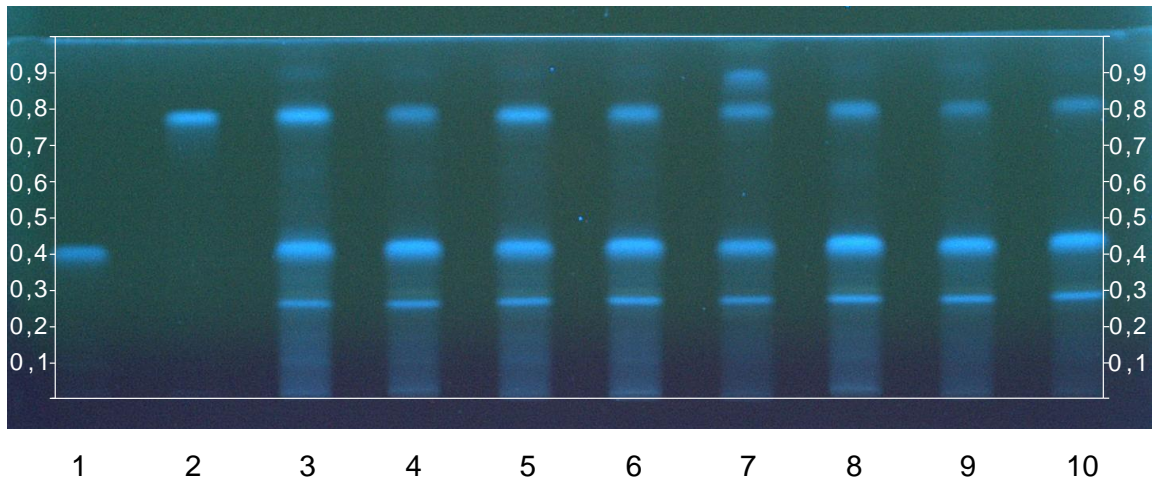


Abbildung 61 Versuch **Wiederholpräzision 3**; Bahn 1: Chlorogensäure (0,1 mg/ml, 5 µl), Bahn 2: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (0,1 mg/ml, 5 µl), Bahn 3: Probe Herbasinica 150801H164 (5 µl), Bahn 4: Probe Plantasia (5 µl), Bahn 5: Probe Dr. Mei Wang 130401 (5 µl), Bahn 6: Probe Dr. Mei Wang 140528 (5 µl), Bahn 7: Probe Dr. Mei Wang 20131101 (5 µl), Bahn 8: Probe Chinamedica (5 µl), Bahn 9: Probe Sinophyto 02310340 (5 µl), Bahn 10: Probe Sinophyto 01270638 (5 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V/V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand), 366 nm.

Die R_f -Werte innerhalb einer Platte (Tabellen 68-70) und von Platte zu Platte (Tabelle 71) wurden verglichen und zeigten Abweichungen in den R_f -Werten, die kleiner als 0,03 Einheiten waren, daher konnte der Test Wiederholpräzision akzeptiert werden.

Tabelle 68 R_f -Werte aus dem Versuch Wiederholpräzision 1.

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW
Chlorogensäure	0,38	-	0,38	0,39	0,39	0,39	0,40	0,40	0,40	0,41	0,39
1,5-Dicaffeoylchinasäure	-	0,75	0,75	0,75	0,76	0,77	0,77	0,78	0,77	0,78	0,76

Tabelle 69 R_f -Werte aus dem Versuch Wiederholpräzision 2.

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW
Chlorogensäure	0,39	-	0,40	0,40	0,40	0,40	0,41	0,42	0,42	0,42	0,41
1,5-Dicaffeoylchinasäure	-	0,76	0,76	0,77	0,77	0,77	0,78	0,78	0,78	0,79	0,77

Tabelle 70 R_f -Werte aus dem Versuch Wiederholpräzision 3.

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW
Chlorogensäure	0,39	-	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,42	0,41
1,5-Dicaffeoylchinasäure	-	0,76	0,76	0,77	0,77	0,77	0,78	0,78	0,78	0,79	0,77

Tabelle 71 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Versuch Wiederholpräzision 1-3.

Versuch	Wiederholpräzision 1	Wiederholpräzision 2	Wiederholpräzision 3	ΔR_f
Chlorogensäure	0,39	0,41	0,41	0,02
1,5-Dicaffeoylchinasäure	0,76	0,77	0,77	0,01

Der Versuch Wiederholpräzision 1 wurde zusätzlich an zwei weiteren Tagen wiederholt, um den Validierungsparameter Laborpräzision (Laborpräzision 1-3) zu evaluieren. Um den Test zu bewerten, wurden ebenfalls die R_f -Werte innerhalb einer Platte und von Platte zu Platte verglichen. Die Schwankungen in den R_f -Werten innerhalb der drei Platten durften nicht größer als 0,03 Einheiten betragen. Weiterhin sollten die Banden sich weder in Farbe, Position noch Anzahl unterscheiden.

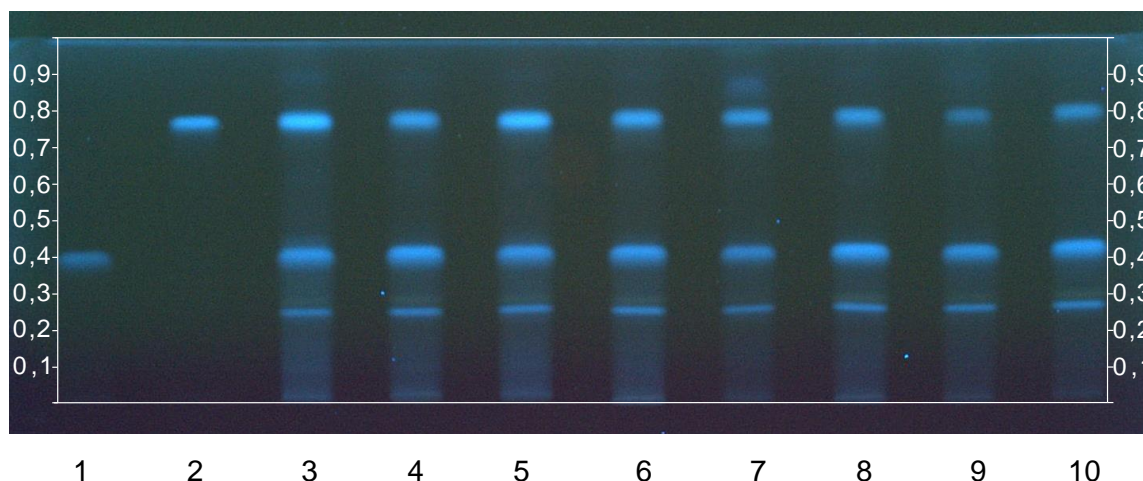


Abbildung 62 Versuch **Laborpräzision 2**; Bahn 1: Chlorogensäure (0,1 mg/ml, 5 μ l), Bahn 2: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (0,1 mg/ml, 5 μ l), Bahn 3: Probe Herbasinica 150801H164 (5 μ l), Bahn 4: Probe Plantasia (5 μ l), Bahn 5: Probe Dr. Mei Wang 130401 (5 μ l), Bahn 6: Probe Dr. Mei Wang 140528 (5 μ l), Bahn 7: Probe Dr. Mei Wang 20131101 (5 μ l), Bahn 8: Probe Chinamedica (5 μ l), Bahn 9: Probe Sinophyto 02310340 (5 μ l), Bahn 10: Probe Sinophyto 01270638 (5 μ l); Fließmittel: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V/V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand), 366 nm.

Abbildung 62 zeigt das Chromatogramm zum Versuch Laborpräzision 2. In Tabelle 72 sind die Ergebnisse anhand der R_f -Werte zusammengefasst. Der Test auf Laborpräzision wurde akzeptiert, da alle geforderten Parameter erfüllt waren.

Tabelle 72 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Versuch Laborpräzision 1-3.

Versuch	Laborpräzision 1	Laborpräzision 2	Laborpräzision 3 \triangleq Wiederholpräzision 1	ΔR_f
Chlorogensäure	0,39	0,40	0,39	0,01
1,5-Dicaffeoylchinasäure	0,77	0,78	0,76	0,02

Um die Methode auf ihre Robustheit hin zu untersuchen, wurden zwei Analysenparameter variiert. Zum einen wurde der Kammertyp zusammen mit dem Plattentyp und zum anderen die Entwicklungsdistanz in die Bewertung einbezogen.

Im Versuch Robustheit Kammertyp/Plattentyp wurde eine Extraktion und Chromatographie, nach Standardbedingungen durchgeführt und mit einer Extraktion und anschließender Chromatographie in einer Flachbodenkammer und einer DC-Platte als stationärer Phase verglichen.

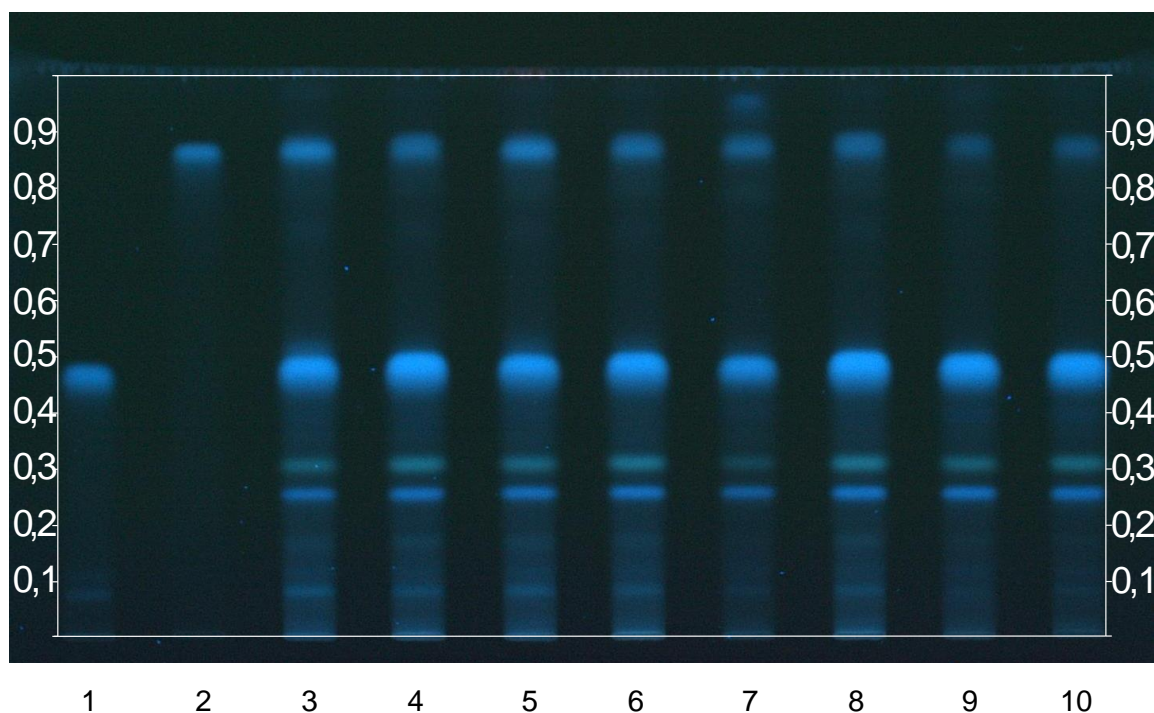


Abbildung 63 Versuch **Robustheit Kammertyp/Plattentyp** (DC-Platte, Flachbodenkammer); Bahn 1: Chlorogensäure (0,1 mg/ml, 10 μ l), Bahn 2: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (0,1 mg/ml, 10 μ l), Bahn 3: Probe Herbasinica 150801H164 (10 μ l), Bahn 4: Probe Plantasia (10 μ l), Bahn 5: Probe Dr. Mei Wang 130401 (10 μ l), Bahn 6: Probe Dr. Mei Wang 140528 (10 μ l), Bahn 7: Probe Dr. Mei Wang 20131101 (10 μ l), Bahn 8: Probe Chinamedica (10 μ l), Bahn 9: Probe Sinophyto 02310340 (10 μ l), Bahn 10: Probe Sinophyto 01270638 (10 μ l); Fließmittel: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V/V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 11 cm (vom unteren Plattenrand), 366 nm.

Tabelle 73 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Versuch Robustheit Kammertyp/Plattentyp.

Versuch	Robustheit Kammertyp/Plattentyp (Flachbodenkammer, DC-Platte)	Stabilität der Ergebnisse (Doppeltrogkammer, HPTLC-Platte)	ΔR_f
Chlorogensäure	0,46	0,40	0,06
1,5-Dicaffeoylchinasäure	0,83	0,78	0,05

Das erhaltene Chromatogramm (Abbildung 63) wurde mit dem Chromatogramm der Abbildung 62 (HPTLC-Platte, Doppeltrogkammer) verglichen und zeigte keine R_f -Unterschiede, die den Wert 0,06 überstiegen (auch Tabelle 73). Somit konnten die Parameter Kammertyp/Plattentyp als robust angesehen werden. Die Methode kann sowohl auf DC als auch auf HPTLC-Platten und unter Verwendung unterschiedlicher Kammertypen durchgeführt werden.

Als weiterer Robustheitsparameter wurde die Entwicklungsstrecke nach Extraktion und Auftragung unter Normalbedingungen (7 cm vom unteren Plattenrand) auf 6 cm verkürzt (Abbildung 64) und auf 8 cm (Abbildung 65) verlängert. Die R_f -Werte (Tabelle 74) und das erhaltene Fingerprint-Chromatogramm waren Gegenstand der Auswertung.

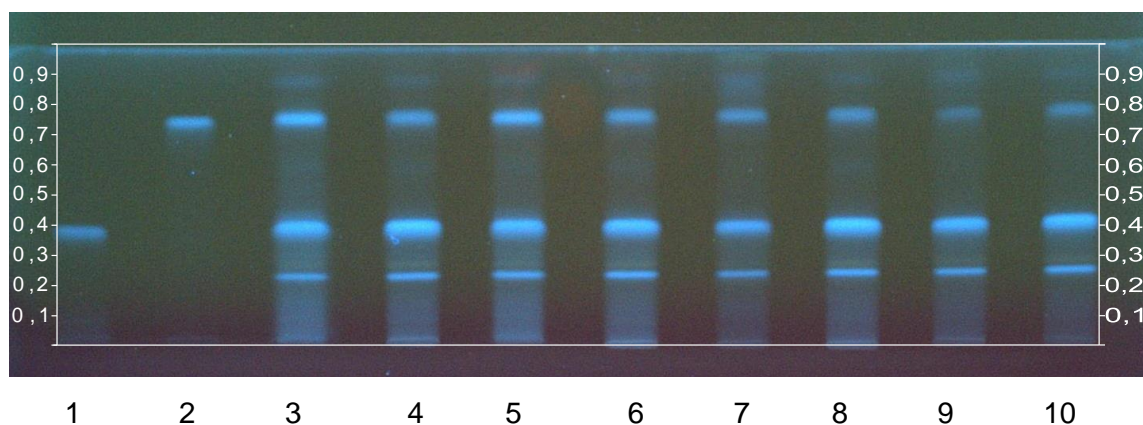


Abbildung 64 Versuch **Robustheit Entwicklungsstrecke**; Bahn 1: Chlorogensäure (0,1 mg/ml, 5 µl), Bahn 2: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (0,1 mg/ml, 5 µl), Bahn 3: Probe Herbasinica 150801H164 (5 µl), Bahn 4: Probe Plantasia (5 µl), Bahn 5: Probe Dr. Mei Wang 130401 (5 µl), Bahn 6: Probe Dr. Mei Wang 140528 (5 µl), Bahn 7: Probe Dr. Mei Wang 20131101 (5 µl), Bahn 8: Probe Chinamedica (5 µl), Bahn 9: Probe Sinophyto 02310340 (5 µl), Bahn 10: Probe Sinophyto 01270638 (5 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V/V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 6 cm (vom unteren Plattenrand), 366 nm.

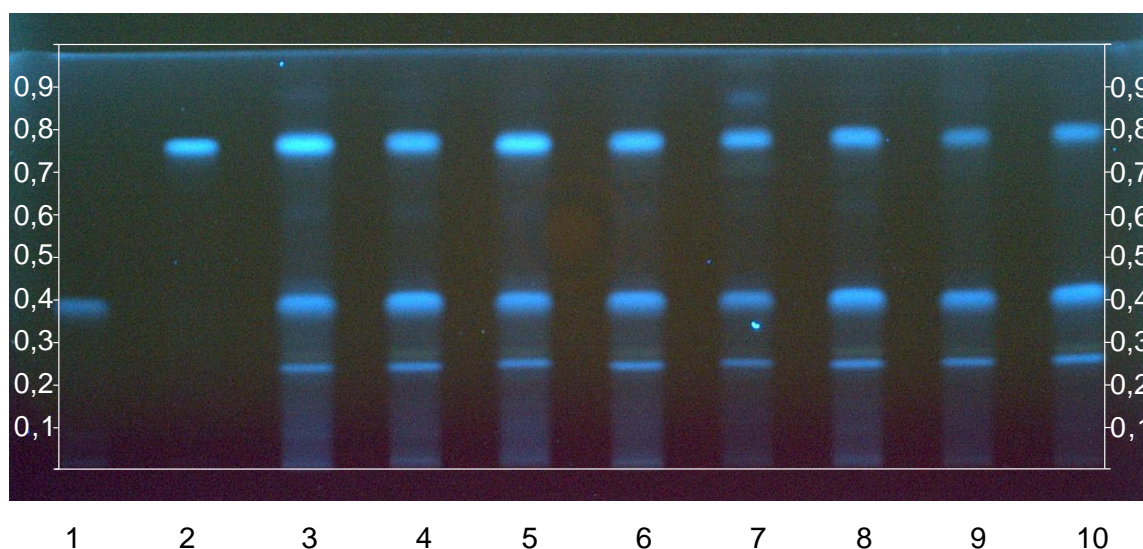


Abbildung 65 Versuch **Robustheit Entwicklungsstrecke**; Bahn 1: Chlorogensäure (0,1 mg/ml, 5 µl), Bahn 2: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (0,1 mg/ml, 5 µl), Bahn 3: Probe Herbasinica 150801H164 (5 µl), Bahn 4: Probe Plantasia (5 µl), Bahn 5: Probe Dr. Mei Wang 130401 (5 µl), Bahn 6: Probe Dr. Mei Wang 140528 (5 µl), Bahn 7: Probe Dr. Mei Wang 20131101 (5 µl), Bahn 8: Probe Chinamedica (5 µl), Bahn 9: Probe Sinophyto 02310340 (5 µl), Bahn 10: Probe Sinophyto 01270638 (5 µl); Fließmittel: Ethylacetat:Ameisensäure:Eisessig:Wasser (100:11:11:27; V/V/V/V), Kammersättigung 20 min, Entwicklungsstrecke 8 cm (vom unteren Plattenrand), 366 nm.

Tabelle 74 Zusammenfassung des Versuches Robustheit Entwicklungsstrecke anhand der durchschnittlichen R_f-Werte je Platte, verglichen mit dem Versuch Laborpräzision 2.

Versuch	Robustheit Entwicklungsstrecke 5 cm	Stabilität der Ergebnisse Entwicklungsstrecke 6 cm	Robustheit Entwicklungsstrecke 7 cm	Δ R _f
Chlorogensäure	0,39	0,40	0,39	0,01
1,5-Dicaffeoylchinasäure	0,75	0,78	0,77	0,03

Die erhaltenen Chromatogramme unterscheiden sich nicht in Bezug auf Anzahl, Position und Farbe der Banden, zudem war der Unterschied der R_f-Werte nicht größer als 0,06 Einheiten, der Robustheitstest wurde somit akzeptiert.

4.2.3 Ergebnisse der Prüfung auf Reinheit

4.2.3.1 Bestimmung des Trocknungsverlustes

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes erfolgte in Anlehnung an Ph.Eur. (2.2.32 Trocknungsverlust, **2017**) und wurde wie unter 3.2.2.1 beschrieben im Trockenschrank durchgeführt. Die Angabe erfolgte als der in Prozent (m/m) angegebene Masseverlust.

Tabelle 75 Ergebnisse zur Bestimmung des Trocknungsverlustes der verschiedenen Proben mit Tara [g], Einwaage [g], Auswaage [g] und dem Trocknungsverlust (TV) in [%].

Arobemed	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	34,3065	1,000	35,2333	0,9268	7,32
2. Einwaage	34,3065	0,9972	35,2295	0,9229	7,45
3. Einwaage	34,3065	1,0008	35,2346	0,9282	7,26
Mittelwert					7,34
StabW					0,0975
V_K					1,33
Phytax	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	39,4637	1,0051	40,3768	0,9130	9,16
2. Einwaage	39,4635	0,9989	40,3735	0,9100	8,89
3. Einwaage	39,4635	1,0009	40,3756	0,9120	8,88
Mittelwert					8,98
StabW					0,157
V_K					1,75
Plantasia	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	33,4752	1,0010	34,3996	0,9244	7,65
2. Einwaage	33,4746	1,0047	34,4031	0,9284	7,59
3. Einwaage	33,4746	1,0031	34,4023	0,9278	7,51
Mittelwert					7,58
StabW					0,0675
V_K					0,890
Chinamedica	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	34,5820	0,9997	35,4958	0,9138	8,59
2. Einwaage	34,5818	1,0042	35,5002	0,9184	8,55
3. Einwaage	34,5818	1,0016	35,4984	0,9166	8,49
Mittelwert					8,54
StabW					0,0515
V_K					0,603
Yong	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	31,0530	0,9995	31,9631	0,9100	8,96
2. Einwaage	31,0529	0,9995	31,9642	0,9113	8,83
3. Einwaage	31,0530	1,0045	31,9698	0,9168	8,73
Mittelwert					8,84
StabW					0,112
V_K					1,27

Herbasinica	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	33,1784	1,0046	34,1026	0,9243	8,00
2. Einwaage	33,1777	1,0008	34,0994	0,9217	7,91
3. Einwaage	33,1777	0,9958	34,0955	0,9178	7,83
Mittelwert					7,91
StabW					0,0860
V_K					1,09
Sinophyto 02310340	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Differenz [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	33,1114	1,0052	34,0456	0,9342	7,06
2. Einwaage	33,1113	1,0039	34,0444	0,9331	7,05
3. Einwaage	33,1112	0,9968	34,0387	0,9275	6,95
Mittelwert					7,03
StabW					0,0585
V_K					0,832

Die Ergebnisse des Versuches Trocknungsverlust (Tabelle 75) der einzelnen Drogenmuster chinesischer Importware bewegen sich zwischen 7,03% (m/m) für Probe Sinophyto und 8,98% (m/m) für Probe Phytax ohne größere Abweichungen. Das ChP (Xanthii Fructus, **2015**) gibt für die Rohdroge einen maximalen Trocknungsverlust von 12,0% (m/m) und für die geröstete Droge einen Maximalwert von 10,0% (m/m) an. Da die Erstellung einer DAB Monographie der gerösteten Droge im Vordergrund stand, wurde dieser Maximalgehalt für den Trocknungsverlust von 10,0% (m/m) für den Monographievorschlag übernommen.

4.2.3.2 Bestimmung der Asche

Die Bestimmung wurde gemäß dem Ph.Eur. (2.4.16 Asche, **2017**) und wie unter 3.2.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Angabe erfolgt als prozentualer Anteil (m/m) an der eingewogenen Masse nach Durchführung des Experimentes.

Tabelle 76 Ergebnisse aus der Bestimmung der Asche mit Probenamen, Tara [g], Ein- und Auswaage [g] und dem Aschewert [g/%].

Sinophyto 02310340	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	Asche [%, (m/m)]
1. Einwaage	21,6086	0,9999	21,6394	0,0308	3,1
2. Einwaage	19,4261	1,0016	19,4588	0,0326	3,3
3. Einwaage	21,0194	1,0007	21,0517	0,0323	3,2
Mittelwert					3,2
StabW					0,094
V_K					3,0

Phytax	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	Asche [%, (m/m)]
1. Einwaage	21,8057	1,0021	21,1179	0,0322	3,2
2. Einwaage	21,0578	0,9999	21,0895	0,0316	3,2
3. Einwaage	21,6064	1,0018	21,6382	0,0318	3,2
Mittelwert					3,2
StabW					0,027
V _K					0,8
Arobemed	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	21,6476	0,9995	21,6774	0,0298	3,0
2. Einwaage	21,6046	1,0012	21,6349	0,0302	3,0
3. Einwaage	22,2217	1,0006	22,2517	0,0300	3,0
Mittelwert					3,0
StabW					0,017
V _K					0,6
Plantasia	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	20,9430	1,0001	20,9731	0,0301	3,0
2. Einwaage	22,7448	1,0010	22,7752	0,0304	3,0
3. Einwaage	21,4641	0,9996	21,4943	0,0302	3,0
Mittelwert					3,0
StabW					0,0013
V _K					0,42
Herbasinica 100401H164	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	25,8599	1,0000	25,8912	0,0313	3,1
2. Einwaage	21,9022	0,9998	21,9344	0,0322	3,2
3. Einwaage	21,6770	1,0003	21,7087	0,0317	3,2
Mittelwert					3,2
StabW					0,047
V _K					1,5
Yong	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	26,4222	0,9999	26,4542	0,0320	3,2
2. Einwaage	20,8626	1,0000	20,8958	0,0332	3,3
3. Einwaage	20,8166	1,0023	20,8489	0,0323	3,2
Mittelwert					3,2
StabW					0,066
V _K					2,0
Chinamedica	Tara [g]	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Asche [g]	TV [%, (m/m)]
1. Einwaage	21,6941	1,0014	21,7241	0,0300	3,0
2. Einwaage	25,9829	0,9935	26,0124	0,0296	3,0
3. Einwaage	20,0026	1,0005	20,0328	0,0302	3,0
Mittelwert					3,0
StabW					0,020
V _K					0,65

Die Ergebnisse der Reinheitsbestimmung Asche (Tabelle 76) bewegten sich ohne größere Abweichungen in einem Bereich von 3,0%-3,2% (m/m), der Ascherückstand zeigte zudem

keine Verfärbung. Das ChP 2015 erlaubt sowohl für die Rohdroge, als auch für das geröstete Drogenmaterial einen Aschewert von maximal 5,0% (m/m) (Xanthii Fructus, **2015**), dieser Wert konnte für den Monographievorschlag für das DAB übernommen werden.

4.2.3.3 Bestimmung des Gehaltes an Carboxyatractylosid und Atractylosid per HPLC

Das ChP 2010 enthält in der Monographie von Xanthii fructus (Xanthii Fructus, **2010**) keine Angaben bezüglich einer Reinheitsbestimmung oder einer Gehaltsbestimmung. Erst in der Ausgabe 2015 (Xanthii Fructus, **2015**) wird für die Rohdroge eine Reinheitsbestimmung auf Carboxyatractylosid und für die verarbeitete (processed) Droge eine Reinheitsbestimmung auf Atractylosid gefordert (Erläuterungen hierzu unter 4.2.5 und 4.4.1). Zusätzlich soll eine Gehaltsbestimmung des Inhaltsstoffes Chlorogensäure durchgeführt werden.

Unter 4.2.3.3.1 wird die Entwicklung einer Methode, in Form einer Reinheitsbestimmung vorgestellt, mittels derer beide Diterpene (CATR und ATR) gleichzeitig bestimmt und quantifiziert werden können.

4.2.3.3.1 Methodenevaluierung und Entwicklung

Die Methode aus dem ChP 2015 zur Quantifizierung von CATR in ungeröstetem Drogenmaterial oder Rohdroge (Xanthii Fructus, **2015**) führt zu dem in Abbildung 66 abgebildeten Chromatogramm. CATR eluiert mit einem starken Tailing bei etwa 18 min. Eine Optimierung dieser Methode war unerlässlich, um sowohl die Retentionszeit als auch die Peakform des Diterpens zu verbessern.

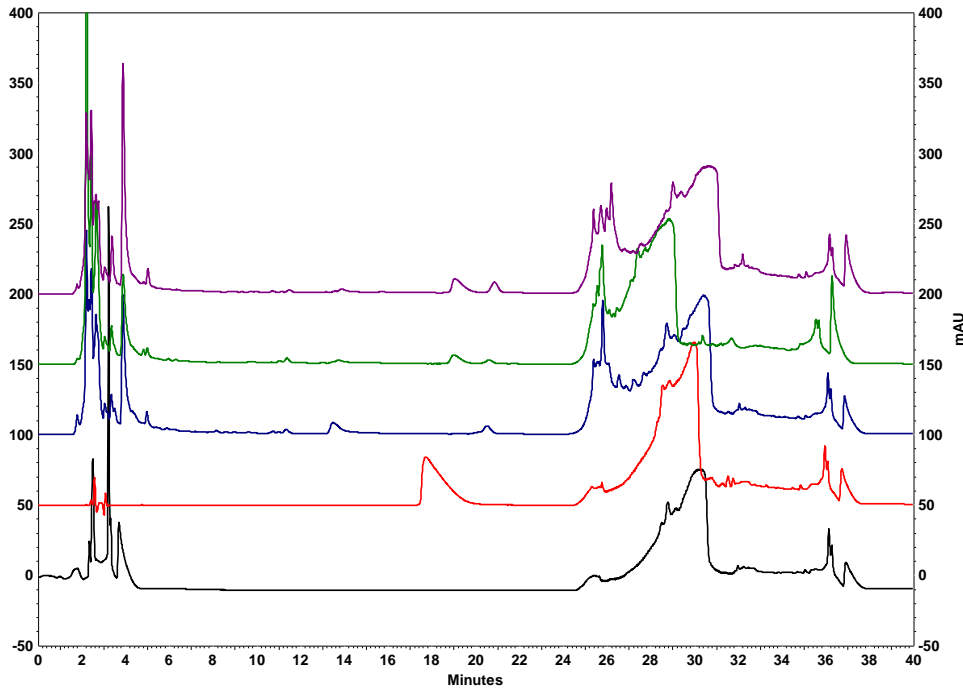


Abbildung 66 HPLC-Chromatogramm (203 nm, Methode V, 4.2.1.3) von mehreren Xanthii fructus Proben (Probe **Herbasinica**, blau; Probe **Dr. Mei Wang 20131101**, grün; Probe **Chinamedica**, lila), **ATR** (1 mg/ml, rot) und einem Leerwert (schwarz), Injektionsvolumen je 5 µl, mobile Phase bestehend aus 0,01 molare Natriumdihydrogenphosphatlösung (pH 5,4) (A) und Acetonitril (B), Elution Tabelle 57 (4.2.1.3), 1,000 ml/min, 25 °C.

Die Evaluation der Methode zur Quantifizierung von ATR (Methode VI, 4.2.1.3) in geröstetem Drogenmaterial (Xanthii Fructus, 2015) ergab die in Abbildung 67 dargestellten Chromatogramme. Der Unterschied der Methoden V und VI liegt lediglich in der Zusammensetzung des Fließmittels bei isokratischer Elution.

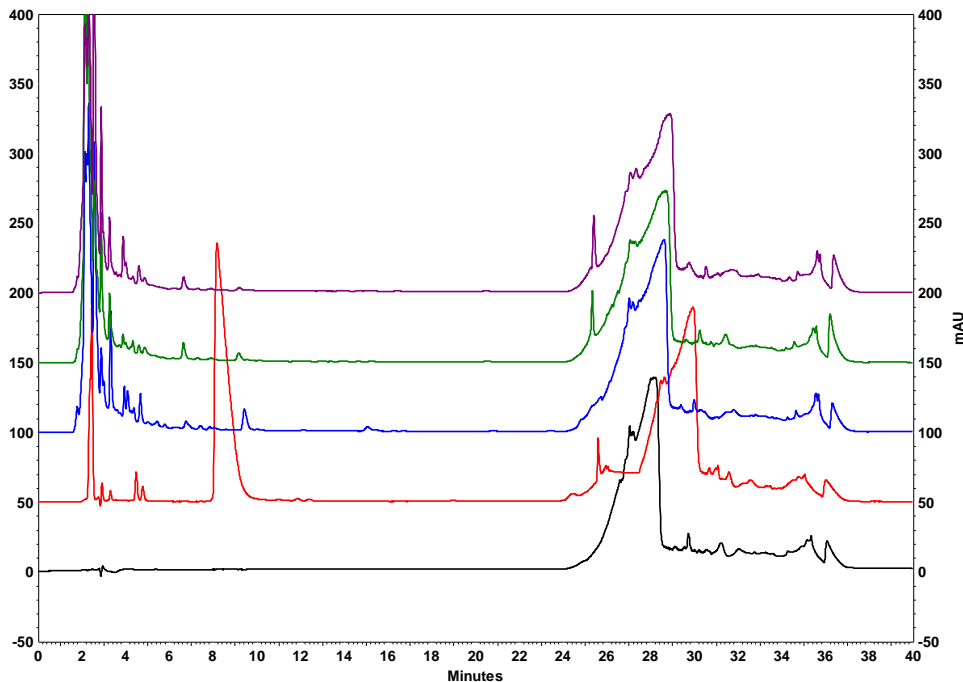
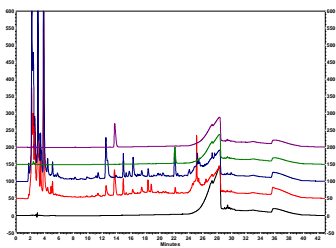


Abbildung 67 HPLC-Chromatogramm (203 nm, Methode VI, 4.2.1.3) von mehreren Xanthii fructus Proben (Probe **Herbasinica**, blau; Probe **Dr. Mei Wang 20131101**, grün; Probe **Chinamedica**, lila), **ATR** (5 mg/ml, rot) und einem Leerwert (schwarz), Injektionsvolumen je 5 µl, mobile Phase bestehend aus 0,01 molare Natriumdihydrogenphosphatlösung (pH 5,4) (A) und Acetonitril (B), Elution Tabelle 58 (4.2.1.3), 1,000 ml/min, 25 °C.

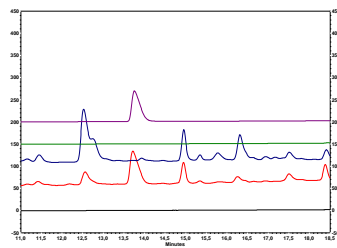
Das Diterpen Atractylosid eluiert bei ca. 9 min mit einer Peakform, die deutlich besser als die des Carboxyatractylosids aus dem vorherigen Versuch ist. Ziel war es jedoch in weiterführenden Versuchen eine Methode zu finden, mittels derer beide Diterpene gleichzeitig in einem Lauf detektiert und quantifiziert werden können.

Erste Modifikationen betrafen den Extraktionsschritt, bei dem ohne Zentrifugation die Probe filtriert und dann auf ein definiertes Volumen mit Lösungsmittel aufgefüllt wurde. Die Zusammensetzung der mobilen Phase wurde ebenfalls von einer isokratischen Elution zu einem Gradienten abgeändert (Methode VII, 4.2.1.3). In Abbildung 68 ist das resultierende Chromatogramm dargestellt.

Teilabbildung A



Teilabbildung B



Teilabbildung C

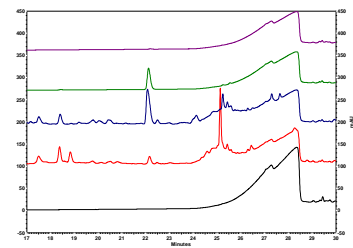
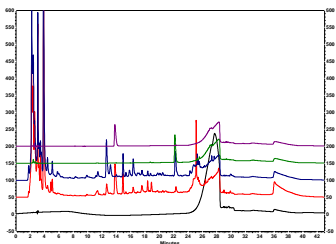


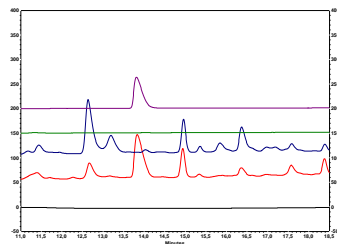
Abbildung 68 HPLC Chromatogramme (203 nm, Methode VII, 4.2.1.3) von mehreren Xanthii fructus Proben (Probe **Herbasinica**, blau; Probe **Sinophyto 02310340**, rot), **CATR** (1 mg/ml, lila), **ATR** (1 mM, grün) und einem Leerwert (schwarz), Injektionsvolumen 20 µl der Extrakte und 2 µl der Referenzsubstanzen, mobile Phase bestehend aus 0,01 molare Natriumdihydrogenphosphatlösung (pH 5,4) (A) und Acetonitril (B), Elution Tabelle 59 (4.2.1.3), 1,000 ml/min, 25 °C; **Teilabbildung A**: Komplettes Chromatogramm, **Teilabbildung B**: Teilchromatogramm von 11-18,5 min, **Teilabbildung C**: Teilchromatogramm von 17-30 min.

Die beiden Diterpene eluieren getrennt voneinander und von anderen Peaks mit einer zufriedenstellenden Peakform bei 13,7 min (CATR) bzw. 22,1 min (ATR). Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu untersuchen, wurden die Drogenmuster erneut extrahiert und nach selbiger Methode chromatographiert (Methode VII, 4.2.1.3).

Teilabbildung A



Teilabbildung B



Teilabbildung C

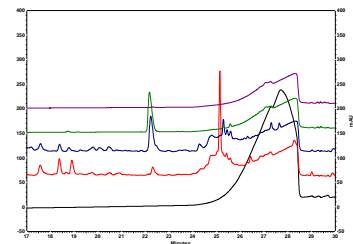


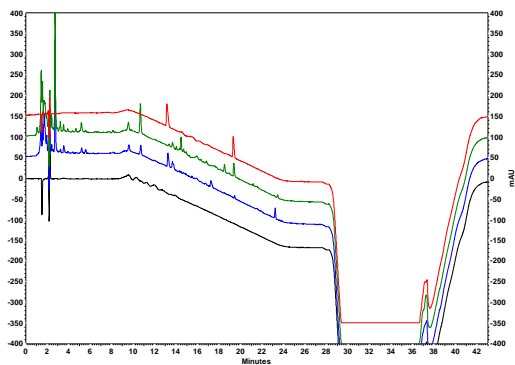
Abbildung 69 HPLC Chromatogramme (203 nm, Methode VII, 4.2.1.3) von zwei Xanthii fructus Proben (Probe **Herbasinica**, blau; Probe **Sinophyto 02310340**, rot), **CATR** (1 mg/ml, lila), **ATR** (1 mM, grün) und einem Leerwert (schwarz), Injektionsvolumen 20 µl der Extrakte und 2 µl der Referenzsubstanzen, mobile Phase bestehend aus 0,01 molare Natriumdihydrogenphosphatlösung (pH 5,4) (A) und Acetonitril (B), Elution Tabelle 59 (4.2.1.3), 1,000 ml/min, 25 °C; **Teilabbildung A**: Komplettes Chromatogramm, **Teilabbildung B**: Teilchromatogramm von 11-18,5 min, **Teilabbildung C**: Teilchromatogramm von 17-30 min.

Wie in Abbildung 69 zu erkennen ist, zeigten sich nach Wiederholen des Experimentes Probleme bei der Reproduzierbarkeit der chromatographischen Auftrennung. Der Peak des ATR war nicht sauber getrennt (Abbildung 69, Teilabbildung C, Probe **Herbasinica** und Probe

Sinophyto), da eine weitere Substanz annähernd zur gleichen Zeit eluiert. Es war nicht mit Sicherheit festzustellen, ob die coeluiierende Substanz unter dem ATR Peak lag (Abbildung 68, Teilabbildung C) und es durch Veränderungen der Chromatographiebedingungen zu einer Verschiebung der Retentionszeiten gekommen war. Da die mobile Phase unter anderem aus einem nicht flüchtigen Puffer (Phosphat-Puffer) besteht, musste von einer LC-MS Überprüfung abgesehen werden (The HPLC-MS Handbook for Practitioners, **2017**; Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry, **2007**). Es liegt aber nahe, dass das Problem der Reproduzierbarkeit auf das Puffersystem zurückzuführen ist. Minimale Veränderungen im pH-Wert des Puffers, die durch die Herstellung und Geräteungenauigkeiten bedingt sind, führen unter Umständen zu den veränderten Retentionszeiten.

In weiteren Versuchen sollte die Auftrennung an einer modifizierten C18-Säule vorgenommen und der Phosphatpuffer durch ein alternatives Fließmittel, einem Acetat-Puffer, ersetzt werden. Durch die Wahl dieses Puffers kann per LC-MS Analytik untersucht werden (The HPLC-MS Handbook for Practitioners, **2017**), ob Peaks mit anderen Substanzen coeluiieren oder rein sind. Das geringe/fehlende Chromophor der Analyten machte eine Reinheitsbestimmung der Peaks durch die UV-Spektren nicht möglich. In Anlehnung an (Nikles, **2012**; Steenkamp et al., **2006**) wurde die Analyse der Extrakte nach Methode VIII (Kapitel 4.2.1.3) durchgeführt und resultierte in den in Abbildung 70 dargestellten Chromatogrammen.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

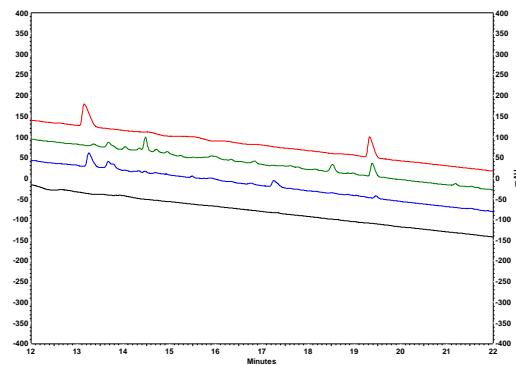
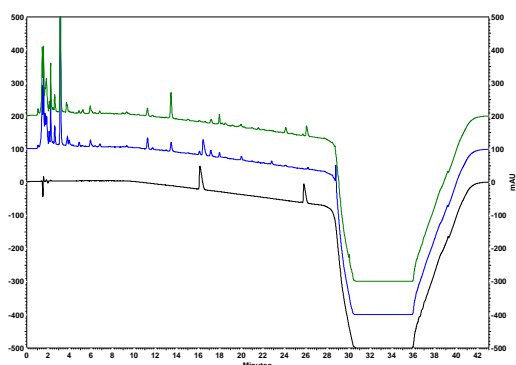


Abbildung 70 HPLC Chromatogramme (203 nm, Methode VIII, 4.2.1.3) von zwei Xanthii fructus Proben (Probe **Herbasinica**, grün; Probe **Sinophyto 02310340**, blau), **CATR** und **ATR** (1:1 Mischung einer je 1 mM-Lösung, rot) und einem Leerwert (schwarz), Injektionsvolumen 10 µl (Extrakte) und 6 µl (Referenzsubstanz), mobile Phase bestehend aus 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 4,5) (A) und Acetonitril (B), Gradient Tabelle 60 (4.2.1.3), 1,000 ml/min, 40 °C; **Teilabbildung A**: Komplettes Chromatogramm, **Teilabbildung B**: Teilchromatogramm 12-22 min.

Methode VIII ermöglicht eine gute Trennung der beiden Diterpene, die bei 13,2 min (CATR) bzw. 19,3 min (ATR) eluieren. Um jedoch die Peakform der Analyten noch zu verbessern und den Basislinienshift zu minimieren, wurde als Alternative zum Acetatpuffer im folgenden Versuch ein Ammoniumformiat/Ameisensäure-Puffersystem verwendet.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

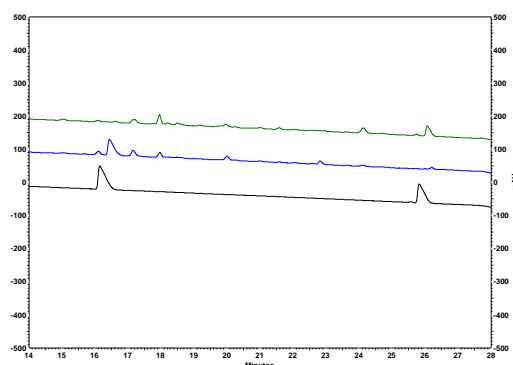


Abbildung 71 HPLC Chromatogramme (203 nm, Methode IX, 4.2.1.3) von zwei Xanthii fructus Proben (Probe **Herbasinica**, grün; Probe **Chinamedica**, blau), **CATR** und **ATR** (1:1 Mischung einer je 1 mM-Lösung, schwarz), Injektionsvolumen 10 μ l (Extrakte) und 6 μ l (Referenzsubstanz), mobile Phase bestehend aus 10 mM Ammoniumformiat-Lösung (pH 4,5) (A) und Acetonitril (B), Gradient Tabelle 61 (4.2.1.3), 1,000 ml/min, 40 °C; **Teilabbildung A**: Komplettes Chromatogramm, **Teilabbildung B**: Teilchromatogramm 14-28 min.

Die Ergebnisse der Chromatographie sind in Abbildung 71 dargestellt. Im Vergleich zur Analyse mit Acetatpuffer (Abbildung 70) ist durch den Formiatpuffer der Basislinienshift weniger stark ausgeprägt, zudem sind die Peaks der beiden Analyten, CATR (16,1 min) und ATR (25,8 min) schmaler und schärfer, da auch das Tailing minimiert werden konnte. Um die Wahrscheinlichkeit einer Coelution anderer Substanzen mit den Analyten auszuschließen, wurden LC(UPLC)-MS Analysen durchgeführt und eine Coelution weitestgehend ausgeschlossen (Ergebnisse im Anhang dargestellt). Weiterhin wurde durch Vermessung der UV-Spektren unterschiedlicher Zusammensetzungen der mobilen Phase eine Eigenabsorption des Fließmittels bei 203 nm ausgeschlossen. Eine neue Quantifizierungsmethode zur Reinheitsbestimmung der beiden Diterpene CATR und ATR in Extrakten von Xanthii fructus war somit gefunden und musste weiterhin auf die Parameter wie Präzision, Robustheit und Wiederfindung hin untersucht und validiert werden. Da jedoch die isolierte Referenzsubstanz ATR (Kapitel 4.3) nur in geringer Menge verfügbar und kommerziell weder in Deutschland noch in China erwerbbar war, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Validierung der Methode lediglich für das Diterpen CATR (berechnet als Dikaliumsalz) durchgeführt werden. Für die weitere Validierung in Bezug auf ATR soll die Verbindung in größeren Mengen aus Xanthii fructus isoliert werden, um diese Substanz in einer nachfolgenden Arbeit in die Methodvalidierung einzubeziehen.

4.2.3.3.2 Methodenvalidierung

Die unter 4.2.1.3 vorgestellte Methode IX zur Quantifizierung der beiden Diterpene CATR und ATR mittels HPLC-DAD wurde nach den Vorgaben des Kapitels 3.2.3.2.2 auf die Parameter Stabilität, Spezifität, Präzision, Robustheit und Wiederfindung für CATR validiert.

Stabilität des Analyten in Lösung

Zum Nachweis der Stabilität des Analyten in Lösung wurde der frische Extrakt von *Xanthii fructus* über mehr als 14 Stunden zwanzigmal hintereinander in die HPLC injiziert und chromatographiert. Der Variationskoeffizient der gemessenen Flächen [AUC] für CATR lag unter 5% (Tabelle 77). Die Stabilität über diesen Zeitraum konnte somit belegt werden.

Tabelle 77 Versuch Stabilität des Analyten in Lösung für CATR in einem Extrakt von *Xanthii fructus* mit Ergebnissen (Fläche [AUC]) aus sechs verschiedenen Messungen mit Mittelwert, Standardabweichung (StabW) und Variationskoeffizient (V_K).

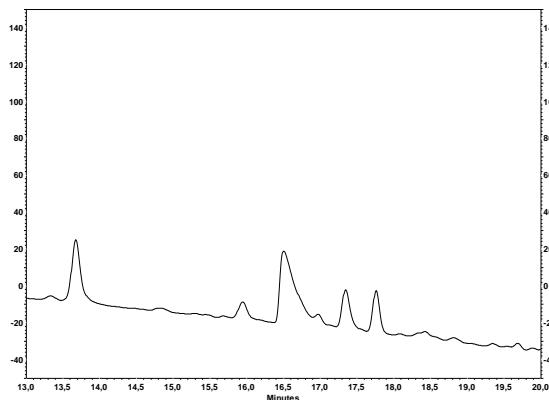
CATR	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6
Zeit [min]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]
0-43	2176788	2344867	2270498	2235817	2213430	1859457
43-86	2201817	2370243	2259981	2211515	2211137	1870575
86-129	2223293	2367178	2247880	2206023	2203134	1864660
129-172	2224762	2332892	2242978	2156386	2212025	1876098
172-215	2210365	2333628	2226429	2114047	2210950	1859278
215-258	2198537	2307177	2218917	2098689	2191145	1848479
258-301	2185170	2300660	2244170	2123778	2200597	1856170
301-344	2193032	2295332	2216796	2100640	2184167	1844361
344-387	2165010	2260705	2252371	2082675	2183216	1843305
387-430	2168257	2228380	2227174	2070039	2180755	1830054
430-473	2174573	2260286	2177043	2061667	2156811	1817285
473-516	2143145	2223385	2235572	2031600	2132150	1815753
516-559	2158652	2232824	2221408	2026885	2110406	1807498
559-602	2150595	2198337	2226559	2039609	2095066	1814558
602-645	2151471	2223175	2227549	2032551	2089882	1791648
645-688	2158639	2182195	2170209	2011733	2086881	1808042
688-731	2122771	2221225	2222562	2001196	2084768	1799477
731-774	2158522	2238834	2208876	2002079	2077020	1798392
774-817	2138760	2243314	2206585	2013650	2086737	1785522
817-860	2145600	2235296	2231377	2013412	2048608	1805458
Mittelwert	2172488	2269997	2226747	2081700	2147944	1829804
StabW	28709	57049	24482	73396	57098	28728
V_K	1,32	2,51	1,10	3,53	2,66	1,57

Spezifität

Der Peak von CATR eluierte in allen Analysen in einem Bereich von 16,2-16,6 min. Für den Validierungsparameter Spezifität wurde die Auflösung R_s nach Formel 1 zu den

nächstgelegenen Peaks exemplarisch an einem Chromatogramm berechnet und betrug 1,22 (Peak CATR zu zuvor eluierendem Peak) bzw. 2,89 (Peak CATR zu nachfolgend eluierendem Peak). Zudem konnte die LC-MS Analytik aller Proben und der Referenzsubstanz(en) ebenfalls zum Beweis für die Spezifität der Methode herangezogen werden (UPLC-MS Daten im Anhang). Da es durch den Pufferzusatz im wässrigen Teil des Fließmittels zu minimalen Schwankungen in den Retentionszeiten kommt, waren die Chromatogramme nicht immer deckungsgleich. Es kam zur verspäteten bzw. verfrühten Elution von CATR, was im ungünstigsten Fall zu einer Verschlechterung der Auflösung beitrug. Abbildung 72 zeigt die beiden extremen Fälle einer verspäteten (Teilabbildung A) bzw. einer verfrühten (Teilabbildung B) Elution.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

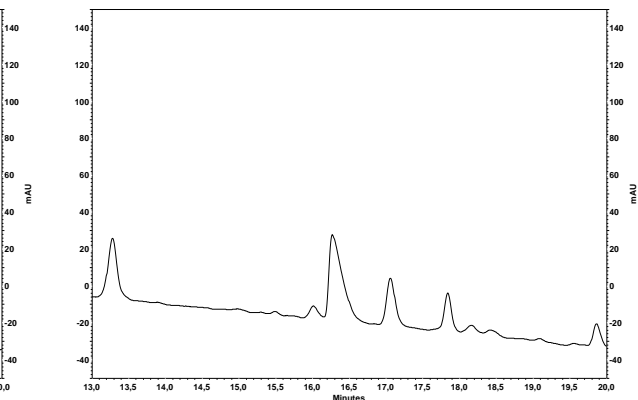


Abbildung 72 HPLC-Chromatogramm (203 nm) eines Xanthii fructus Extraktes (Probe Chinamedica) aufgearbeitet und chromatographiert nach Methode IX (4.2.1.3). **Teilabbildung A:** Teilchromatogramm 13,0-20,0 min (CATR 16,5 min), **Teilabbildung B:** Teilchromatogramm 13,0-20,0 min (CATR 16,3 min).

Trotz der vorgestellten Problematik wurde der Test akzeptiert, da sich mit allen evaluierten Puffersystemen diese Diskrepanzen ergaben.

Kalibrierung

Messbereich (Range)

Um den Messbereich für die Kalibrierung zu eruieren, wurde zunächst eine Stammlösung (0,2752 mg/ml) des Dikaliumsalzes von CATR angefertigt, verdünnt (1:2, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:25) und zusammen mit sieben frisch extrahierten Drogenextrakten chromatographiert.

Tabelle 78 Konzentration [mg/ml] und Signalwerte [AUC] von CATR zur Festlegung des Kalibrierbereiches.

CATR	Stammlösung	1:2	1:5	1:10	1:20	1:25
c [mg/ml]	0,2752	0,1376	0,0550	0,0275	0,0138	0,0055
Signal [AUC]	4196914	1943642	762718	378375	175359	147548

Anhand der Daten in Tabelle 78 konnte eine Kalibriergerade (Abbildung 73) aufgestellt und mit Hilfe dieser die Konzentrationen von CATR in den einzelnen Extrakten berechnet (Tabelle 79) werden. Ausgehend vom rechnerischen arithmetischen Mittel der Analytkonzentrationen aller vermessenen Proben wurde ein Kalibrierbereich festgelegt und die einzelnen Kalibrierlösungen (Level 1-6) möglichst äquidistant über diesen Bereich verteilt.

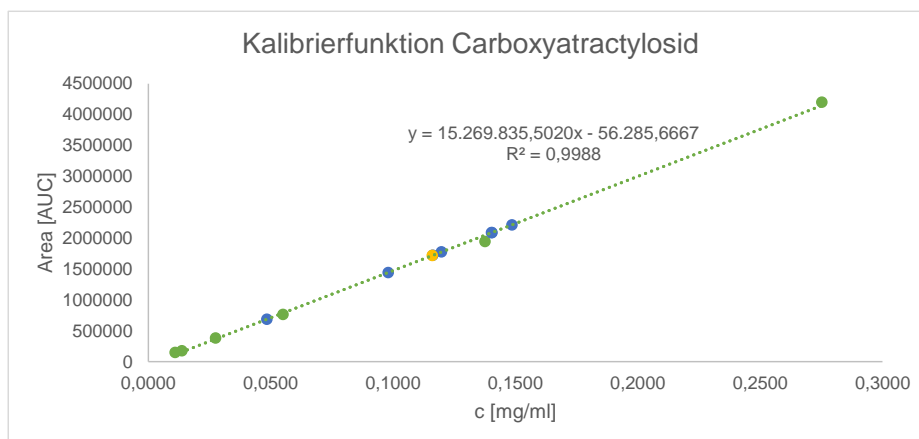


Abbildung 73 Kalibriergerade von CATR erstellt aus den Messwerten Tabelle 78. In grün dargestellt die Kalibrierpunkte, blau stellen die unterschiedlichen Proben dar und gelb zeigt den Mittelwert der Konzentrationen in den Proben an.

Tabelle 79 Signal [AUC] und errechnete c [mg/ml] an CATR in den verschiedenen Xanthii fructus Proben. Bestimmt über die Kalibrierfunktion aus den Daten aus Tabelle 79.

Probe	Signal [AUC] CATR	c [mg/ml] CATR
<i>Chinamedica</i>	2213081	0,1486
<i>Plantasia</i>	2087456	0,1404
<i>Sinophyto 02310340</i>	1718807	0,1162
<i>Sinophyto 01270638</i>	1773166	0,1198
<i>Dr. Mei Wang 130401</i>	684041	0,0485
<i>Dr. Mei Wang 20131101</i>	1441232	0,0981
<i>Dr. Mei Wang 140528</i>	2085640	0,1403

Tabelle 80 Festgelegte Konzentrationen [mg/ml] für die Kalibrierfunktion von CATR.

CATR	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Level 6
c [mg/ml]	0,0197	0,0394	0,0788	0,1182	0,1576	0,1969

Kalibrierfunktion

Zur Herstellung der Kalibrierlösungen wurden jeweils aus zwei frisch hergestellten Stammlösungen drei unabhängige Verdünnungsreihen angefertigt und nach Methode IX (Kapitel 4.2.1.3) vermessen. Somit wurde jeder Punkt der Kalibriergeraden in sechsfacher Ausführung (je in Duplikaten) chromatographiert.

Xanthii fructus (*Xanthium sibiricum* PATR.)

Tabelle 81 Gemessene Flächen [AUC] für die unterschiedlichen Kalibrierlösungen von CATR.

CATR		<i>Level 6</i>	<i>Level 5</i>	<i>Level 4</i>	<i>Level 3</i>	<i>Level 2</i>	<i>Level 1</i>
<i>Messung</i>	<i>c</i> [mg/ml]	0,1969	0,1576	0,1182	0,0788	0,0394	0,0197
1	Fläche [AUC]	3092036	2424063	1827040	1194224	518279	293075
2	Fläche [AUC]	3082556	2392779	1844246	1153040	506544	290549
3	Fläche [AUC]	3104872	2409296	1795941	1176557	568404	287782
4	Fläche [AUC]	2892848	2265620	1670382	1128500	581207	255032
5	Fläche [AUC]	2907047	2274960	1668006	1100403	508098	268865
6	Fläche [AUC]	2891005	2307239	1671856	1090153	572402	258918
Mittelwert	Fläche [AUC]	2995061	2345659	1746245	1140479	542489	275703
StabW	Fläche [AUC]	107833	71131	84867	41546	35004	16875
V_k	[%]	3,60	3,03	4,86	3,64	6,45	6,12

a) Lineare Regression

Die Kalibriergerade wurde rechnerisch mit Hilfe der Formeln aus Kapitel 3.2.3.2.2 ermittelt. Für die graphische Darstellung wurden die Mittelwerte aus den Flächenmessungen der einzelnen Kalibrierpunkte gegen die vermessenen Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 74).

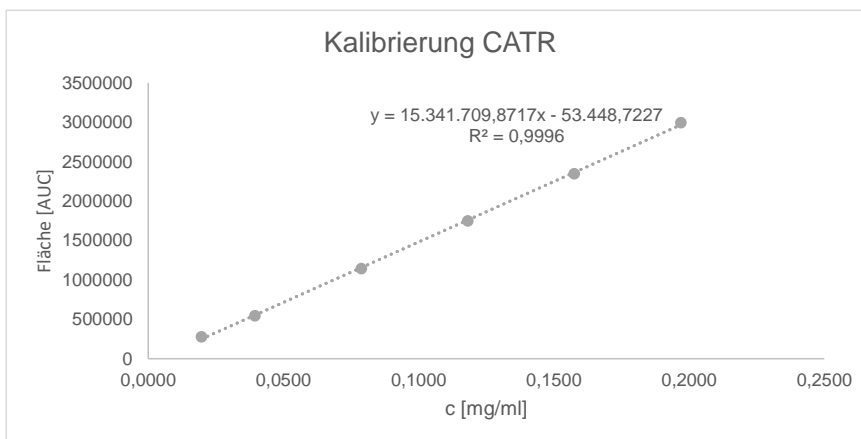


Abbildung 74 Lineare Kalibrierfunktion von CATR.

Mittels Formel 8 konnte die Reststandardabweichung s_y berechnet werden und ergab einen Wert von 23693,39.

Die mit Formel 9 berechnete Verfahrensstandardabweichung s_{x0} betrug 0,0015 und die relative Standardabweichung V_{x0} 1,52% (Formel 10).

b) Quadratische Regression

Zur Berechnung der quadratischen Regression wurden die Werte aus Tabelle 81 und die Formeln aus Kapitel 3.2.3.2.2 (Kalibrierung, Kalibrierfunktion, b) quadratische Regression) verwendet und führte zu folgender Funktion (Abbildung 75).

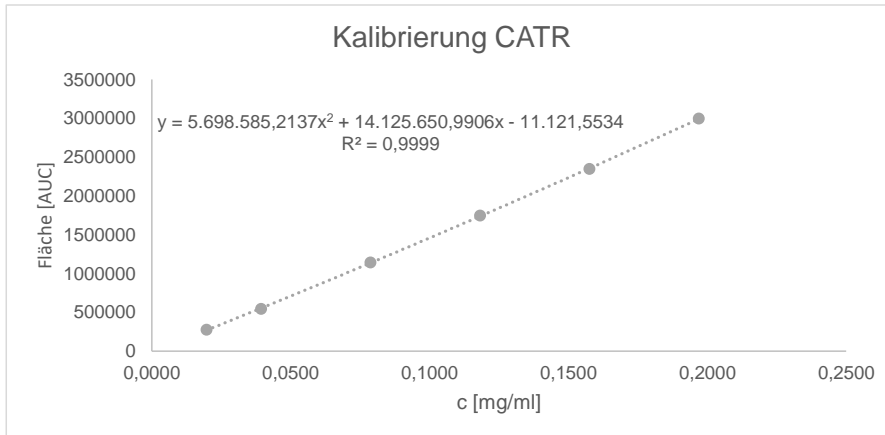


Abbildung 75 Quadratische Regression für die Werte aus Tabelle 81.

Nach Berechnung der Reststandardabweichung s_y (Formel 8), Verfahrensstandardabweichung s_{x0} (Formel 9) und der relativen Verfahrensstandardabweichung V_{x0} (Formel 10) ergaben sich folgende Werte:

- s_y : 11220,12
- s_{x0} : 0,0007
- V_{x0} : 0,72%.

Da sich aus den Berechnungen für die (relative) Verfahrensstandardabweichung für die quadratische Regression ein kleinerer Wert ergab als für die lineare Regression, war ein Anpassungstest nach Mandel gemäß Kapitel 3.2.3.2.2 durchzuführen. Für die Prüfgröße berechnet nach Formel 24 ergab sich ein Wert von 14,84, der kleiner ist als der tabellierte Wert mit 34,12 ($f_1=1$, $f_2=3$; $p=99\%$) aus der F -Tabelle. Die Nullhypothese ist daher anzunehmen, d.h. der Unterschied der beiden relativen Verfahrensstandardabweichungen ist nicht signifikant unterschiedlich (die Unterschiede sind zufälliger Natur). Eine lineare Regression konnte für die Auswertung verwendet werden.

Wiederholpräzision

Zur Überprüfung der Wiederholpräzision wurde eine Probe des Drogenmaterials sechsmal an einem Tag unabhängig voneinander extrahiert und chromatographiert. Die Abweichungen (V_k)

der Ergebnisse bewegten sich unterhalb von 5% (Tabelle 82) und somit konnte der Test akzeptiert werden.

Tabelle 82 Ergebnisse mit Fläche [AUC], c [mg/ml] und Gehalt [%] aus dem Versuch Wiederholpräzision.

CATR	Fläche [AUC]	c [mg/ml]	Gehalt [%]
<i>Chinamedica 1</i>	2273557	0,1517	0,3034
<i>Chinamedica 2</i>	2226883	0,1486	0,2973
<i>Chinamedica 3</i>	2294527	0,1530	0,3061
<i>Chinamedica 4</i>	2258454	0,1507	0,3041
<i>Chinamedica 5</i>	2263432	0,1510	0,3020
<i>Chinamedica 6</i>	2245888	0,1499	0,2997
Mittelwert	2260457	0,1508	0,3016
StabW	23172	0,0015	0,0030
V_K	1,03	1,00	1,00

Laborpräzision

Eine Probe des Drogenmaterials wurde an sechs verschiedenen Tagen unabhängig voneinander extrahiert, chromatographiert und die Ergebnisse, anhand der Flächen [AUC], Konzentrationen [mg/ml] und Gehalte [%] ausgewertet (Tabelle 83) und verglichen.

Tabelle 83 Ergebnisse mit Fläche [AUC], c [mg/ml] und Gehalt [%] aus dem Versuch Laborpräzision.

CATR	Fläche [AUC]	c [mg/ml]	Gehalt [%]
<i>Chinamedica 1</i>	2357555	0,1572	0,3143
<i>Chinamedica 2</i>	2273557	0,1517	0,3034
<i>Chinamedica 3</i>	2213074	0,1477	0,2955
<i>Chinamedica 4</i>	2265239	0,1511	0,3023
<i>Chinamedica 5</i>	2264974	0,1511	0,3022
<i>Chinamedica 6</i>	2110254	0,1410	0,2821
Mittelwert	2247442	0,1500	0,3000
StabW	81771	0,0053	0,0107
V_K	3,64	3,55	3,55

Da die Abweichungen V_K unter 5% liegen, wurde der Validierungsparameter Laborpräzision als erfüllt erachtet.

Prognoseauswertung und Prognoseintervall

Im Rahmen des Versuches Prognoseauswertung und Prognoseintervall wurden alle Proben des Drogenmaterials sechsmal unabhängig voneinander extrahiert, chromatographiert und die Ergebnisse verglichen. Der statistische Fehler wurde anhand des Vertrauensbereiches (VB; Formeln 34 und 35) durch Formel 36 berechnet (Tabelle 84).

Kapitel 4

Tabelle 84 Konzentrationen [mg/ml], Standardabweichung [mg/ml] und V_K [%] der Proben nach Extraktion und Chromatographie (n=6 je Probe). Das Prognoseintervall PI wurde nach Formel 36 berechnet.

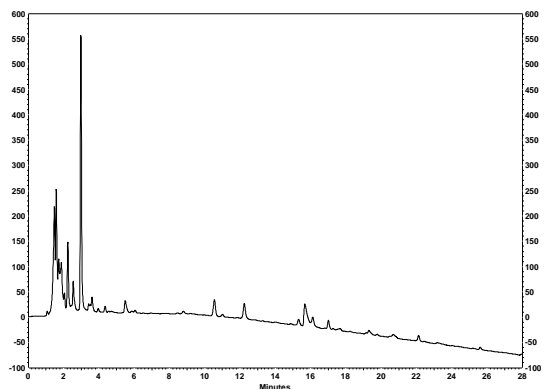
CATR	c [mg/ml]	StabW [mg/ml]	V_K [%]	$\pm PI$
<i>Chinamedica</i>	0,1468	0,0046	3,12	0,0028
<i>Plantasia</i>	0,1355	0,0044	3,22	0,0026
<i>Sinophyto 02310340</i>	0,1144	0,0025	2,20	0,0025
<i>Sinophyto 01270638</i>	0,1173	0,0015	1,29	0,0025
<i>Dr. Mei Wang 20131101</i>	0,0942	0,0037	3,98	0,0025
<i>Arobemed</i>	0,1303	0,0034	2,62	0,0026

Robustheit

Um die Robustheit der Methode zu überprüfen wurde die Säulenofentemperatur je Versuch um 5 °C erhöht oder erniedrigt (40 ±5 °C) und im Anschluss die Ergebnisse miteinander verglichen.

Nach Erhöhung der Temperatur um 5 °C ist keine ausreichende Auflösung des CATR Peaks mehr gewährleistet (Abbildung 76, CATR 15,7 min und folgender Peak 16,1 min). Die Flächen wurden demnach nicht ausgewertet und nicht in die Berechnungen mit einbezogen.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

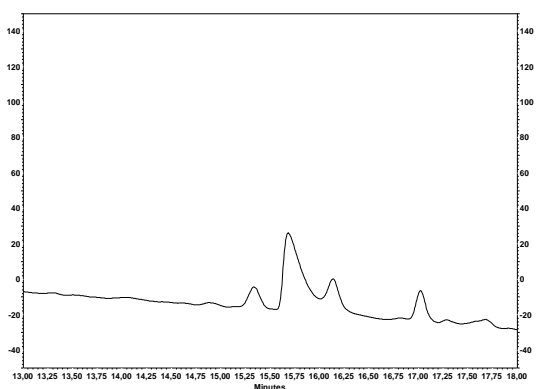


Abbildung 76 HPLC-Chromatogramme (203 nm) eines Xanthii fructus Extraktes aufgearbeitet und chromatographiert nach Methode IX (4.2.1.3) mit erhöhter Säulenofentemperatur (45 °C). **Teilabbildung A:** komplettes Chromatogramm, **Teilabbildung B:** Ausschnitt aus dem Chromatogramm (13,0-18,0 min).

Tabelle 85 Mittelwerte der Konzentration [mg/ml] an CATR vermessen bei zwei verschiedenen Säulenofentemperaturen (je n=6) mit StabW und V_K .

CATR	40 °C	35 °C
c [mg/ml]	0,1460	0,1385
StabW	0,0029	0,0032
V_K	1,96	2,34

Für die statistische Auswertung der Daten (Konzentration [mg/ml] CATR) konnte bei einer Erniedrigung der Säulenofentemperatur um 5 °C ein signifikanter Unterschied ermittelt werden (Daten sind normalverteilt, Varianzen homogen und einfaktorieller ANOVA p -Wert entspricht

0,002). Somit war die Methode weder gegenüber einer Erhöhung noch einer Erniedrigung der Säulenofentemperatur um 5 °C robust. Eine genaue Einhaltung der Säulenofentemperatur ist demnach eine Voraussetzung zur Durchführung der Analyse.

Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden 1,000 g pulverisierte Xanthii fructus (500 µm) 2,0 ml einer Lösung von 0,3383 mg/ml CATR (\cong Zugabe von ca. 20%) und 18,0 ml reines Wasser gemischt und die Extraktion, Chromatographie und Auswertung nach Methode IX dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Parallel dazu wurden drei Proben des gleichen Extraktes ohne Zusatz von CATR vermessen. Die gefundene Menge an Analyt in der zugesetzten Probe wurde in Relation zur enthaltenen Menge in der Probe ohne Zusatz gesetzt und so der Quotient [%] als Wiederfindungsrate berechnet.

Tabelle 86 beinhaltet die Ergebnisse des Versuches Wiederfindung. Mit 91,82% und einem V_K von 1,01 kann der Test auf Wiederfindung akzeptiert werden.

Tabelle 86 Ergebnisse aus dem Versuch Wiederfindung für CATR mit c [mg/ml] und der prozentualen Wiederfindung.

<i>c</i> [mg/ml] CATR (+ 0,3383 mg/ml CATR)	<i>c</i> [mg/ml] CATR (ohne Zusatz, n=3)	Errechnete Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung [%]
0,1696	0,1370	0,1838	92,26
0,1699			92,45
0,1668			90,76
		MW	91,82
		StabW	0,92
		V_K	1,01

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LOD/DL) für CATR wurde nach Formel 38 berechnet und beträgt 5,10 µg/ml.

Quantifizierungsgrenze

Für die Quantifizierungsgrenze (LOQ/QL) von CATR ergibt sich nach Formel 39 ein Wert von 15,44 µg/ml.

4.2.4 Ergebnisse der Gehaltsbestimmung mittels HPLC

In der Monographie von *Xanthii fructus* aus dem ChP 2010 (*Xanthii Fructus*, **2010**) gibt es keine Gehaltsbestimmungsmethode (assay). Erst die Ausgabe ChP 2015 (*Xanthii Fructus*, **2015**) fordert sowohl für die Rohdroge, als auch für die geröstete Droge eine Quantifizierung des Inhaltsstoffes Chlorogensäure. Die Mindestforderung von 0,25% an Chlorogensäure sollte dabei von Roh- und verarbeitetem Material erfüllt werden.

Für die Erarbeitung des Monographievorschlages für das DAB wurden bestehende Methoden zur Chlorogensäurebestimmung aus dem ChP (*Xanthii Fructus*, **2015**) und Ph.Eur. (*Artischockenblätter*, **2017**; *Brennnesselblätter*, **2017**) evaluiert, optimiert und die als geeignet befundene Methode validiert.

4.2.4.1 Methodenevaluierung und Entwicklung

Die Methode zur Quantifizierung von Chlorogensäure aus dem ChP (Methode X, 4.2.1.4) ist eine einfache und verhältnismäßig schnell durchführbare Methode. Das in Abbildung 77 dargestellte Chromatogramm zeigt das Ergebnis der Evaluierung der Methode, der Peak der Chlorogensäure eluiert bei einer Retentionszeit von 13,6 min und ist sauber von anderen Signalen im Chromatogramm separiert. Lediglich die Extraktionszeit (40 min) und das Extraktionsmittel (Methanol 50% mit 5% Ameisensäure) sollten kritisch untersucht und optimiert werden.

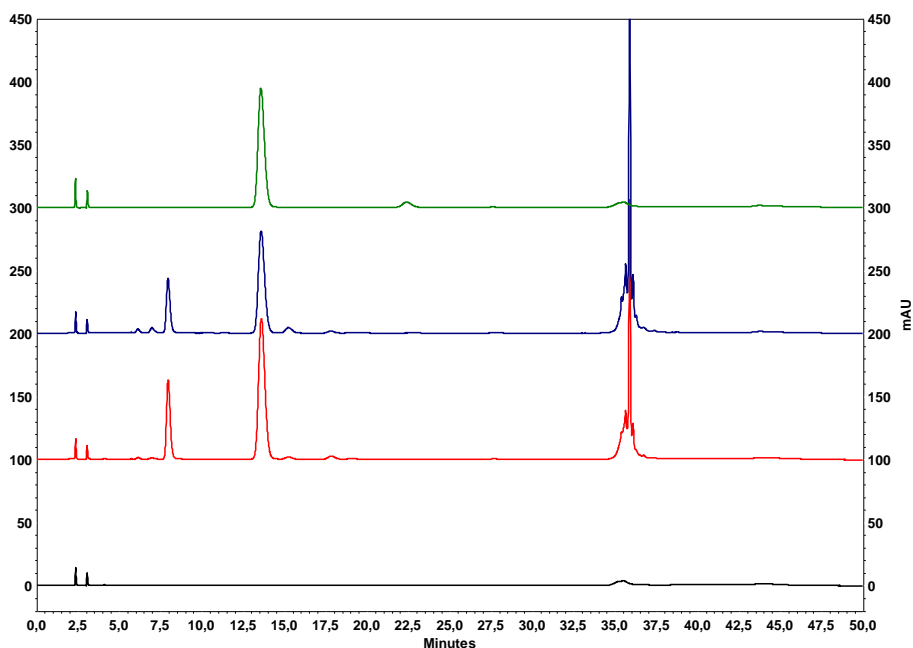


Abbildung 77 HPLC-Chromatogramm (327 nm) von *Xanthii fructus* Extrakten (**Chinamedica**, rot; **Herbasinica 150801H164**, blau) aufgearbeitet und chromatographiert nach Methode X (4.2.1.4), **Chlorogensäure** (0,1 mg/ml; Methanol 70% (V/V), grün) und einem Leerwert (schwarz). Injektionsvolumen je 10 µl, mobile Phase bestehend aus 0,4% (V/V) Phosphorsäure (A) und Acetonitril (B), Gradient/ Elution Tabelle 62 (4.2.1.4), 1,000 ml/min, 25 °C.

Im ersten Schritt wurden die beiden Proben Herbasinica und Chinamedica, je dreimal nach Methode X (4.2.1.4) extrahiert und chromatographiert, wobei die Extraktionszeit um 10, bzw. 20 min gekürzt wurde (Methode XI, 4.2.1.4).

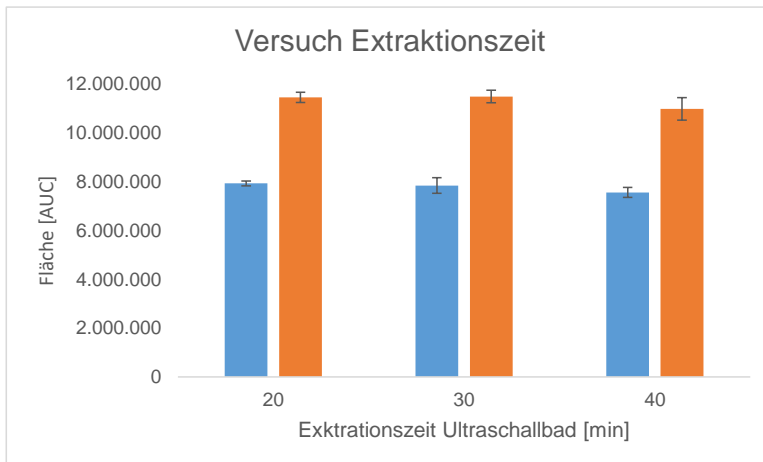


Abbildung 78 Flächen Chlorogensäure [AUC], inklusive der Standardabweichungen [AUC] in den Proben **Herbasinica 150801H164** (blau) und **Chinamedica** (orange) nach 20, 30 und 40 min Extraktionszeit im Ultraschallbad (je n=3).

In Abbildung 78 sind jeweils die Flächen [AUC] von Chlorogensäure in den Proben Chinamedica (Teilabbildung A) und Herbasinica (Teilabbildung B) nach unterschiedlichen Extraktionszeiten dargestellt. Basierend auf diesen Daten ist eine Verkürzung der Extraktionszeit auf 20 bzw. 30 min denkbar.

Da die Prüflösungen einen hohen Anteil an Schwebstoffen aufweisen und der Filtrationsschritt daher sehr zeitaufwendig ist, galt es den Zusatz an Ameisensäure im Extraktionsmittel kritisch zu bewerten.

Im folgenden Versuch wurde dafür eine Probe des Drogenmaterials (Arobemed) erneut nach Methode X (4.2.1.4) mit und ohne Säurezusatz (Methode XII, 4.2.1.4) aufgearbeitet und chromatographiert (je n=3). Der Schwebstoffanteil konnte durch das Weglassen der Ameisensäure wesentlich reduziert werden, und resultiert in einer beschleunigten Filtration. Abbildung 79 zeigt das Chromatogramm der Probe Arobemed extrahiert mit und ohne Säurezusatz. Die Fläche der Chlorogensäure nach Extraktion ohne Ameisensäure beträgt 9434212 [AUC] (n=3, StabW ± 261051 [AUC], $V_K=2,77$) und nach Extraktion mit Ameisensäure 9420308 [AUC] (n=3, StabW ± 231214 [AUC], $V_K=2,45$). Im Fingerprint kommt es zu keinerlei Veränderungen bezüglich der Peakanzahl oder Peakform der Chlorogensäure (R_f 13,7 min). Der Einsatz von Säure im Extraktionsmittel ist somit fraglich und eine Eliminierung sinnvoll.

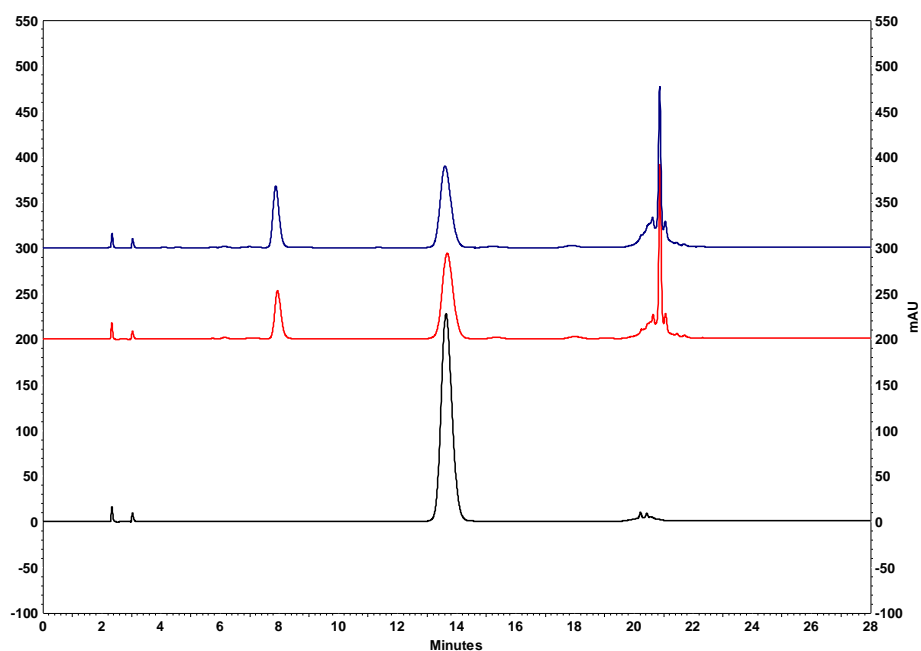


Abbildung 79 HPLC-Chromatogramm (327 nm) von einer Xanthii fructus Probe (**Arobemed mit Säurezusatz**, blau; **Arobemed ohne Säurezusatz**, rot) aufgearbeitet und chromatographiert nach Methode XII (4.2.1.4) mit Chlorogensäure 0,200 mg/ml (Methanol 50% (V/V)). Injektionsvolumen je 10 µl, mobile Phase bestehend aus 0,4% (V/V) Phosphorsäure (A) und Acetonitril (B), Gradient/Elution Tabelle 64 (4.2.1.4), 1,000 ml/min, 25 °C.

Da auch im Ph. Eur Methoden zur Quantifizierung der Chlorogensäure in pflanzlichen Drogenmonographien vorgeschrieben werden, sollten zwei ausgewählte Beispiele evaluiert werden.

Die Methode XIII (4.2.1.4) entspricht den Vorgaben aus der Monographie Brennnesselblätter. Abbildung 80 zeigt das zugehörige Chromatogramm (330 nm). Die Aufarbeitung des Extraktes war relativ einfach. Die veränderte Fließmittelzusammensetzung inkl. des Gradienten ergab jedoch eine späte Elutionszeit des Analyten von ca. 20,9 min.

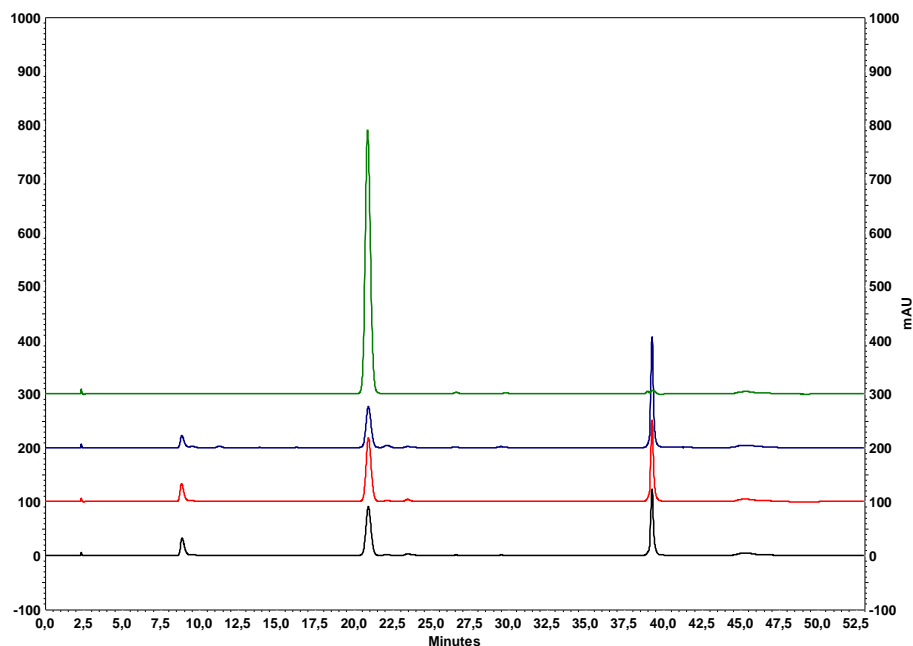
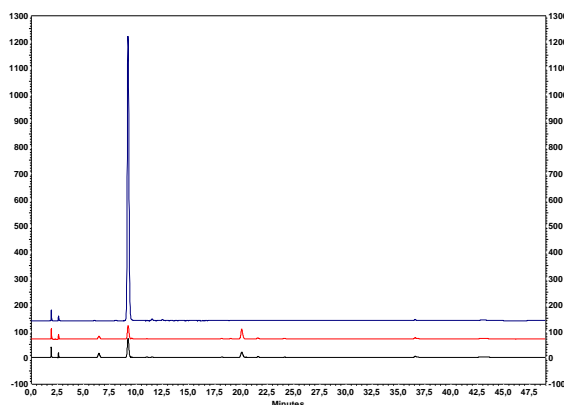


Abbildung 80 HPLC-Chromatogramm (330 nm) dreier Xanthii fructus Extrakte (Arobemed, schwarz; **Chinamedica**, rot und **Herbasinica 150801H164**, blau) aufgearbeitet und chromatographiert mit **Chlorogensäure** 0,200 mg/ml (Methanol 50% (V/V), grün) nach Methode XIII (4.2.1.4). Injektionsvolumen je 20 µl, mobile Phase bestehend aus Methanol/Wasser (15 Volumenteile/85 Volumenteile, pH 2,0 Phosphorsäure 10%) (A) und Methanol (B), Gradient/Elution Tabelle 65 (4.2.1.4), 1,000 ml/min, 25 °C.

Die Methode zur Chlorogensäure-Quantifizierung aus der Monographie Artischockenblätter (Artischockenblätter, **2017**) schreibt mit zweimal 40 min eine sehr zeitintensive Extraktion vor, der Peak für Chlorogensäure eluiert relativ früh bei ca. 9,3 min, jedoch ist die Auflösung nicht zufriedenstellend (Abbildung 81, Teilabbildung B, R_f (Chlorogensäure) 9,3 min).

Teilabbildung A



Teilabbildung B

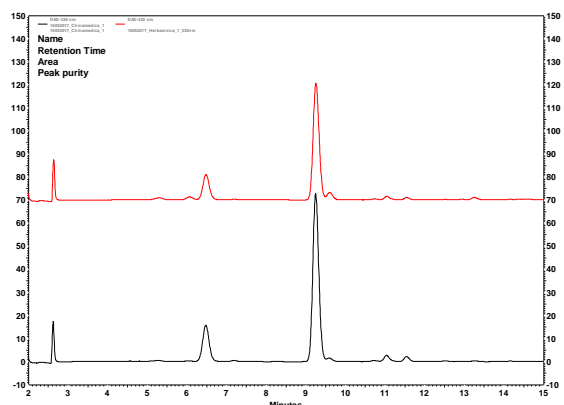
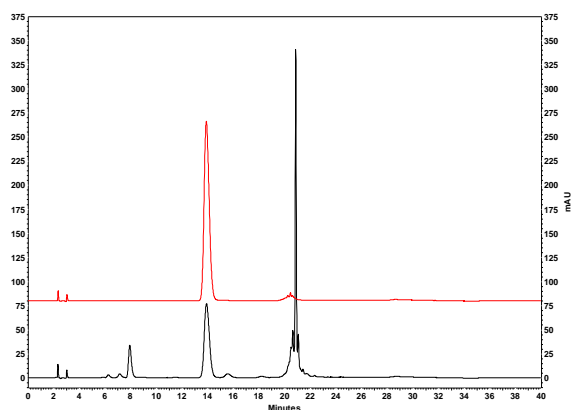


Abbildung 81 HPLC-Chromatogramm (330 nm) von Xanthii fructus Extrakten (**Chinamedica**, schwarz und **Herbasinica 150801H164**, rot) aufgearbeitet und chromatographiert im Vergleich zur **Chlorogensäure** 0,200 mg/ml (Methanol 50% (V/V), blau) nach Methode XIV (4.2.1.4). Injektionsvolumen je 25 µl, mobile Phase bestehend aus Phosphorsäure 85%/Wasser (0,5/99,5 V/V) (A) und Phosphorsäure/Acetonitril (0,5/99,5 V/V) (B), Gradient/Elution Tabelle 66 (4.2.1.4), 1,200 ml/min, 40 °C. **Teilabbildung A**: komplettes Chromatogramm, **Teilabbildung B**: vergrößerter Ausschnitt 2-15 min.

Nach Evaluation diverser Arzneibuch Vorschriften wurde eine modifizierte Methode für die Quantifizierung von Chlorogensäure für den Monographievorschlag von Xanthii fructus für das DAB validiert, die sich der Vorteile der einzelnen Methoden bediente und bei der zudem, das Extraktionsverhältnis (Einwaage Droge/Volumen Extraktionsmittel) und der Gradient mit Zusammensetzung der mobilen Phase aus dem ChP (Xanthii Fructus, **2015**) beibehalten

wurde. Die vorgeschlagene Methode führte zu dem in Abbildung 82 dargestellten Chromatogramm. Die Validierung der Methode wird unter 4.2.4.2 vorgestellt.

Teilabbildung A



Teilabbildung B

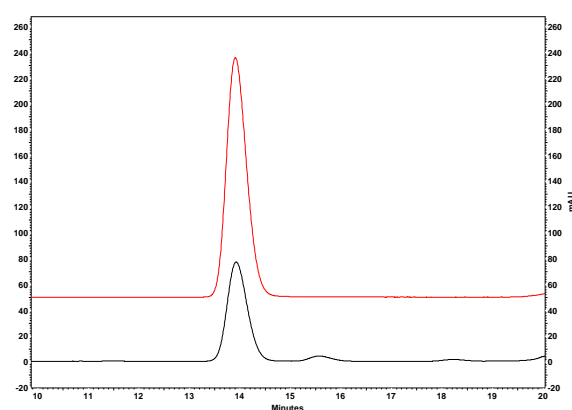


Abbildung 82 HPLC-Chromatogramm (327 nm) eines Xanthii fructus Extraktes (**Herbasinica 150801H164**, schwarz) aufgearbeitet und chromatographiert nach Methode XV (4.2.1.4) im Vergleich zu **Chlorogensäure** (0,145 mg/ml (Methanol 50% (V/V), rot). Injektionsvolumen je 10 μ l, mobile Phase bestehend aus 0,4% (V/V) Phosphorsäure (A) und Acetonitril (B), Gradient/Elution Tabelle 67 (4.2.1.4), 1,000 ml/min, 25 °C. **Teilabbildung A**: komplettes Chromatogramm, **Teilabbildung B**: vergrößerter Ausschnitt 10-20 min.

4.2.4.2 Methodenvalidierung

Die Validierung der unter Kapitel 4.2.4.1 vorgestellten Methode XV (4.2.1.4) soll nach den Vorgaben von 3.2.3.2.2 auf Parameter wie u.a. Stabilität, Robustheit und Wiederfindung durchgeführt werden. Ergebnisse werden in diesem Kapitel vorgestellt.

Stabilität des Analyten in Lösung

Um die Stabilität des Analyten Chlorogensäure in Lösung, bzw. im Extrakt zu untersuchen, wurde der jeweils frisch (n=6) aufgearbeitete Extrakt über etwas mehr als 13 Stunden hinweg zwanzigmal hintereinander injiziert und chromatographisch vermessen. Der Variationskoeffizient (V_K) der Flächen von Chlorogensäure lag dabei durchgängig unter 5% (Tabelle 87), die Stabilität über diesen Zeitraum konnte somit belegt werden.

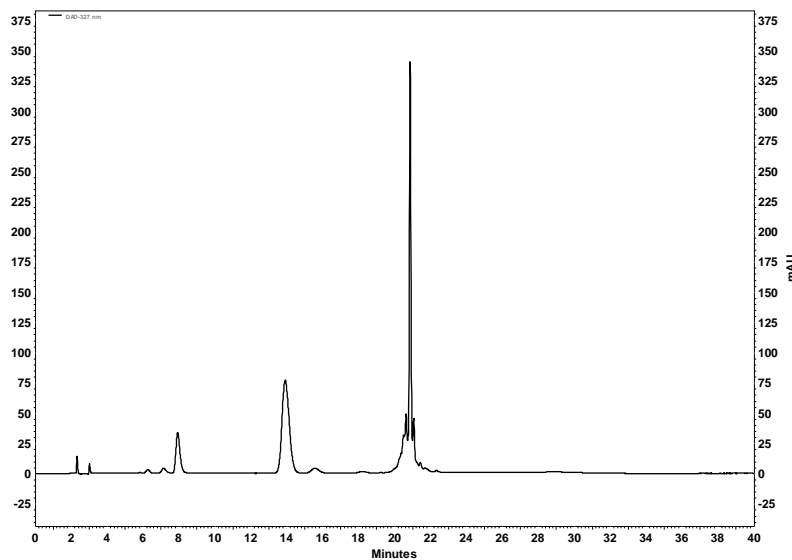
Tabelle 87 Versuch Stabilität des Analyten in Lösung für Chlorogensäure in einem Extrakt von Xanthii fructus (Probe Herbasinica 150801H164) mit Ergebnissen [AUC] aus sechs unabhängigen Messungen mit Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient.

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6
Zeit [min]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]	Fläche [AUC]
0-40	8609351	8400379	8300354	8646735	8538875	8437946
40-80	8686230	8417209	8299927	8657501	8585503	8570209
80-120	8543564	8398093	8283586	8682463	8551385	8548586
120-160	8535835	8380917	8304528	8663945	8580155	8526508
160-200	8556641	8445538	8274355	8684888	8644752	8534962
200-240	8569000	8414972	8303745	8711226	8691232	8544213
240-280	8558245	8437442	8317833	8663695	8621395	8543418
280-320	8567690	8454116	8324472	8728538	8600591	8513671
320-360	8763527	8444418	8292349	8760896	8627726	8548811
360-400	9023551	8442345	8332446	8735494	8562865	8560094
400-440	8781770	8445249	8343393	8637397	8614887	8504887
440-480	8590422	8445122	8320960	8660291	8603273	8764618
480-520	9418350	8451952	8326527	8743740	8573072	8554258
520-560	8641053	8524229	8302000	8698102	8583115	8536833
560-600	8588652	8442697	8291957	8677979	8575252	8548089
600-640	8688995	8415524	8403552	8686273	8605391	8520088
640-680	8583667	8429040	8407792	8654176	8559610	8532630
680-720	8743607	8395523	8417613	8664622	8604830	8581243
720-760	8579791	8421507	8375594	8666457	8570034	8588479
760-800	8648658	8415278	8354904	8671397	8581912	8528789
Mittelwert	8683930	8431078	8328894	8684791	8593793	8549417
StabW	207990	30419	42482	34382	35265	59662
V_K	2,40	0,36	0,51	0,40	0,41	0,70

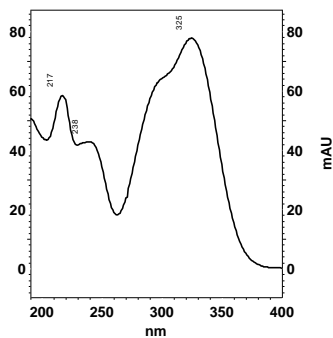
Spezifität

Zur Ermittlung des Parameters Spezifität wurden zum einen die UV-Spektren der Referenzsubstanz (Abbildung 83, Teilabbildung C) mit dem der Extrakte (Abbildung 83, Teilabbildung B) verglichen und zum anderen die Auflösung (R_s) des Chlorogensäure-Signals zu den nächstgelegenen Signalen im Extrakt graphisch und mittels Formel 1 ermittelt. Der Peak des Analyten eluierte im Chromatogramm im Bereich von 13,6-14,0 min. Für die Auflösung ergaben sich, exemplarisch an einem charakteristischen Chromatogramm (Abbildung 83, Teilabbildung A) durchgeführt, die Werte 9,41 (Auflösung des vorherigen Peaks zu dem der Chlorogensäure) und 1,95 (Auflösung des Chlorogensäure-Signals zu dem nächst eluierenden Signal). Die Spezifität konnte demnach akzeptiert werden.

Teilabbildung A



Teilabbildung B



Teilabbildung C

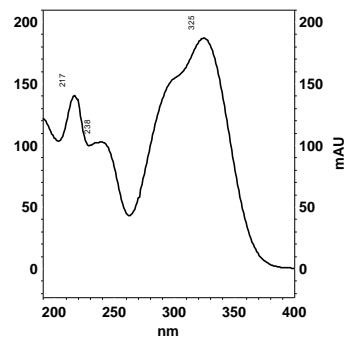


Abbildung 83 Charakteristisches HPLC-Chromatogramm (327 nm) eines Xanthii fructus Extraktes (Probe Herbasinica 150801H164) anhand dessen die Berechnung der Auflösung durchgeführt wurde (**Teilabbildung A**); UV-Spektrum des Chlorogensäure-Signales im Extrakt (**Teilabbildung B**); UV-Spektrum von Chlorogensäure als Referenz vermessen (**Teilabbildung C**).

Kalibrierung

Messbereich (Range)

Um einen Messbereich für die Kalibrierung der Chlorogensäure in den vorhandenen Extrakten festzulegen, wurde zunächst eine Stammlösung des Analyten hergestellt, verdünnt (1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 und 1:100) und zusammen mit acht frisch extrahierten Drogenextrakten chromatographiert (Signale Tabelle 88 und Tabelle 89).

Tabelle 88 Konzentrationen [mg/ml] und Signalwerte [AUC] der Chlorogensäure zur Festlegung des Kalibrierbereiches.

	Stammlösung	1:2	1:5	1:10	1:25	1:50	1 : 100
<i>c</i> [mg/ml]	0,3910	0,1955	0,0782	0,0391	0,0156	0,0078	0,0039
Signal [AUC]	46152123	23473465	9650150	4819151	1883177	913051	434379

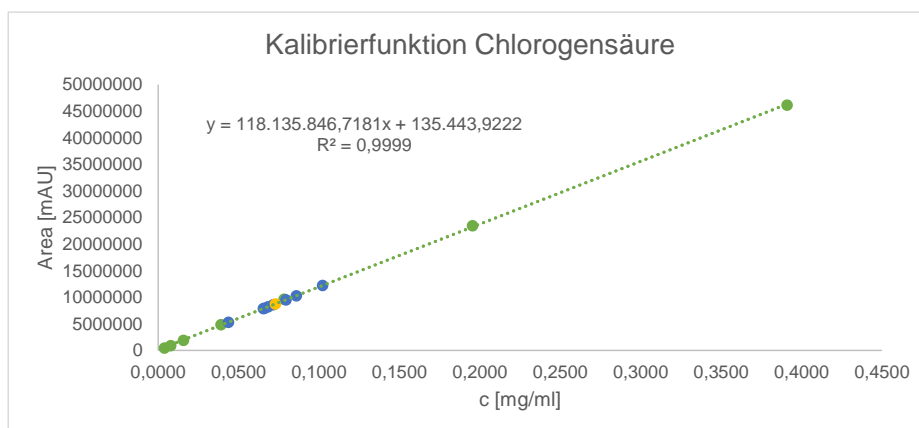


Abbildung 84 Kalibriergerade von Chlorogensäure erstellt aus den Messwerten Tabelle 88. In grün dargestellt die Kalibrierpunkte, blau zeigen die Messwerte für die Extrakte der verschiedenen Herkünfte und in gelb dargestellt der Mittelwert der Proben.

Tabelle 89 Signal [AUC] und errechnete Konzentration *c* [mg/ml] an Chlorogensäure in den verschiedenen Drogenextrakten errechnet nach Kalibrierfunktion aus Abbildung 84.

Probe	Signal [AUC] Chlorogensäure	<i>c</i> [mg/ml] Chlorogensäure
<i>Chinamedica</i>	12207914	0,1022
<i>Plantasia</i>	10287559	0,0859
<i>Sinophyto 02310340</i>	8189263	0,0682
<i>Sinophyto 01270638</i>	7935532	0,0660
<i>Herbasinica 150801H164</i>	8589857	0,0716
<i>Dr. Mei Wang 130401</i>	7859165	0,0654
<i>Dr. Mei Wang 20131101</i>	5296949	0,0437
<i>Dr. Mei Wang 140528</i>	9519116	0,0794

Ausgehend von der rechnerischen Mitte der vermessenen Proben (gelb markiert in Abbildung 84) wurde ein entsprechender Kalibrierbereich festgelegt und die einzelnen Kalibrierlösungen möglichst äquidistant über diesen Bereich verteilt (Tabelle 90).

Kapitel 4

Tabelle 90 Festgelegte Konzentrationen [mg/ml] für die Kalibrierfunktion von Chlorogensäure.

Chlorogensäure	<i>Level 1</i>	<i>Level 2</i>	<i>Level 3</i>	<i>Level 4</i>	<i>Level 5</i>	<i>Level 6</i>
c [mg/ml]	0,0148	0,0297	0,0594	0,0891	0,1188	0,1485

Kalibrierfunktion

Um die Kalibrierlösungen herzustellen, wurden aus zwei frisch hergestellten Stammlösungen in drei unabhängigen Verdünnungsreihen je drei Kalibriergeraden hergestellt und nach Methode XV (4.2.1.4) vermessen. Somit konnte jeder Messpunkt in sechsfacher Ausführung (in Duplikaten) vermessen werden.

Tabelle 91 Gemessene Flächen [AUC] für die unterschiedlichen Kalibrierlösungen von Chlorogensäure.

Chlorogensäure		<i>Level 6</i>	<i>Level 5</i>	<i>Level 4</i>	<i>Level 3</i>	<i>Level 2</i>	<i>Level 1</i>
<i>Messung</i>	<i>c</i> [mg/ml]	0,1485	0,1188	0,0891	0,0594	0,0297	0,0148
1	<i>Fläche</i> [AUC]	19149291	15222489	11406243	7732446	3871026	1947529
2	<i>Fläche</i> [AUC]	19899355	15135603	11515384	7559068	3894683	1905985
3	<i>Fläche</i> [AUC]	19338690	15475074	11443764	7764333	3745149	1920267
4	<i>Fläche</i> [AUC]	18682476	14863639	11287777	7386344	3781827	1820497
5	<i>Fläche</i> [AUC]	18623844	14376995	11074599	7504660	3617750	1866286
6	<i>Fläche</i> [AUC]	18869663	14657738	11196592	7354964	3783618	1841839
MW	<i>Fläche</i> [AUC]	19093886	14955256	11320726	7550299	3782342	1883734
StabW	<i>Fläche</i> [AUC]	480053	401359	165781	170984	98955	48904
V_k	[%]	2,51	2,68	1,46	2,26	2,62	2,60

a) Lineare Regression

Die Kalibriergerade wurde durch Auftragung der Mittelwerte der Flächenmessungen (Tabelle 91) gegen die eingesetzten Konzentrationen erstellt (Abbildung 85). Zudem wurde die lineare Regression ebenfalls rechnerisch mit Hilfe der Formeln aus Kapitel 3.2.3.2.2.2 (Kalibrierung, Kalibrierfunktion, a) lineare Regression) ermittelt.

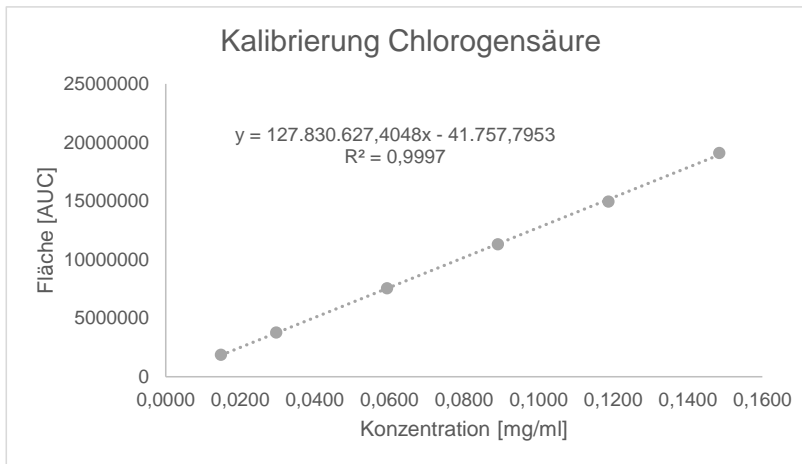


Abbildung 85 Lineare Kalibrierfunktion des Analyten Chlorogensäure.

Die Reststandardabweichung s_y ergab einen Wert von 123879,88 die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} 0,0010. Somit betrug die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} 1,26%. Zur Berechnung wurden die Formeln 8-10 aus Kapitel 3.2.3.2.2.2 verwendet.

b) Quadratische Regression

Aus den gemessenen Flächen [AUC] aus Tabelle 91 wurde graphisch eine quadratische Regression erstellt. Unter zu Hilfenahme der Formeln aus 3.2.3.2.2.2 (Kalibrierung, Kalibrierfunktion, b) quadratische Regression) konnte diese zudem rechnerisch überprüft werden.

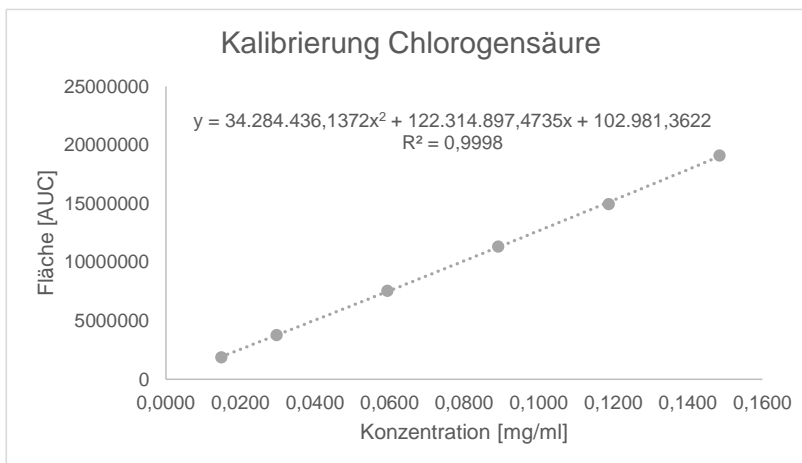


Abbildung 86 Quadratische Regression des Analyten Chlorogensäure.

Für die Parameter Reststandardabweichung s_y der quadratischen Regression ergab sich ein Wert von 114809,92, die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} betrug 0,0009 und die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} 1,17%.

Da sich aus den Berechnungen zur (relativen) Verfahrensstandardabweichung für die quadratische Regression ein kleinerer Wert als für die der linearen ergab, musste ein Anpassungstest nach Mandel durchgeführt werden (Formeln 23-27; Kapitel 3.2.3.2.2.2). Δs_y^2

lieferte einen Wert von 21840951499 und die Prüfgröße betrug 1,66 (Formel 24). Da der tabellierte Wert aus der F-Tabelle mit 34,12 ($f_1=1$, $f_2=3$; $p=99\%$) größer ist als die berechnete Prüfgröße, konnte die Nullhypothese angenommen werden. Der Unterschied der beiden relativen Verfahrensstandardabweichungen ist nicht signifikant und eine lineare Regressionsgerade für Chlorogensäure kann verwendet werden.

Wiederholpräzision

Zur Untersuchung der Wiederholpräzision, wurde eine Probe authentischen Drogenmaterials sechsmal an einem Tag unabhängig voneinander extrahiert und chromatographiert. Die ermittelten Flächen [AUC] mit errechneten Konzentrationen [mg/ml] und Gehalt [%] sind in Tabelle 92 dargestellt.

Tabelle 92 Ergebnisse mit Fläche [AUC], c [mg/ml] und Gehalt [%] aus dem Versuch Wiederholpräzision.

Chlorogensäure	Fläche [AUC]	c [mg/ml]	Gehalt [%]
<i>Herbasinica 1</i>	8647790	0,0680	0,3399
<i>Herbasinica 2</i>	8579400	0,0674	0,3372
<i>Herbasinica 3</i>	8408794	0,0661	0,3305
<i>Herbasinica 4</i>	8300140	0,0653	0,3263
<i>Herbasinica 5</i>	8652118	0,0680	0,3401
<i>Herbasinica 6</i>	8504078	0,0669	0,3343
Mittelwert	8515387	0,0669	0,3347
StabW	140103	0,0011	0,0055
V_k	1,65	1,64	1,64

Da die Ergebnisse aus dem Versuch Wiederholpräzision keine größeren Abweichungen (V_k) als 5% zeigten, wurde der Test akzeptiert.

Laborpräzision

Im Rahmen der Untersuchung des Validierungsparameters Laborpräzision wurde eine Probe chinesischer Importware an sechs verschiedenen Tagen unabhängig voneinander extrahiert, chromatographiert und deren Konzentrationen [mg/ml] bzw. Gehalte [%] verglichen.

Tabelle 93 Ergebnisse aus dem Versuch Laborpräzision mit der Fläche [AUC], der Konzentration [mg/ml] und dem Gehalt [%] aus den unterschiedlichen Versuchstagen (n=6).

Chlorogensäure	Fläche [AUC]	c [mg/ml]	Gehalt [%]
<i>Herbasinica 1</i>	8579892	0,0674	0,3372
<i>Herbasinica 2</i>	8632033	0,0679	0,3393
<i>Herbasinica 3</i>	8593376	0,0676	0,3378
<i>Herbasinica 4</i>	8569828	0,0674	0,3368
<i>Herbasinica 5</i>	8394752	0,0660	0,3300
<i>Herbasinica 6</i>	8134781	0,0640	0,3198
Mittelwert	8484110	0,0667	0,3335
StabW	189925	0,0015	0,0074
V_K	2,24	2,23	2,23

Die in Tabelle 93 dargestellten Ergebnisse zeigten keine Abweichungen (V_K), größer als 5%. Der Test auf Laborpräzision konnte somit akzeptiert werden.

Probenauswertung und Prognoseintervall

Alle Proben wurden unabhängig voneinander extrahiert, chromatographiert und deren Ergebnisse anhand der Konzentrationen [mg/ml] miteinander verglichen. Um den statistischen Fehler abzuschätzen, wurde mit Hilfe des Vertrauensbereiches (VB; Formeln 34 und 35) das Prognoseintervall berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 94 dargestellt.

Tabelle 94 Ergebnisse aus dem Versuch Probenauswertung (n=6 für alle Proben ausgenommen Dr. Mei Wang Proben, aufgrund geringer Drogenmengen n=3) und Prognoseintervall für Chlorogensäure in verschiedenen Xanthii fructus Extrakten mit Konzentration [mg/ml], Standardabweichung [mg/ml], Variationskoeffizient V_K [%] und dem errechneten Prognoseintervall.

Chlorogensäure	c [mg/ml]	StabW [mg/ml]	V_K [%]	±PI
<i>Chinamedica</i>	0,0914	0,0013	1,46	0,0016
<i>Plantasia</i>	0,0844	0,0011	1,35	0,0016
<i>Sinophyto 02310340</i>	0,0641	0,0010	1,52	0,0016
<i>Sinophyto 01270638</i>	0,0627	0,0015	2,39	0,0016
<i>Herbasinica 150801H164</i>	0,0661	0,0026	3,92	0,0016
<i>Dr. Mei Wang 20131101</i>	0,0431	0,0011	2,6	0,0017
<i>Dr. Mei Wang 140528</i>	0,0736	0,0005	0,71	0,0016
<i>Dr. Mei Wang 130401</i>	0,0634	0,0010	1,62	0,0016
<i>Arobemed</i>	0,0748	0,0005	0,65	0,0016

Robustheit

Die Robustheit der Methode wurde durch die Überprüfung von zwei Parametern untersucht. Zum einen der Parameter Säulenofentemperatur ($25 \pm 5 \text{ °C}$) der HPLC und zum anderen die Temperatur im Ultraschallbad während der Extraktion, die jeweils um 4 °C erhöht oder erniedrigt wurde.

Beginnend mit der Säulenofentemperatur, wurden die in Tabelle 95 dargestellten Ergebnisse ermittelt.

Tabelle 95 Mittelwerte der Konzentration [mg/ml] an Chlorogensäure vermessen bei drei verschiedenen Säulenofentemperaturen (30, 25 und 20 °C; je n=6) und deren Mittelwert und Variationskoeffizient.

Chlorogensäure	30 °C	25 °C	20 °C	MW	V _K
c [mg/ml]	0,0670	0,0669	0,0677	0,0672	0,67
StabW	0,0005	0,0009	0,0007		
V _K	0,73	1,33	0,96		

Die Abweichungen (V_K) aus den errechneten Konzentrationen [mg/ml] ergaben Werte, die kleiner als 5% sind. Zudem ergab die statistische Auswertung der Daten mittels einfaktorieller ANOVA (Daten normalverteilt, Varianzen homogen) keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die ermittelten Konzentrationen. Die Robustheit der Methode in Bezug auf die Säulenofentemperatur $25 \pm 5 \text{ °C}$ ist somit gegeben.

Als weiterer Parameter sollte die Robustheit der Extraktionstemperatur im Ultraschallbad experimentell überprüft werden. Dafür wurde eine Probe authentischen Drogenmaterials je sechsmal unter Standardbedingungen (Ultraschallbadtemperatur 40 °C), bei erhöhter Temperatur (44 °C) und bei erniedrigter Temperatur (36 °C) extrahiert und chromatographiert.

Tabelle 96 Mittelwerte der Konzentration [mg/ml] an Chlorogensäure vermessen bei drei verschiedenen Temperaturen des Ultraschallbades während der Extraktion (36 °C, 40 °C und 44 °C; je n=6) und deren Mittelwert und Variationskoeffizient.

Chlorogensäure	36 °C	40 °C	44 °C	MW	V _K
c [mg/ml]	0,0662	0,0667	0,0673	0,0667	0,80
StabW	0,0005	0,0015	0,0004		
V _K	0,77	2,23	0,61		

Tabelle 96 zeigt die Ergebnisse der Robustheitsuntersuchung. Auch hier lagen die V_Ks der errechneten Konzentrationen [mg/ml] an Chlorogensäure unter 5%. Die statistische Auswertung (Daten nur teilweise normalverteilt, Varianzen inhomogen, daher Kruskal-Wallis-Test $p=0,090$) ergab keine signifikanten Unterschiede, die Robustheit der Methode in Bezug auf den Parameter Temperatur des Ultraschallbades $\pm 4 \text{ °C}$ wurde somit bewiesen.

Wiederfindungsrate

Zur experimentellen Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde der Einwaage an pulverisierter Droge zusätzlich eine definierte Menge an Chlorogensäure (1,0 ml 0,1604 mg/ml; 2,0 ml 0,1604 mg/ml) zugesetzt und die Extraktion und Chromatographie nach den Vorschriften der Methode XV (4.2.1.4) durchgeführt. Im Anschluss wurde die gefundene Menge an Analyt in prozentualer Relation zur theoretisch enthaltenen Menge an Chlorogensäure gesetzt und so die Wiederfindung in [%] errechnet. Der in Tabelle 97 vorgestellte Versuch entspricht einer ca. 10%igen Zugabe an Chlorogensäure und ergibt eine mittlere Wiederfindung von 98,63%. Die Ergebnisse einer ca. 20%igen Zugabe an Analyt sind in Tabelle 98 dargestellt. Die Wiederfindungsrate entsprach durchschnittlich 99,43%.

Tabelle 97 Ergebnisse aus dem Versuch Wiederfindung nach Zugabe von 1,0 ml einer Lösung von Chlorogensäure (0,1604 mg/ml, n=6) zur Drogeneinwaage.

<i>c</i> [mg/ml] Chlorogensäure (+ 1,0 ml 0,1604 mg/ml Chlorogensäure)	<i>c</i> [mg/ml] Chlorogensäure (ohne Zusatz, n=6)	Errechnete Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung [%]
0,0739	0,0667	0,0731	101,04
0,0709			96,93
0,0726			99,36
0,0700			95,81
0,0731			100,04
0,0721			98,59
		MW	98,63
		StabW	1,96
		V _K	1,99

Tabelle 98 Ergebnisse aus dem Versuch Wiederfindung nach Zugabe von 2,0 ml einer Lösung von Chlorogensäure (0,1604 mg/ml, n=6) zur Drogeneinwaage.

<i>c</i> [mg/ml] Chlorogensäure (+ 2,0 ml 0,1604 mg/ml Chlorogensäure)	<i>c</i> [mg/ml] Chlorogensäure (ohne Zusatz, n=6)	Errechnete Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung [%]
0,0781	0,0667	0,0795	98,21
0,0782			98,35
0,0791			99,41
0,0834			104,87
0,0781			98,16
0,0776			97,69
		MW	99,43
		StabW	2,73
		V _K	2,74

Die Ergebnisse aus dem Versuch Wiederfindung lagen zwischen 90-110% und konnten somit akzeptiert werden.

Nachweisgrenze

Die Berechnung mit Hilfe von Formel 38 liefert für die Nachweisgrenze von Chlorogensäure den Wert 3,20 µg/ml.

Quantifizierungsgrenze

Die Quantifizierungsgrenze für Chlorogensäure berechnet nach Formel 39 liegt bei 9,69 µg/ml.

4.2.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analytik zu Xanthii fructus

Bei der Monographie von Xanthii fructus handelt es sich um die Rohdroge bestehend aus den getrockneten Früchten inklusive deren Involukren von *Xanthium sibiricum* PATR. (Asteraceae). Die reifen Früchte werden im Herbst geerntet, getrocknet und von fremden Bestandteilen befreit. Nach Vorbehandlung wird die Droge entweder als *Cang'erzi* oder *Chaocang'erzi* bezeichnet. *Cang'erzi* steht dabei für die von Verunreinigungen befreite Rohdroge, wohingegen bei dem Begriff *Chaocang'erzi* die durch eine aufwendige Methode vorbehandelte Droge bezeichnet wird. Die gereinigte Droge wird dabei nach der *qingchao*-Methode solange geröstet, bis die Früchte eine gelbbraune Farbe angenommen haben, dann werden die Stacheln abgebrochen und entfernt. (Xanthii Fructus, **2015**; Pharmazeutische Verarbeitungshinweise, **2005, 2010 und 2015**; Xanthii fructus, **2005, 2010 und 2015**). Es wird generell empfohlen die Droge vor Gebrauch zu braten/rösten, um deren Toxizität zu minimieren (Xanthii Fructus, **2004**; Chen and Chen, **2012**; Su et al., **2016**). Beim Großteil der Importware, die als *Chaocang'erzi* oder als geröstet deklariert war, waren die abgebrochenen Stacheln und die tief gelbbraune Farbe vorhanden (Probe Sinophyto, Plantasia, Chinamedica und Dr. Mei Wang). Bei den Probenmustern der Firma Phytax, Arobemed, Yong und Herbasinica waren die Stacheln größtenteils abgebrochen, jedoch die dunklere Farbe durch Röstung nicht/kaum wahrnehmbar. Bei der Beurteilung der Drogenmuster, ob geröstet oder ungeröstet, wurde jedoch den Angaben nach Rückfragen des Herstellers/Importeurs vertraut und diese dokumentiert. Da die Analytik nach der bestehenden Monographie ChP 2015 (Xanthii Fructus, **2015**) zu beiden Ausführungen zudem weitestgehend ähnlich ist, wurde für die analytischen Untersuchungen sowohl ungeröstetes, als auch geröstetes Drogenmaterial verwendet.

Die mikroskopischen Untersuchungen lieferten homogene Ergebnisse. Neben Fasern der Fruchthülle, des Perikarps, Gefäß-/bzw. Gefäßfragmenten und Keimblattzellen waren unter anderem typischerweise Öltropfen und Aleuronkörper zu beobachten.

Um eine Methode zur Identifizierung des pflanzlichen Drogenmaterials per DC/HPTLC für das DAB vorschlagen zu können, wurden zunächst vorhandene Vorschriften evaluiert. Eine lange Entwicklungsdauer, ein zweiphasiges Fließmittel und die Auswertung der Platte nach Entwicklung im Ammoniakdampf im Vergleich zu Referenzdrogenmaterial sind die Nachteile der Methode aus dem ChP (Xanthii Fructus, **2015**). Die Methode aus dem HKCMMS ist im Aufwand der Aufarbeitung ähnlich, die Auswertung erfolgt mit Hilfe der beiden Substanzen Chlorogensäure und 1,5-Dicaffeoylchinasäure, jedoch handelt es sich ebenfalls um ein zweiphasiges Fließmittel (Xanthii fructus, **2012**). Unter Beseitigung der dargestellten Nachteile wurde eine neue Methode entwickelt, die eine zeitsparende und einfache Aufarbeitung, eine

Entwicklung in einem etablierten Fließmittel und einer Auswertung der Platte ohne Derivatisierung umfasst. Die Validierung der HPTLC-Methode lieferte präzise, spezifische und robuste Ergebnisse. Die Stabilität der Ergebnisse und die Stabilität der Analyten in Lösung bzw. auf der Platte konnte nachgewiesen werden. Als problematisch erwiesen sich Diskrepanzen in der Intensität mancher Banden, die sich wahrscheinlich aufgrund der unterschiedlichen Belichtung ergaben, während das Bild der Platte aufgenommen wurde (366 nm). Aus diesem Grund sind dem DAB Monographievorschlag auch exemplarisch zwei Aufnahmen der HPTLC-Platten beigefügt. Die Abweichung bei dem Test auf Stabilität während der Chromatographie wurde vernachlässigt und die Validierung akzeptiert, da es sich um eine qualitative und nicht quantitative Auswertung handelt, und ein bereits etabliertes Fließmittel-/Referenzsubstanz-System verwendet wird

Die Reinheitsuntersuchung Asche wird vom ChP (Xanthii Fructus, **2015**) sowohl für die Rohdroge, als auch für die gerösteten Früchte auf einen Maximalwert von 5,0% festgelegt. Die durchgeführten Experimente (4.2.3.2) zeigten ohne größere Abweichungen einen Aschewert zwischen 3,0%- 3,2% (m/m). Damit konnte der vorgegebene Wert von maximal 5,0% für den Monographievorschlag im DAB übernommen werden. Beim Trocknungsverlust unterscheidet das ChP zwischen einem Maximalwert von 12,0% für die Rohdroge und 10,0% für die „prepared slices“. Die unter 4.2.3.1 vorgestellten Ergebnisse der Bestimmung des Trocknungsverlustes lagen zwischen 7,03-8,98% (m/m). Für den Monographievorschlag für die geröstete Droge im DAB konnte somit der Wert von 10,0% (m/m) übernommen werden.

Zusätzlich zu den Reinheitsuntersuchungen Asche und Trocknungsverlust fordert das ChP 2015 in der Monographie von Xanthii fructus die Quantifizierung von CATR (Rohdroge) und ATR (geröstetes Drogenmaterial). Da die Erarbeitung eines Monographievorschlages für das geröstete Pflanzenmaterial im Fokus stand und beide Diterpene, sowohl CATR als auch ATR toxikologisch relevant sind (Luciani et al., **1971**; Wang et al., **2011**; Xue et al., **2014**), wurde versucht eine Methode zu etablieren mit der beide Analyten innerhalb eines HPLC-Laufes zu detektieren und quantifizieren waren. Ausgehend von der HPLC-DAD-Methode des ChP 2015 (Xanthii Fructus, **2015**) wurde unter Verwendung verschiedener stationärer und mobiler Phasen, in Anlehnung an die Literatur (Nikles, **2012**; Steenkamp et al., **2006**) eine Methode entwickelt (Methode IX, 4.2.1.3), mittels der es gelang CATR und ATR in einem Lauf per HPLC-DAD (203 nm) zu detektieren und quantifizieren. Beide Analyten eluierten innerhalb einer akzeptablen Retentionszeit (CATR ca. 16,0 min, ATR ca. 26 min) und zeigten eine zufriedenstellende Auflösung. Die anschließende Validierung erfolgte ausschließlich für CATR, da für ATR der notwendige Primärstandard kommerziell nicht in der geforderten Qualität erwerbbar war. Die Parameter Stabilität und Präzision zeigten zufriedenstellende Ergebnisse, deren Abweichungen (V_k) unter 5,0% lagen. Die Robustheit der Methode wurde exemplarisch anhand der Temperatur des Säulenofens untersucht und konnte belegen, dass

sowohl eine Erhöhung, als auch eine Erniedrigung der Temperatur ($40^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$) zu Veränderungen in den Analyseergebnissen führten, die über ein vertretbares Maß hinausgingen. Auf eine genaue Einhaltung der Säulenofentemperatur während der Chromatographie sollte demnach geachtet werden.

Die Wiederfindungsrate mit 91,82% (V_K 1,01) von CATR lag im unteren akzeptierbaren Bereich und könnte auf das fehlende Chromophor und somit eine geringere Ansprechbarkeit des DADs auf den Analyten zurückgeführt werden. Da es sich bei Arzneibuchmethoden größtenteils um Konventional-/Konventionsmethoden handelt und dabei nicht der genaue Wert/Gehalt ermittelt wird, sondern ein, unter jeweils gleichen Versuchsbedingungen, identisch ermittelter und somit vergleichbarer Gehalt an einer Substanz (Acker et al., **1967**; Matissek et al., **1992**) bestimmt wird, konnte auch dieser Parameter im Rahmen der Validierung akzeptiert werden. Die Konzentrationsbestimmungen an CATR im Drogenmaterials führten zu Ergebnissen zwischen 0,0942-0,1468 mg/ml in den untersuchten Extrakten, was einem Gehalt von 0,19-0,29% an CATR, bestimmt als Dikaliumsalz (847 g/mol) entspricht. Das ChP 2015 limitiert den Gehalt an CATR auf 0,35%, jedoch berechnet als Reinsubstanz bzw. freie Säure ($\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_{18}\text{S}_2$, 770 g/mol) was umgerechnet ca. 0,39% des Dikaliumsalzes entspricht. Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit des zweiten Diterpens ATR wurde für den Monographievorschlag von Xanthii fructus für das DAB die neu entwickelte Gehaltsbestimmungsmethode der beiden Diterpene noch nicht aufgenommen (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, **2007**). Bei Verfügbarkeit von ATR ist jedoch, nach Beendigung der Validierung und der Beurteilung der Ergebnisse, eine Aufnahme der Methode sinnvoll.

Für die Gehaltsbestimmung von Xanthii fructus, mittels HPLC-DAD ist, sowohl für das Rohmaterial, als auch für die bearbeitete Droge ein Minimalgehalt von 0,25% an Chlorogensäure vorgeschrieben (Xanthii Fructus, **2015**). Die vom ChP vorgeschlagene Methode wurde im Rahmen der analytischen Untersuchungen evaluiert, das Extraktionsmittel und die Extraktionszeit optimiert und nach Vergleich mit Ph.Eur. Methoden (Artischockenblätter, **2017**; Brennnesselblätter, **2017**) validiert. Der Analyt Chlorogensäure eluierte bei einer Gesamtanalysenzeit von 40 min (inkl. Spülschritt und Equilibrierung) mit einer Retentionszeit von 13,6-14,0 min (Methode XV, 4.2.1.4). Der Extrakt erwies sich in einem Zeitraum von über 13 Stunden als stabil. Weiterhin führten die Untersuchungen zu spezifischen, präzisen und durchweg robusten Ergebnissen (Säulenofentemperatur $25 \pm 5^{\circ} \text{C}$, Ultraschallbadtemperatur $40 \pm 4^{\circ} \text{C}$). Die Wiederfindungsrate lag im Experiment durchgeführt durch Aufstockung von ca. 10% bei 98,63% (V_K 1,99) und durch Aufstockung von ca. 20% an Chlorogensäure bei 99,43% (V_K 2,74). Nach Extraktion und Chromatographie aller vorhandenen Proben, lagen die ermittelten Gehalte an Chlorogensäure ($n=6$) zwischen 0,31-0,46%, was den Forderungen des ChPs entspricht. Diese optimierte Methode wurde im

Rahmen der DAB Monographie für eine Chlorogensäure-Quantifizierung vorgeschlagen.
Unter Kapitel 7.2 ist der DAB Monographievorschlag zu *Xanthii fructus* dargestellt.

4.3 Isolierung von Atractylosid

4.3.1 Einleitung und Isolierungsstrategie

Wie bereits unter Kapitel 2 erwähnt, sollte im Fokus der Arbeit u.a. die quantitative und qualitative Evaluierung von u. a. Xanthii fructus stehen, mit dem Ziel einen Monographievorschlag für das DAB zu erarbeiten. Für die Erstellung von Qualitätsmonographien, sind Identitäts-, Reinheits- und Gehaltsprüfungen zu entwickeln. Hierfür muss das Vorhandensein von relevanten Marker-/bzw. Referenzsubstanzen belegt werden. Im Falle der Sibirischen Spitzklettenfrucht sind analog des ChP 2015, die beiden Diterpene CATR und ATR (Abbildung 87), als Substanzen zur Bestimmung der Reinheit erforderlich (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2015**). CATR war über zwei Unternehmen (Phytolab®, Sigma-Aldrich®) zu erwerben, im Gegensatz zu ATR, welches nicht (auch in China nicht) zu beziehen ist. Aufgrund dieser Tatsache, sollte eine Isolierung dieses Markers aus Drogenmaterial von Xanthii fructus vorgenommen werden. In Anlehnung an die Literatur (Nikles et al., **2014**) und TLC/MS Vorversuchen bezüglich Lage, Färbung und Identität der ATR-Bande im Fingerprint des Extraktes wurde zur präparativen Aufarbeitung Drogenmaterial der Firma Herbasinica gewählt. Mit Hilfe einer DC-kontrollierten Strategie sollte ATR isoliert werden.

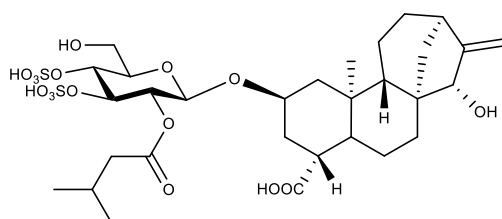


Abbildung 87 Strukturformel des zu isolierenden Diterpens Atractylosid (ATR, C₃₀H₄₆O₁₆S₂).

4.3.2 Material und Methoden

4.3.2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und verwendetes Drogenmaterial

Tabelle 99 Für die Isolierung von ATR verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Acetonitril	Acetonitril für die Flüssigchromatographie (HPLC grade)	Merck Chemicals, Darmstadt (Deutschland)
Anisaldehyd	<i>p</i> -Anisaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
DC Kieselplatten	TLC, Silica Gel 60 F ₂₅₄ 20x20 cm	Merck, Darmstadt (Deutschland)

DMSO, deuteriert	DMSO- <i>d</i> ₆ 99,8%	Deutero, Kastellaun (Deutschland)
Einmal-Kapillarpipetten mit Ringmarke	Ringcaps 1-5 µl, 10 µl	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (Deutschland)
Einmalspritzen	Norm-Ject® Einmalspritzen, 1 ml	Henke Sass Wolf, Tuttlingen (Deutschland)
Essigsäure/Eisessig	p.a., ≥99,8%	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Ethanol	Ethanol (p.a.) absolute ≥99,8%	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Ethylacetat	Reag. Ph.Eur.	VWR, Darmstadt (Deutschland)
Hexan	<i>n</i> -Hexan p.a. (<0,0100% Wasser)	VWR, Darmstadt (Deutschland)
HPTLC Kieselgelplatten	HPTLC, Silica Gel 60 F ₂₅₄ 20x10 cm, 10x10 cm	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Kanülen	Sterican Standardkanülen, diverse Größen	B. Braun, Melsungen (Deutschland)
Methanol	Methanol für die Flüssigchromatographie (HPLC grade)	Merck Chemicals, Darmstadt (Deutschland)
Methanol	Methanol p.a. (Reag. Ph.Eur.)	VWR, Darmstadt (Deutschland)
<i>n</i>-Butanol	p.a., ≥99,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄ , p.a., 95-97%	Merck Chemicals, Darmstadt (Deutschland)
Sephadex LH 20 Material	Sephadex™ LH-20 17-0090-01	GE Healthcare, Uppsala (Schweden)
TFA	TFA p.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Wasser	Entionisiert	Universität Regensburg, Regensburg (Deutschland)

Ethylacetat, Aceton und Ethanol wurden zudem in technischer Qualität bezogen, vor Gebrauch jedoch destilliert.

Tabelle 100 Verwendete Geräte und Software in Kapitel 4.3.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Biphenyl Säule (analytisch)	LC Column 250x4,6 mm 5 µm Biphenyl 100 Å mit Vorsäule, S/No. H15-168734, B/No. 5627-0019	Phenomenex, Aschaffenburg (Deutschland)

Biphenyl Säule (Semipräparativ)	LC Column 250x21,2 mm 5 µm Biphenyl 100 Å mit Vorsäule, S/No. H15-215293, B/No. 5627-0020, P/No. 00G-4627-P0-AX	Agilent Technologies Sales & Services, Waldbronn (Deutschland)
Chem3D	16.0.0.82	PerkinElmer, Waltham (USA)
ChemDraw	16.0.0.82 (68)	PerkinElmer, Waltham (USA)
CPC	CPC (Spot) mit 250 ml Rotor	Armen Instrument, Saint-Avé (Frankreich)
CPC-Pumpe	510 HPLC-Pumpe	Waters, Eschborn (Frankreich)
Fraktionskollektor	2211 Superrac	LKB Bromma, Stockholm (Deutschland)
Gefriertrocknung	P10-85	Dieter Piatkowski Forschungsgeräte, München (Deutschland)
Heizplatte	Thermoplate S	Desaga Sarstedt-Gruppe, Nümbrecht (Deutschland)
HPLC	Autosampler L-2200 Pumpe L-2130 Säulenofen L-2350 Diode Array Detector L-2455	VWR, Darmstadt (Deutschland)
HPLC Software	EZChrom Elite 3.1.7	VWR, Darmstadt (Deutschland)
HPTLC	Auftragung Linomat 5 Entwicklung ADC2 inkl. Filterpapier Doppeltrogkammer 20x10 cm Dokumentationseinheit Reprostar 3	Camag, Muttenz (Schweiz)
HPTLC Software	WinCats 1.4.6	Camag, Muttenz (Schweiz)
Massenspektromter	Agilent MS Q-TOF 6540 UHD, Ionenquelle: AJS ESI G6540A	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
NMR	Avance III 600 NMR mit 5 mm TCI CryoProbe; 600, 25 MHz (¹ H-NMR) und 150,95 MHz (¹³ C-NMR)	Bruker Corporation, Billerica, MA (USA)
NMR (selektives NOESY)	Avance III 600 NMR mit 5 mm ¹⁹ F selektivem TBIF; 600, 13 MHz (¹ H-NMR)	Bruker Corporation, Billerica, MA (USA)
NMR Röhrchen	NMR Tube Boro 3.3 (ASM Type 1 Class A glass)	Deutero, Kastellaun (Deutschland)
NMR Software	TopSpin 3.2	Bruker Bruker Corporation, Billerica, MA (USA)
Polarimeter	UniPol L 1000 Polarimeter	Schmidt + Haensch, Berlin (Deutschland)
Rotationsverdampfer	Laborota 4003	Heidolph Instruments, Schwabach (Deutschland)

Semipräparative HPLC	Binäre 1260 HPLC Infinity mit 1260 DAD, 1260 Fraktionskollektor und 1260 manueller Injektor	Agilent Technologies Sales & Services, Waldbronn (Deutschland)
Semipräparative HPLC Software	OpenLAB CDS ChemStation LC and CE Drivers A.02.09 [018]	Agilent Technologies Sales & Services, Waldbronn (Deutschland)
Ultraschallbad I	USC1200TH	VWR, Darmstadt (Deutschland)
Ultraschallbad II	USC1700TH	VWR, Darmstadt (Deutschland)
Wasseraufbereitung/ Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure, Berlin (Deutschland)
Zentrifuge	Jouan BR4i multifunctional centrifuge	Thermo Electron, Karlsruhe (Deutschland)

Für die Isolierung von ATR wurde Drogenmaterial der Firma Herbasinica (*Xanthii fructus*, *Xanthium sibiricum* PATR.) der Chargenbezeichnung 150801H164 verwendet. Das Material trägt die Zusatzbezeichnung *Chaocangerzi*, was auf eine Vorbehandlung durch Rösten hinweist. Rückstellmuster hinterlegt unter Bezeichnung KS_XanthiumHerbasinica_150801H164.

4.3.2.2 Extraktion

Im ersten Schritt der Isolierung wurden ~970 g gemahlene Drogenmaterial der Firma Herbasinica mit ~3882 g Seesand vermischt und auf vier offene Glassäulen verteilt. Die Extraktion erfolgte mittels drei verschiedener Extraktionsmittel aufsteigender Polarität, Hexan, Ethylacetat und Methanol 70% (V/V) (\cong MeOH70) via Perkolation (über Tag) und Mazeration (über Nacht). Die Extraktion mit jedem Extraktionsmittel erfolgte bis zur Farblosigkeit des Eluats, bzw. bis keine Banden mehr auf der DC- Platte zu erkennen waren. Aus den vereinigten Extrakten wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand gefriergetrocknet.

4.3.2.3 Dünnschichtchromatographie

Zur Fraktionskontrolle der Auftrennungsverfahren während der Isolierung und zur Anfertigung von Übersichts-DC wurden DCs nach den Parametern in Tabelle 101 angefertigt.

Tabelle 101 Parameter für die DC Experimente (DC-Kontrolle und Übersichts-DC) während der Isolierung von ATR.

Stationäre Phase	Kieselgelplatten (DC → Fraktionskontrolle/HPTLC → Übersichts-DC)
Mobile Phase	<i>n</i> -Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5; V/V/V, nach Ausschütteln wurde nur die obere Phase verwendet)
Auftragevolumen/ Bandenlänge	5 µl/8 mm (HPTLC) → Übersichts-DC 10 µl/1 cm (DC/TLC) → Fraktionskontrolle
Derivatisierung	In AA ¹⁾ tauchen und anschließendes Erwärmen bei 100-110 °C für 3 min auf der Heizplatte
Detektion	Vor Derivatisierung bei 254 und 366 nm Nach Derivatisierung bei 366 nm und Tageslicht

¹⁾ Zur Herstellung des Derivatisierungsreagenzes AA wurden 0,5 ml Anisaldehyd, 10 ml Essigsäure, 85 ml Methanol und 5 ml Schwefelsäure unter Eiskühlung vermischt (Wagner et al., 1983).

4.3.2.4 Säulenchromatographie an Sephadex LH-20

Der getrocknete MeOH70 Extrakt wurde in Portionen von je ca. 10 g mittels 80 ml Ethanol 70% (V/V) extrahiert (Schema, Abbildung 88) und per Sephadex LH-20 weiter fraktioniert. Die verwendete Glassäule (Länge: 95 cm; äußerer Säulendurchmesser: 4.6 cm) wurde mit Sephadex LH-20- Material (Füllhöhe: 70-76,7 cm; je nach Lauf) gepackt. Bei einem Fluss von 0,9-1,7 ml/min und Ethanol 70% (V/V) als Eluent wurde der Extrakt in Fraktionen zu 8 min pro Reagenzglas gesammelt. Nach DC-Fraktionskontrolle wurden Unterfraktionen gebildet und führten zu den Fraktionen MeOH70_1 bis MeOH70_8. Die chromatographische Trennung erfolgte in acht Läufen.

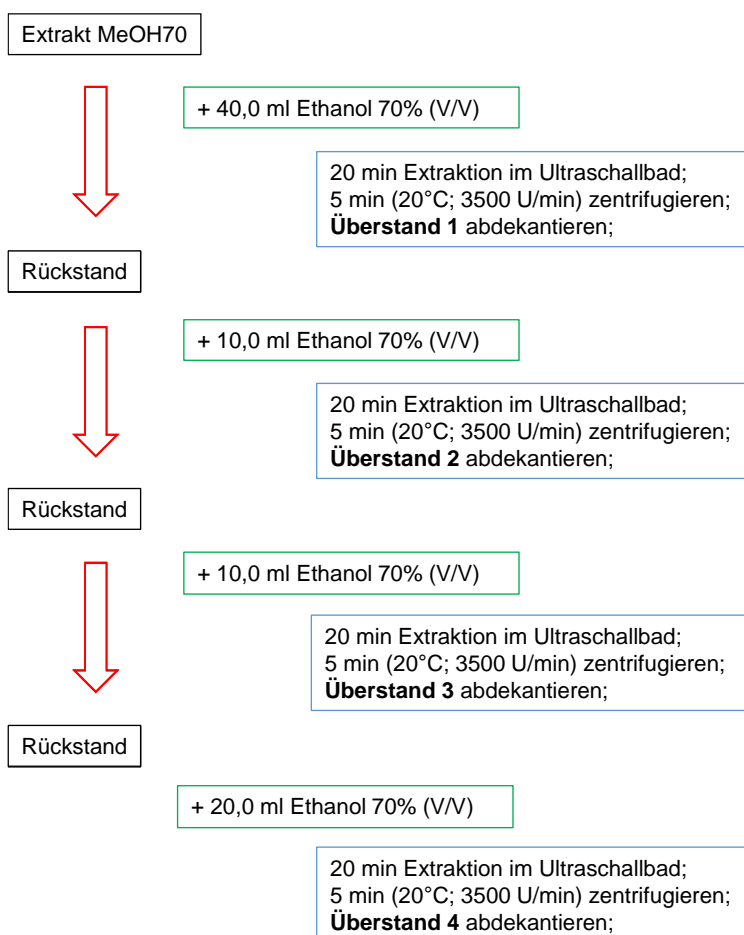


Abbildung 88 Flussdiagramm zum Extraktionsschema von MeOH70. Die Überstände 1-4 wurden vereinigt und per Sephadex LH-20 fraktioniert.

4.3.2.5 Gegenstromverteilungschromatographie CPC

Die Fraktion MeOH70_4 (13,85 g) wurde in Portionen zu 1,07-1,52 g in je 8 bzw. 9 ml mobile Phase (50% (V/V) obere und untere Phase) gelöst und in elf Läufen aufgetrennt. Die mobile Phase wurde durch Ausschütteln einer Mischung aus *n*-Butanol:Ethanol:Wasser (4:1:4, V/V/V) erhalten (30 Sekunden Schütteln der Mischung im Scheidetrichter, stabile Phasentrennung abwarten und erneut schütteln; dreimaliges Wiederholen). Bei einem Fluss von 5 ml/min, einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 800 bzw. 900 rpm („Ascending mode“; stationäre Phase \triangleq Unterphase (hier: Wasser) und mobile Phase \triangleq Oberphase (hier *n*-Butanol)) wurden per Fraktionskollektor 10 ml pro Fraktionsglas gesammelt. Da im „Descending mode“ kaum mehr Substanz eluierte (DC-Kontrolle), wurde in weiteren Läufen umgehend nach dem „Ascending mode“ die CPC-Anlage ausgespült und neubeladen. Mittels DC-Kontrolle wurden sinnvolle Unterfraktionen (MeOH70_4.1-MeOH70_4.5) gebildet.

4.3.2.6 Semi-präparative HPLC

Der finale Schritt der Isolierung wurde via semi-präparativer HPLC (203 nm) durchgeführt. Die Fraktion MeOH70_4.4 wurde mit einer Konzentration von 15 mg/ml in den Startbedingungen gelöst und sukzessive manuell injiziert. Unter Verwendung der in Tabelle 102 und Tabelle 103 beschriebenen Gradienten I und II wurde die Chromatographie mit einem Fluss von 21 ml/min durchgeführt. Die Eluate konnten in vier Fraktionen (Fraktion 0-3) unterteilt werden und führten zu 15,4 mg des Isolats (Fraktion 3) mit den Retentionsbereichen 19,9-21,3 min (Gradient I, Tabelle 102) und 21,0-21,4 min (Gradient II, Tabelle 103). Die mobile Phase setzt sich aus den beiden Eluenten Wasser + TFA 0,1% (A) und Acetonitril + TFA 0,1% (B) zusammen.

Tabelle 102 Gradient I zur Auftrennung der Fraktion MeOH70_4.4 per semipräparativer HPLC.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	85	15
10	85	15
40	60	40
42	0	100
45	0	100
46	85	15
50	85	15

Tabelle 103 Gradient II zur Auftrennung der Fraktion MeOH70_4.4 per semipräparativer HPLC.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	85	15
10	85	15
25	72,5	27,5
27	0	100
32	0	100
33	85	15
37	85	15

4.3.2.7 NMR-spektroskopische Verfahren

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie sollte das Isolat charakterisiert und die Ergebnisse anhand von 1D- (^1H , ^{13}C), als auch mit 2D-Verfahren ($([^1\text{H}-^1\text{H}]\text{-COSY}$, $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]\text{-HSQC}$, $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]\text{-HMBC}$, $[^1\text{H}-^1\text{H}]\text{-ROESY}$) ausgewertet und mit Literaturdaten abgeglichen werden. Dazu wurden ca. 15 mg des Isolates in 0,6 ml $\text{DMSO}-d_6$ gelöst und mit Hilfe eines NMR-Spektrometers vermessen. Chemische Verschiebungen (δ_{H} und δ_{C}) werden in ppm und Kopplungskonstanten J in Hz in tabellarischer Form angegeben. Um die Konfiguration am C-4 zu verifizieren, wurde

ein selektives NOESY-Experiment unter Einstrahlung des Protons am C-4 (Mischzeiten von 25-350 ms, Messung während des linearen Aufbaus) durchgeführt.

4.3.2.8 Massenspektrometrie

Die hochaufgelöste Masse wurde bei Raumtemperatur an einem Massenspektrometer mit Hilfe der Elektrospray-Ionisation (ESI) im negativen Modus aufgenommen. Die Detektion der Fragmente erfolgte mit Hilfe eines Quadrupol-Time of Flight Detektors.

4.3.2.9 Polarimetrie

Um die Identität des Isolates zusätzlich zu verifizieren, wurde die optische Aktivität anhand der Messung des Drehwinkels von linear polarisiertem Licht gemessen und mit Werten in der Literatur (Brucoli et al., **2012**) abgeglichen. Der Drehwert wurde bei Raumtemperatur (Temperatur 24 °C), bei einer Konzentration von 10,28 mg/ml (in Wasser, entionisiert) und bei 589 nm in einem Messrohr (Länge 5 cm) gemessen. Der angegebene Wert $[\alpha]_{589}$ ergibt sich als Durchschnittswert aus 10 Einzelmessungen.

4.3.2.10 Reinheitsbestimmung

Die chromatographische Reinheit des Isolates wurde mit Hilfe eines HPLC-Gerätes und der Software EZChrom Elite® nach dem Prinzip der Normalisierung (Maxplot, Subtraktion des Leerwertes) ermittelt. Dazu wurde eine Lösung des Isolates mit einer Konzentration von 5 mg/ml in Methanol 50% (V/V) gelöst und mit einem Injektionsvolumen von 10 µl nach dem Gradienten, Tabelle 104 mit den beiden Eluenten Wasser + TFA 0,1% (A) und Acetonitril + TFA 0,1% (B) bei einer Flussrate von 1,000 ml/min und einer Säulenofentemperatur von 25 °C vermessen. Bei der stationären Phase handelte es sich um eine Biphenylsäule.

Tabelle 104 Gradient zur Reinheitsbestimmung des Isolates.

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0	85	15
5	85	15
30	60	40
31	0	100
36	0	100
38	85	15
44	85	15

4.3.3 Ergebnisse und Diskussion

Zu Beginn der Isolierung wurden zunächst Extrakte unterschiedlicher Polarität durch Perkolation (tagsüber) und Mazeration (nachts) des Drogenmaterials bei Raumtemperatur

angefertigt. Die Perkolation erfolgte mit fließendem und die Mazeration mit stehendem Lösungsmittel. Da es sich bei der Mazeration um ein erschöpfendes und apparativ einfaches Verfahren unter Schonung der möglichen Isolate handelt, wurde dies als erster Extraktionsschritt gewählt (Sticher et al., 2015).

Die eingesetzten Volumina an Lösungsmittel [l] und die Menge an gewonnenem Extrakt [L]/[g] sind in Tabelle 105 dargestellt.

Tabelle 105 Volumen [ml] an eingesetztem Lösungsmittel, gewonnenem Extrakt [l] und Masse [g] der Extrakte nach Extraktion über offene Glassäulen mittels Perkolation/ Mazeration.

Lösungsmittel	Volumen Lösungsmittel eingesetzt [l]	Volumen gewonnener Extrakt [l]	Masse Extrakt [g]
Hexan	18,0	13,5	132,9
Ethylacetat	23,0	22,0	13,2
Methanol 70% (V/V)	25,0	26,5	89,9

Um das Ergebnis der Extraktion zu überprüfen und festzulegen mit welchem Extrakt weitere Isolierungsschritte vorzunehmen sind, wurden Übersichts-DC (Abbildung 89) angefertigt.

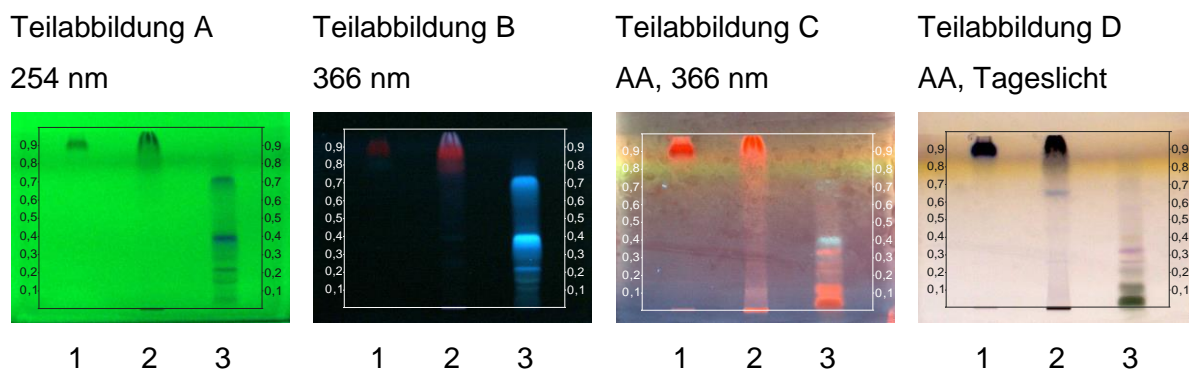


Abbildung 89 Übersichts-DC (bei 254 nm → Teilabbildung A, bei 366 nm → Teilabbildung B, nach Derivatisierung bei 366 nm → Teilabbildung C und nach Derivatisierung bei Tageslicht → Teilabbildung D); Analysenparameter nach Tabelle 101; Bahn 1: Hexan Extrakt (10 mg/ml), Bahn 2: Ethylacetat Extrakt (10 mg/ml), Bahn 3: Methanol 70% (V/V) Extrakt (10 mg/ml); Laufstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand).

Basierend auf der Polarität von ATR, Literaturdaten (Nikles et al., 2014) und den TLC/MS Vorversuchen, lässt sich die rosafarbene Zone (Abbildung 89, Teilabbildung D, Bahn 3) mit dem R_f -Wert von ca. 0,33 dem gesuchten Diterpen zuordnen. Daher wurde in weiteren Isolierungsschritten der Methanol 70% (V/V) Extrakt (\cong MeOH70) verwendet.

Um den MeOH70 Extrakt weiter zu fraktionieren, wurde im nächsten Schritt eine präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20 Material durchgeführt.

Bei diesem Material handelt es sich um quervernetztes, hydroxypropyliertes Dextrangel mit sowohl lipophilem (L), als auch hydrophilem (H) Charakter. Durch die Verwendung von Fließmitteln/mobilen Phasen unterschiedlicher Polarität, kann Sephadex LH-20 sowohl als Normalphasenchromatographie, Phasenumkehr- als auch als selektive Adsorptions-

Chromatographie betrieben werden. Die Trennmechanismen beruhen dabei auf Größenausschluss-, selektiven Adsorptions-, aber auch verteilungschromatographischen Effekten. Somit ermöglicht die Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 die Trennung zahlreicher chemischer Verbindungsklassen. (Henke, 1994)

Die erhaltenen Fraktionen mit zugehörigem Elutionsvolumen [ml] sind in Tabelle 106 dargestellt. Am Ende eines jeden Laufes wurde die Säule mit Ethanol 70% (V/V) und am Ende der acht Läufe mit Aceton 70% (V/V) nachgewaschen. Die Ausbeuten berechnen sich als prozentualer Anteil aus der Summe des eingesetzten Materials abzüglich der unlöslichen Rückstände nach Gefriertrocknung (Abbildung 88 und Tabelle 107). Die Ausbeuten der beiden Waschschrte betragen 0,06 g (\approx 0,09%) für Ethanol 70% (V/V) und 0,03 g (\approx 0,04%) für Aceton 70% (V/V).

Tabelle 106 Fraktionen MeOH70_1-MeOH70_8 mit zugehörigen Elutionsbereichen V [ml] nach Aufarbeitung mittels Sephadex LH-20 Material.

Meoh70	_1 V [ml]	_2 V [ml]	_3 V [ml]	_4 V [ml]	_5 V [ml]	_6 V [ml]	_7 V [ml]	_8 V [ml]
Lauf 1	0-492	492-622	622-687	687-927	927-1102	1102-1199,5	1199,5-2029,5	2029,5-3199,5
Lauf 2	0-480	480-605	605-670	670-915	915-1095	1095-1192,5	1192,5-2017,5	2017,5-2971,5
Lauf 3	0-490	490-617,5	617,5-682,5	682,5-922,5	922,5-1095	1095-1190	1190-1935	1935-2845
Lauf 4	0-470	470-565	565-627,5	627,5-857,5	857,5-1027,5	1027,5-1120	1120-1900	1900-2845
Lauf 5	0-405	405-495	495-563	563-848	848-1002	1002-1136	1136-1975	1975-3177
Lauf 6	0-440	440-586	586-640	640-886	886-1062	1062-1154	1154-2024	2024-2979
Lauf 7	0-420	420-570	570-624	624-868	868-1044	1044-1136	1136-1775	1775-2755
Lauf 8	0-436	436-570	570-628	628-863	863-1028	1028-1115	1115-1895	1895-3055

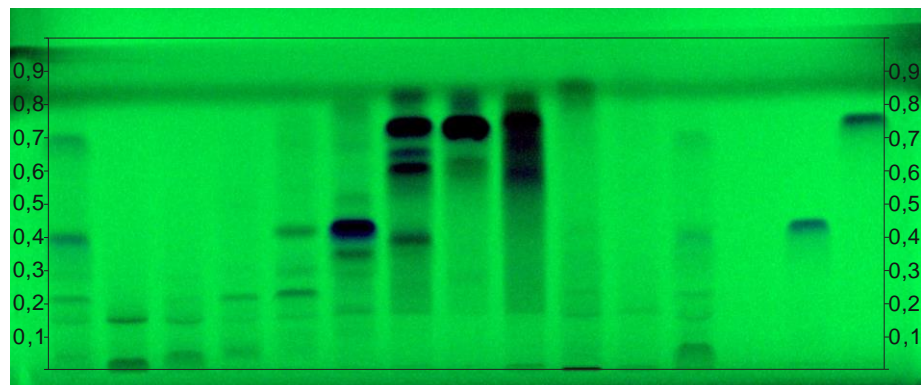
Tabelle 107 Auswaagen [g], Ausbeute [%] der Fraktionen MeOH70_1-MeOH70_8 und Gesamtausbeute [%] der Auftrennung per Sephadex LH-20.

Fraktionen MeOH70_	1	2	3	4	5	6	7	8
Auswaage [g]	2,72	14,97	12,36	23,19	7,14	1,50	1,78	0,23
Ausbeute [%]	4,0	21,9	18,1	34,0	10,5	2,2	2,6	0,3
Gesamt- ausbeute [%]	93,7							

In Abbildung 90 (mit Teilabbildungen A-D) ist das Ergebnis der Auftrennung des Extraktes MeOH70 nach acht Läufen in Form eines Übersichts-DC, dargestellt.

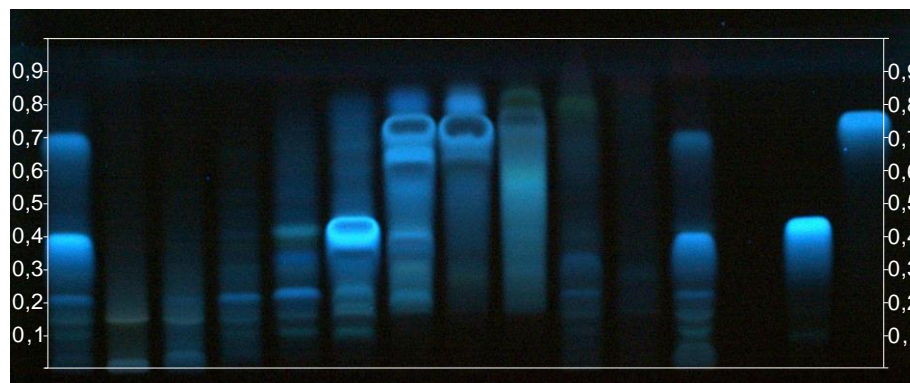
Teilabbildung A

254 nm



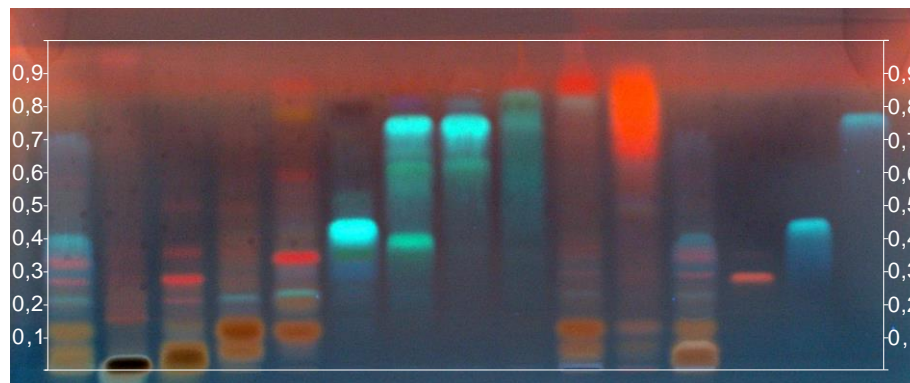
Teilabbildung B

366 nm



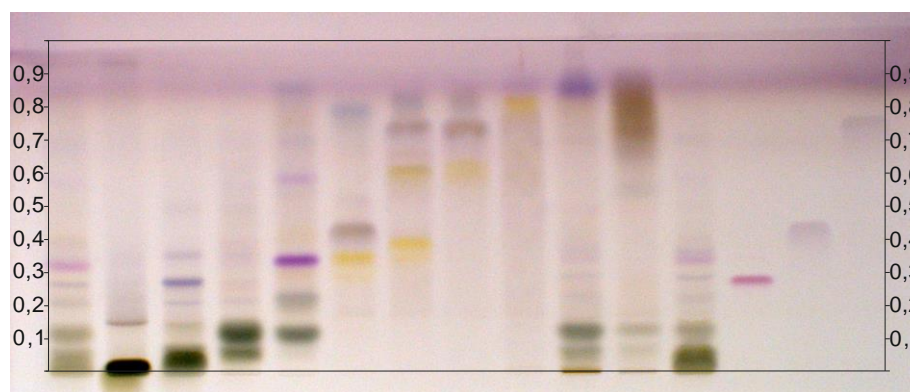
Teilabbildung C

AA, 366 nm



Teilabbildung D

AA, Tageslicht



Bahn

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Abbildung 90 Übersichts-DC (bei 254 nm → **Teilabbildung A**, bei 366 nm → **Teilabbildung B**, nach Derivatisierung bei 366 nm → **Teilabbildung C**, nach Derivatisierung bei Tageslicht → **Teilabbildung D**); Analysenparameter nach Tabelle 101; Bahn 1: Fraktion MeOH70 (10 mg/ml), Bahn 2: Fraktion MeOH70_1 (10 mg/ml), Bahn 3: Fraktion MeOH70_2 (10 mg/ml), Bahn 4: Fraktion MeOH70_3 (10 mg/ml), Bahn 5: Fraktion MeOH70_4 (10 mg/ml), Bahn 6: Fraktion MeOH70_5 (10 mg/ml), Bahn 7: Fraktion MeOH70_6 (10 mg/ml), Bahn 8: Fraktion MeOH70_7 (10 mg/ml), Bahn 9: Fraktion MeOH70_8 (10 mg/ml), Bahn 10: Fraktion Waschschrift mit Ethanol 70% (V/V) (10 mg/ml), Bahn 11: Fraktion Waschschrift mit Aceton 70% (V/V) (10 mg/ml), Bahn 12: unlöslicher Rückstand aus acht Läufen (10 mg/ml), Bahn 13: CATR (1 mg/ml), Bahn 14: Chlorogensäure (1 mg/ml), Bahn 15: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (1 mg/ml); Laufstrecke 8 cm (vom unteren Plattenrand).

Als Resultat der DC-geleiteten Isolierungsstrategie wurde für weitere Aufarbeitungsschritte die Fraktion MeOH70_4 gewählt. Nach Abbildung 90, Teilabbildung D, Bahn 5 befindet sich die zu isolierende Bande in dieser Unterfraktion.

Vorversuche mittels Flashchromatographie und CPC mit verschiedenen mobilen Phasen sollten das praktikabelste Vorgehen zur Fraktionierung von MeOH70_4 aufzeigen. Die Vorversuche an Kieselgel zur Flashchromatographie mit den Fließmitteln Ethylacetat-Hexan, Ethanol-Ethylacetat und Methanol-Ethylacetat in unterschiedlichen Volumenverhältnissen zeigten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Während der Vorversuche zur CPC konnte ein

vielversprechendes Fließmittelsystem, *n*-Butanol:Ethanol:Wasser (4:1:4, V/V/V), gefunden werden.

Bei der CPC handelt es sich um eine Gegenstromverteilungschromatographie, die für eine Vielzahl von Trennungproblemen, vor allem bei Naturstoffen Anwendung findet. Neben einer hohen Wiederfindung, einem geringen Lösungsmittelverbrauch, einer minimalen Gefahr der Denaturierung der eingesetzten Probe, kommt es zudem zu keiner irreversiblen Adsorption. (Marston and Hostettmann, **1994**) Die positiven Ergebnisse aus den Vorversuchen in Kombination mit den erwähnten Vorteilen stützen die Entscheidung für eine Flüssig-flüssig-Verteilung im nächsten Aufarbeitungsschritt.

Nach elf Läufen wurden die in Tabelle 108 aufgeführten Unterfraktionen MeOH70_4.1-MeOH70_4.5 gebildet und führten zu Auswaagen [g], bzw. Ausbeuten [%] wie sie in Tabelle 109 vorgestellt sind. Nach Beendigung eines jeden Laufes wurde das System gespült und mit mobiler Phase neu beladen. Die Ausbeute dieser Unterfraktion MeOH70_4.Ausspülen/Neubeladen beträgt 2,91 g (\approx 20,99%).

Tabelle 108 Fraktionen mit zugehörigem Elutionsvolumen [ml] nach Aufarbeitung der Fraktion MeOH70_4.

Fraktionen	MeOH70_4.1 V [ml]	MeOH70_4.2 V [ml]	Meoh70_4.3 V [ml]	MeOH70_4.4 V [ml]	MeOH70_4.5 V [ml]	Einwaage [g]
Lauf 1	0-140	140-170	170-340	340-510	510-2000	1,07
Lauf 2	0-140	140-170	170-320	320-450	450-1400	1,52
Lauf 3	0-140	140-170	170-320	320-510	510-1395	1,24
Lauf 4	0-140	140-170	170-340	340-510	510-1500	1,24
Lauf 5	0-140	140-170	170-340	340-510	510-1360	1,22
Lauf 6	0-140	140-170	170-330	330-510	510-1200	1,28
Lauf 7	0-140	140-170	170-340	340-510	510-1200	1,24
Lauf 8	0-140	140-170	170-340	340-510	510-1190	1,27
Lauf 9	0-140	140-170	170-340	340-510	510-1270	1,27
Lauf 10	0-140	140-170	170-340	340-510	510-1305	1,24
Lauf 11	0-140	140-170	170-340	340-510	510-1375	1,26

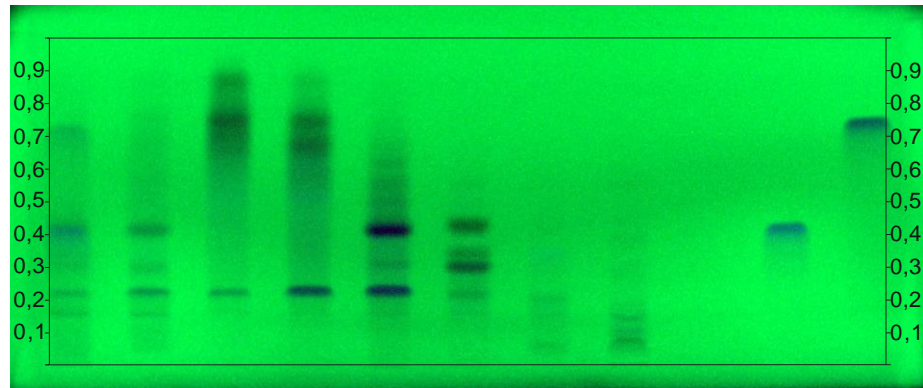
Tabelle 109 Auswaagen [g], Ausbeuten [%] und Gesamtausbeute [%] der Unterfraktionen MeOH70_4.1-MeOH70_4.5 nach Aufarbeitung mittels CPC.

Fraktionen	MeOH70_4.1 V [ml]	MeOH70_4.2 V [ml]	Meoh70_4.3 V [ml]	MeOH70_4.4 V [ml]	MeOH70_4.5 V [ml]
Auswaage [g]	0,77	0,76	1,88	1,00	4,95
Ausbeute [%]	5,6	5,5	13,6	7,2	35,7
Gesamt- ausbeute [%]	88,5				

Um die Fraktionierung mittels CPC abschließend beurteilen zu können, wurde ein Übersichts-DC (Abbildung 91, mit Teilabbildungen A-D) angefertigt.

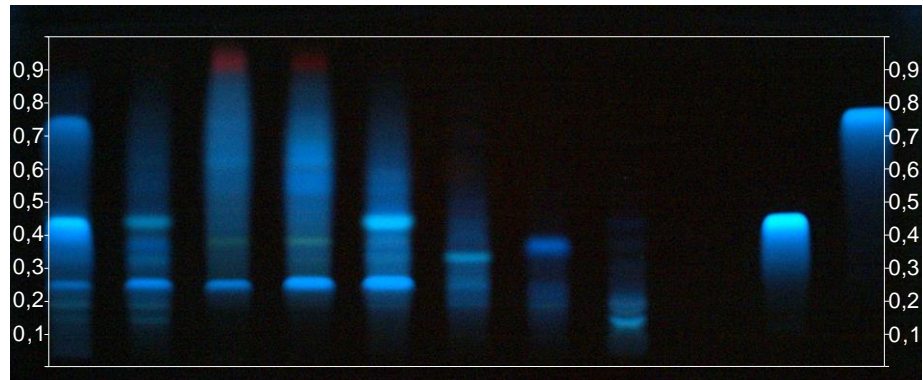
Teilabbildung A

254 nm



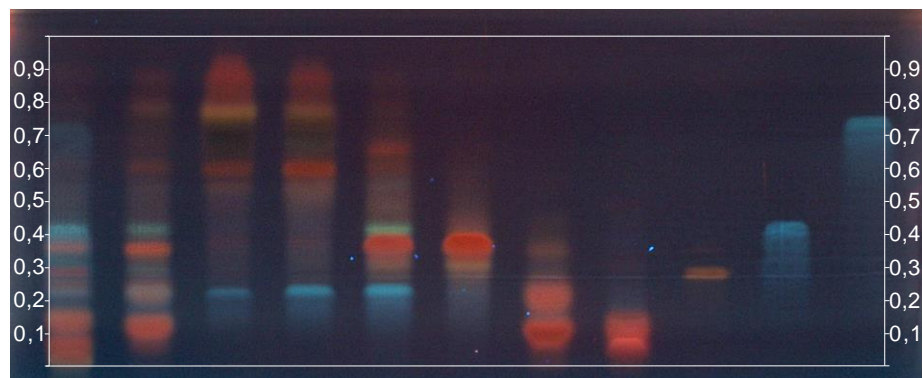
Teilabbildung B

366 nm



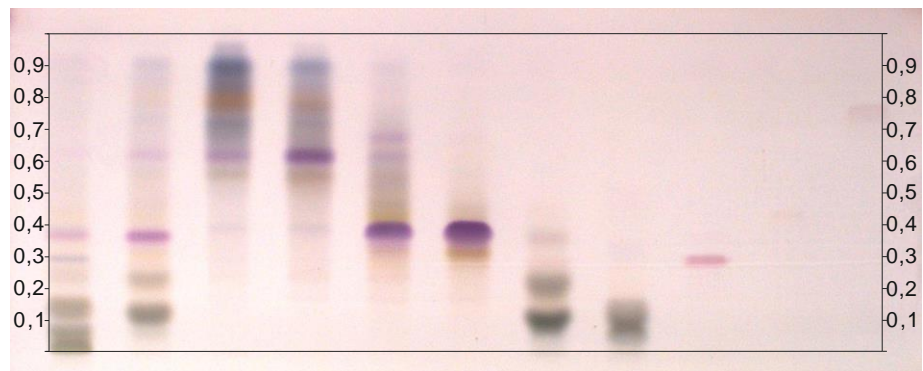
Teilabbildung C

AA, 366 nm



Teilabbildung D

AA, Tageslicht



Bahn

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Abbildung 91 Übersichts-DC (bei 254 nm → **Teilabbildung A**, bei 366 nm → **Teilabbildung B**, nach Derivatisierung bei 366 nm → **Teilabbildung C**, nach Derivatisierung bei Tageslicht → **Teilabbildung D**), Analysenparameter nach Tabelle 101; Bahn 1: MeOH70 (10 mg/ml), Bahn 2: MeOH70_4 (10 mg/ml), Bahn 3: MeOH70_4.1 (10 mg/ml), Bahn 4: MeOH70_4.2 (10 mg/ml), Bahn 5: MeOH70_4.3 (10 mg/ml), Bahn 6: MeOH70_4.4 (10 mg/ml), Bahn 7: MeOH70_4.5 (10 mg/ml), Bahn 8: MeOH70_4.Ausspülen/Neubeladen (10 mg/ml), Bahn 9: CATR (1 mg/ml), Bahn 10: Chlorogensäure (1 mg/ml), Bahn 11: 1,5-Dicaffeoylchinasäure; Laufstrecke 8 cm (von unteren Plattenrand).

Die gesuchte rosa Bande (R_f -Wert ca. 0,37) befindet sich in zwei Fraktionen, MeOH70_4.3 (Abbildung 91, Teilabbildung D, Bahn 5) und MeOH70_4.4 (Abbildung 91, Teilabbildung D, Bahn 6).

Bahn 6). Da sich in zuletzt genannter Fraktion vergleichsweise weniger andere Zonen befinden, wurde diese für weitere Aufarbeitungsschritte gewählt.

Zur finalen Aufreinigung wurde die Fraktion MeOH70_4.4 (Gesamtmenge 149,5 mg) mittels semipräparativer HPLC (203 nm) an einer Biphenyl Säule durch Gradient I (Tabelle 102) und II (Tabelle 103) in mehreren Läufen aufgearbeitet und führte zu vier Unterfraktionen (Fraktion 0,1,2 und 3). Abbildung 92 zeigt exemplarisch einen Lauf (Bezeichnung: ATR/2017-01-11 09-05-06 ATR 1 33.D) zur Auftrennung der Fraktion in die respektiven Unterfraktionen.

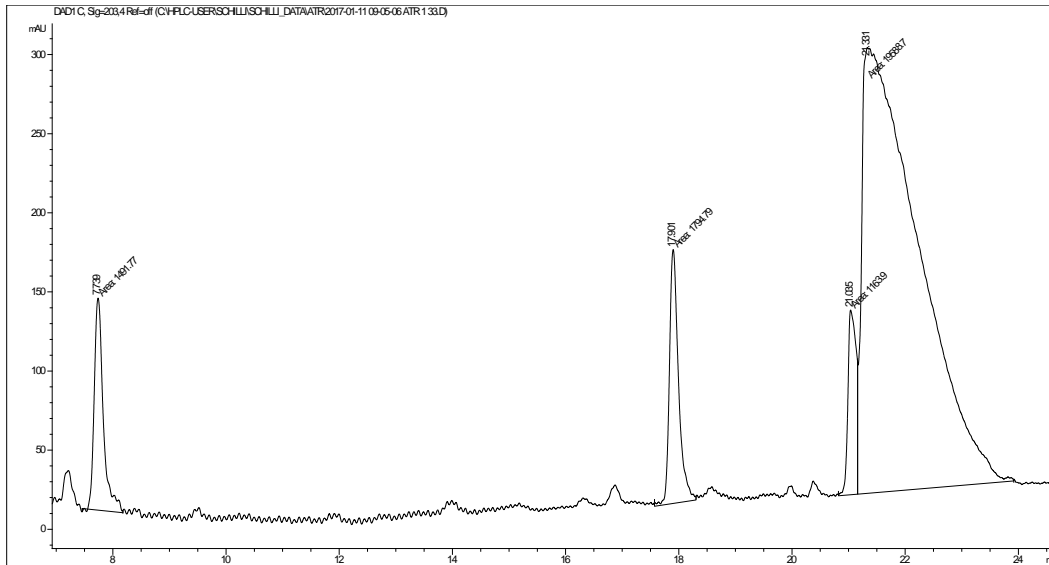
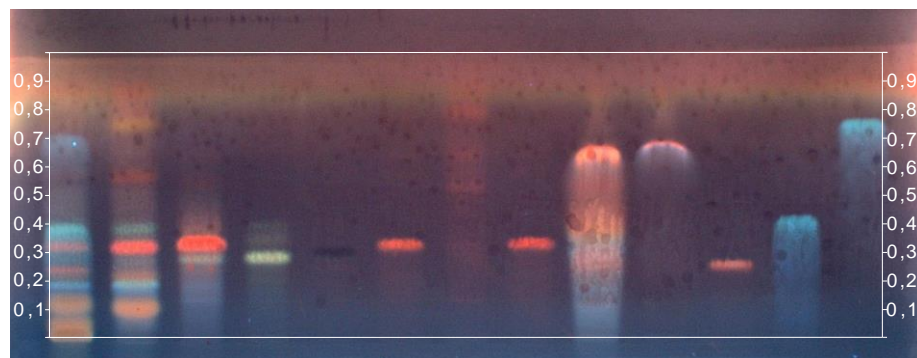


Abbildung 92 Ausschnitt aus einem Chromatogramm (203 nm) zur Auftrennung der Fraktion MeOH70_4.4 in die Unterfraktionen 0-3 nach Gradient II Tabelle 103; Laufname: ATR/2017-01-11 09-05-06 ATR 1 33.D, Gesammelte Fraktionen: **Fraktion 0**: 7,7-7,8 min; **Fraktion 1**: 17,8-18,0 min; **Fraktion 2**: 21,0-21,1 min; **Fraktion 3**: 21,3-23,3 min.

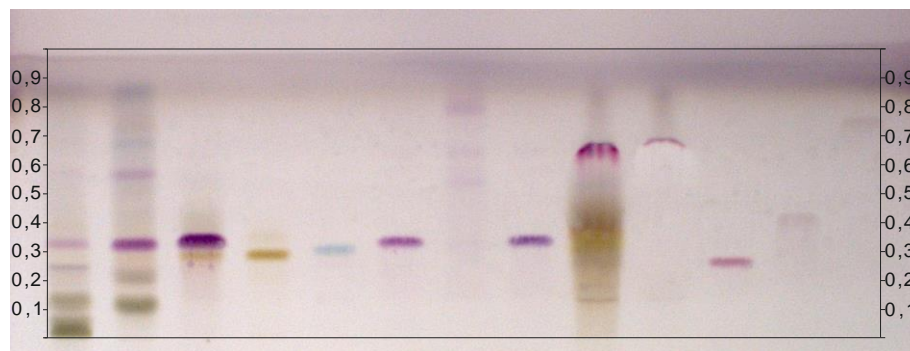
Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden die Fraktionen gefriergetrocknet und ein Übersichts-DC angefertigt.

Teilabbildung A
AA, 366 nm



Teilabbildung B

AA, Tageslicht



Bahn

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Abbildung 93 Übersichts-DC (nach Derivatisierung bei 366 nm → **Teilabbildung A** und Tageslicht → **Teilabbildung B**); Analysenparameter nach Tabelle 101; Bahn 1: Fraktion MeOH70 (10 mg/ml), Bahn 2: Fraktion MeOH70_4 (10 mg/ml), Bahn 3: MeOH70_4.4 (10 mg/ml), Bahn 4: Fraktion 0 (1 mg/ml), Bahn 5: Fraktion 1 (1 mg/ml), Bahn 6: Peak 2 (1 mg/ml), Bahn 7: Fraktion 3_ab 03.01.2017 (1 mg/ml), Bahn 8: Fraktion 3_ab 12.01.2017 (1 mg/ml), Bahn 9: Fraktion 1-25 ml (100 mg/ml), Bahn 10: Fraktion 25-37/50 ml (100 mg/ml), Bahn 11: CATR (1 mg/ml), Bahn 12: Chlorogensäure (1 mg/ml), Bahn 13: 1,5-Dicaffeoylchinasäure (1 mg/ml); Laufstrecke 7 cm (vom unteren Plattenrand).

Wie in Bahn 8, Abbildung 93 zu erkennen ist, konnte die rosa Bande (Fraktion 3, Abbildung 92) im letzten Schritt der Isolierung von den übrigen Bestandteilen abgetrennt werden.

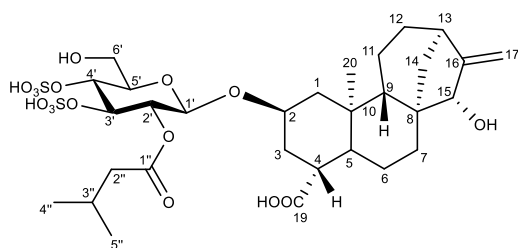


Abbildung 94 Struktur des Diterpens Atractylosid (ATR) inkl. Nummerierung der C-Atome.

Um die Struktur des Isolates zu verifizieren, wurden 1D- und 2D-spektroskopische Verfahren verwendet. Tabelle 110 zeigt ¹H- und ¹³C-NMR Daten des Isolates im Vergleich zur Literatur (Brucoli et al., 2012), die Bezeichnung bzw. Nummerierung der C-Atome erfolgte analog Abbildung 94.

Kapitel 4

Tabelle 110 ¹H- und ¹³C-NMR Daten des Isolates (¹H-NMR-600 MHz, ¹³C-NMR 150 MHz, 298 K; gemessen in DMSO-d₆) im Vergleich zur Literatur (Brucoli et al., 2012) (¹H-NMR-500 MHz, ¹³C-NMR 125 MHz; gemessen in DMSO-d₆). */**/** bezeichnen überlappende Signale *** 9 Atome. ^d Signалуordnung austauschbar bzw. vertauscht.

C/H	δ_C Isolat	δ_C Literatur	δ_H Isolat	δ_H Literatur
1	47.1, CH ₂	46.9, CH ₂	2.17 (1H, m), 0.63 (1H, t, 11.9)	2.18-2.15 (1H, m) H α , 0.64 (1H, t, 11.9) H β
2	72.4, CH	72.4, CH ^d	4.02 (1H, m)*	4.06-4.00 (1H, m, overlapped)
3	34.2, CH ₂	34.2, CH ₂	2.22 (1H, m), 1.06 (1H, dt, 11.8, 5.3)	2.23 (1H, dd, 2.19, 1.75), 1.07 (1H, ddd, 5.41, 5.30, 4.74)
4	42.8, CH	45.5, CH ₂	2.56 (1H, m)	2.57 (2H, bs)
5	48.3, CH	48.3, CH	1.31 (1H, m)	1.38-1.28 (1H (5H), m)
6	25.1, CH ₂	24.9, CH ₂	1.74 (1H, m), 1.50 (1H, m)	1.78-1.73 (1H, m), 1.56-1.49 (1H (4H), m)
7	34.7, CH ₂	34.7, CH ₂	1.55 (1H, m), 1.30 (1H, m)	1.56-1.49 (1H (4H) m), 1.38-1.28 (1H (5H), m)
8	47.0, C	47.1, C		
9	52.3, CH	52.3, CH	0.95 (1H, d, 7.9)	0.97 (1H, d, 7.9)
10	40.0, C	42.8, C		
11	17.8, CH ₂	17.5, CH ₂	1.50 (1H, m), 1.33 (1H, m)	1.56-1.49 (1H (4H), m), 1.38-1.28 (1H (5H), m)
12	32.1, CH ₂	32.1, CH ₂	1.52 (1H, m), 1.36 (1H, m)	1.56-1.49 (1H (4H), m), 1.38-1.28 (1H (5H), m)
13	41.7, CH	41.4, CH	2.60 (1H, bs)	2.61 (1H, bs)
14	35.7, CH ₂	35.7, CH ₂	1.69 (1H, d, 11.2), 1.29 (1H, m)	1.70 (1H, d, 10.9), 1.38-1.28 (1H (5H), m)
15	81.1, CH	81.1, CH	3.61 (1H, m)**	3.63-3.61 (1H, m)
16	159.5, C	159.5, C		
17	107.6, CH ₂	107.6, CH ₂	5.05 (1H, bs), 4.95 (1H, bs)	5.06 (1H, bs), 4.96 (1H, bs)
19	176.2, C=O	176.2, C=O		
20	16.3, CH ₃	16.3, CH ₃	0.87 (d, 2.1)***	0.89 (3H, d, 2.63)
1'	98.8, CH	98.9, CH	4.55 (1H, d, 7.6)	4.55 (1H, d, 7.8)
2'	72.3, CH	72.2, CH ^d	4.64 (1H, dd, 7.7, 7.7)	4.64 (1H, t, 8.0)
3'	77.0, CH	77.0, CH	4.31 (1H, dd, 8.0, 8.0)	4.31 (1H, t, 8.3)
4'	73.2, CH	73.1, CH	4.04 (1H, dd, 8.2, 8.2)*	4.02 (1H, t, 8.5, overlapped)
5'	76.1, CH	75.8, CH	3.47 (1H, ddd, 8.3, 5.1, 2.9)	3.45-3.42 (1H, m)
6'	61.4, CH ₂	61.2, CH ₂	3.63 (1H, m)***, 3.58 (1H, m)**	3.67-3.64 (1H, m), 3.59-3.54 (1H, m)
1''	170.8, C=O	170.8, C=O		
2''	42.9, CH ₂	42.7, CH ₂	2.12 (2H, dd, 6.9, 5.7)	2.14 (1H, d, 2.33), 2.12 (1H, d, 1.98)
3''	24.8, CH	24.8, CH	1.95 (1H, sept, 6.8)	1.96 (1H, sept, 6.7)
4'', 5''	22.3, 22.4, CH ₃	22.13, 22.17, CH ₃	0.87 (d, 2.5)***	0.87 (6H, d, 2.5)

Die gemessenen Signale sind größtenteils deckungsgleich mit Literaturdaten (Brucoli et al., 2012). Lediglich die Signale für C-4 und C-10 unterscheiden sich geringfügig von der Literatur.

Um den Strukturvorschlag weiter zu bestätigen, sollten ein selektives NOESY-Experiment, ein ROESY-Experiment und ein simuliertes Aufspaltungsmuster des ¹H-NMR Spektrums des relevanten Spinsystems per TopSpin-Software Aufschluss geben.

Um die Stereochemie an C-4 zu verifizieren wurde ein selektives NOESY-Experiment durchgeführt, welches beruhend auf dem „Nuclear Overhauser Effect“ Informationen zur Wechselwirkung zweier Protonen im Raum (< fünf Å) gibt (Sticher et al., **2015**). Dafür wurde selektiv H-4 angeregt, um die relative Stereochemie an C-4 und C-5 abzusichern. Bei ATR zeigen H-5 und H-4 in die gleiche Richtung (*cis*), wodurch es sich am C-4 um eine *R*-Konfiguration handelt. Aufgrund dessen sollte beim selektiven NOESY-Experiment, rascher ein deutliches Signal zwischen den beiden Protonen (H-4/H-5) detektiert werden. Bei invertierter Stereochemie (*S*-Konfiguration) am C-4 dürfte erst nach längeren Mischzeiten ein schwaches Signal zu erkennen sein. Wie in Abbildung 95 dargestellt, wurde bereits bei einer Mischzeit von 25 ms ein deutliches Kreuzsignal (im Verhältnis zu den anderen das Stärkste) zwischen H-4 und H-5 detektiert. Abbildung 96 zeigt selektive NOE-Spektren zu unterschiedlichen Mischzeiten (25-350 ms). Bei der Auswertung zu beachten sind jedoch die Abstände zwischen H-4 und H-5 (gemessen mit Hilfe der Chem3D Software nach einer Energieoptimierung mittels MM2-Algorithmus). In *cis*-Stellung, beträgt dieser 2,4 Å, in *trans*-Stellung 3,0 Å. Die Differenz von 0,6 Å ist zu jedoch zu marginal, um eine definitive Aussage bezüglich der Stereochemie treffen zu können.

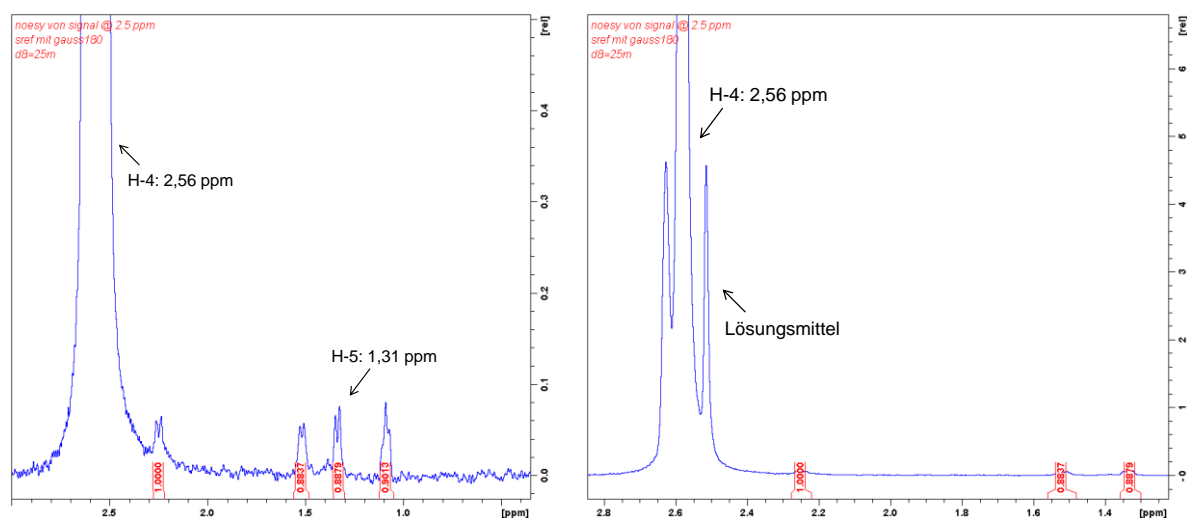


Abbildung 95 **Links**: selektives NOE-Spektrum mit den Signalen des angeregten H-4 und dem Kreuzsignal für H-5. **Rechts**: selektives NOE-Spektrum mit dem Signal für das Lösungsmittel (DMSO δ 2,50) (Fulmer et al., **2010**) und für H-4 (δ 2,56).

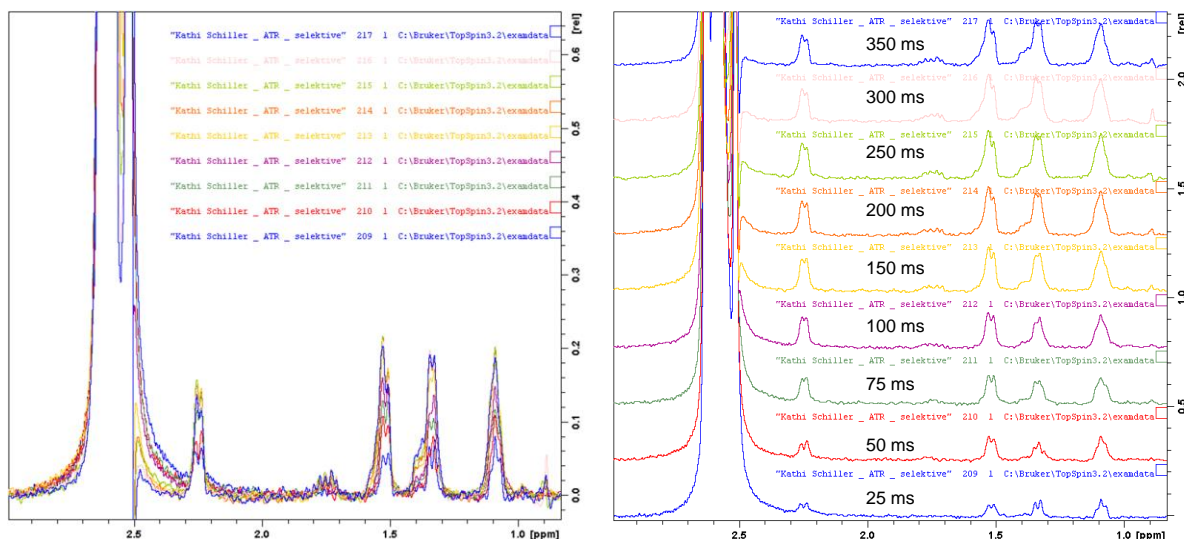


Abbildung 96 Overlay der NOE-Spektren zu unterschiedlichen Mischzeiten.

Daher sollte ein ROESY-Experiment zusätzlichen Aufschluss geben. Dabei wurden vor allem die Kreuzsignale zwischen H-4/H-2 und CH₃-20 beobachtet. Zusätzlich wurden ebenfalls mit Hilfe der Chem3D Software und einer Energieoptimierung mittels MM2- Algorithmus die Abstände (Å) zwischen den genannten Atomen vermessen, um abzuschätzen, ob diese noch in räumlicher Nähe zueinanderstehen.

Liegt eine *R*-Konfiguration am C-4 vor, so betragen die Abstände 2,1 Å (CH₃-20 – H-2) und 4,0 Å (CH₃-20 – H-4) wie in Abbildung 97 im 3D-Modell dargestellt.

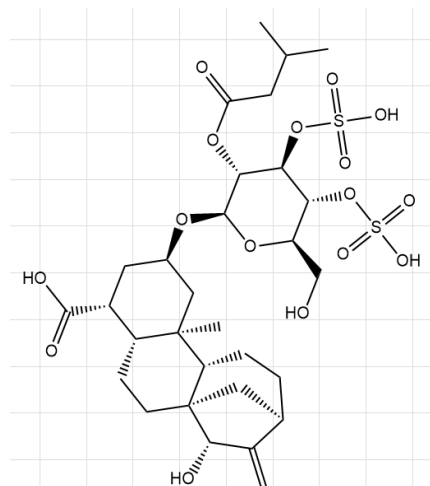
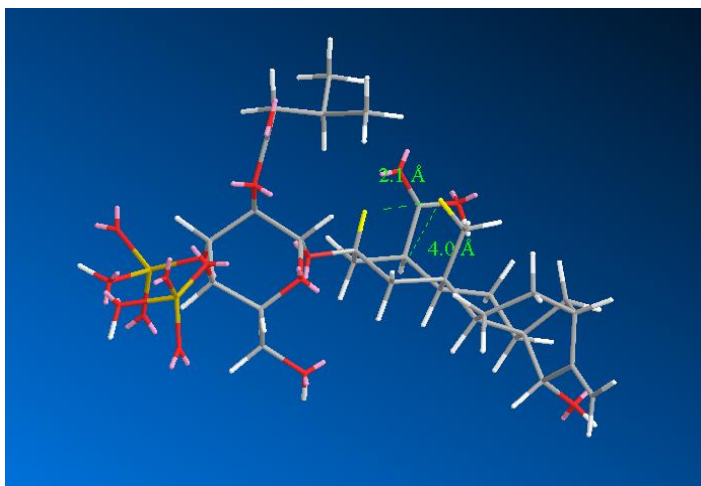


Abbildung 97 Dreidimensionales Modell des ATRs inkl. dazugehöriger Bindungslängen zwischen CH₃-20 und H-2 (2,1 Å) und zwischen CH₃-20 und H-4 (4,0 Å) bei *R* Konfiguration an C-4. In grau dargestellt ist das Kohlenstoffgrundgerüst, in weiß sind Protonen, rot Sauerstoff, pink die freien Elektronen und gelb Schwefelatome dargestellt.

Bei einer *S*-Konfiguration am C-4, betragen die Abstände 2,3 Å (CH₃-20 – H-2) und 2,2 Å (CH₃-20 – H-4) (Abbildung 98).

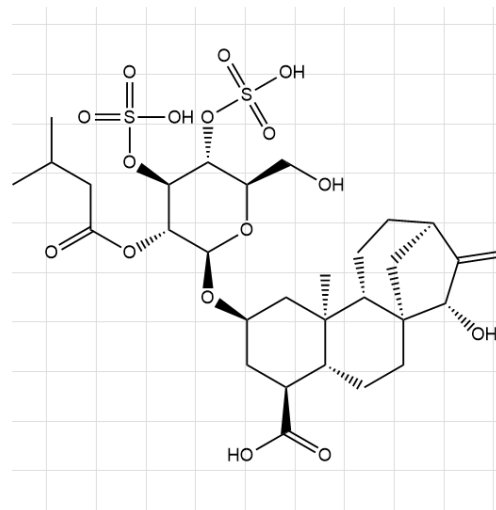
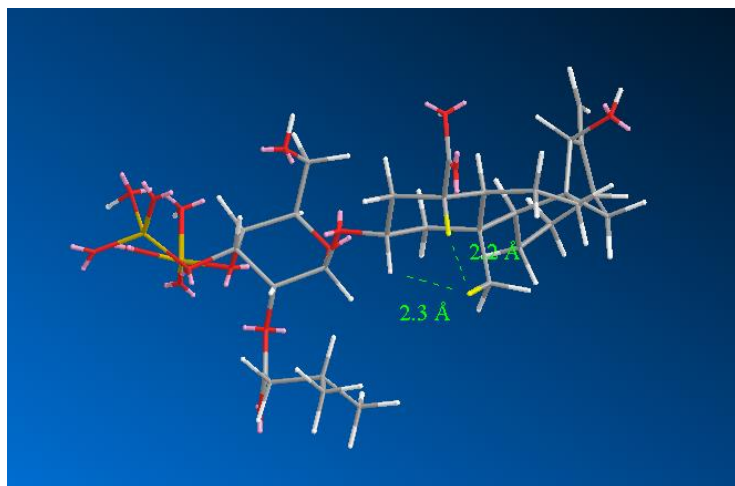


Abbildung 98 Dreidimensionales Modell des ATR-Grundkörpers inkl. dazugehöriger Bindungslängen zwischen CH₃-20 und H-2 (2,3 Å) und zwischen CH₃-20 und H-4 (2,2 Å) bei S Konfiguration an C-4. In **grau** dargestellt ist das Kohlenstoffgrundgerüst, in weiß sind Protonen, **rot** Sauerstoff, **pink** die freien Elektronen und **gelb** Schwefelatome dargestellt.

Zwischen H-2 und CH₃-20 liegt im gemessenen ROE-Spektrum ein Kreuzsignal (Abbildung 99 und Abbildung 100) vor, jedoch keine in vergleichbarer Intensität zwischen H-4 und CH₃-20 (Abbildungen 99 und 101). Im Fall einer S-Konfiguration an C-4, sollte sowohl zwischen H-2 und CH₃-20, als auch zwischen H-4 und CH₃-20 eine Interaktion im ROE-Spektrum gleicher Intensität vorliegen, da es sich in beiden Fällen um eine *cis*-Stellung handelt.

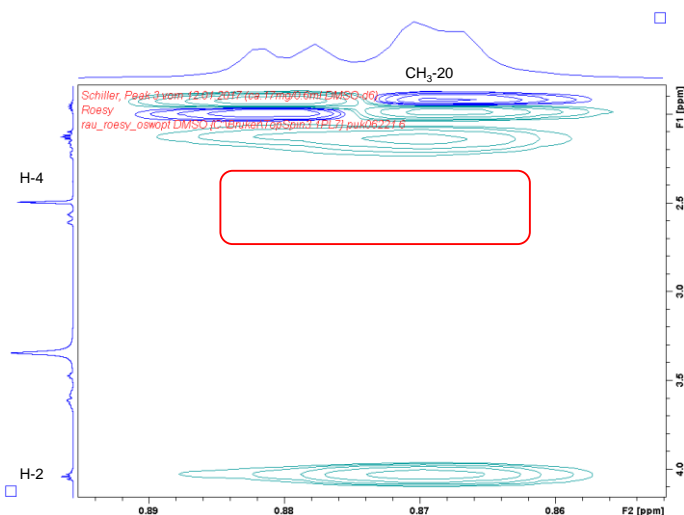


Abbildung 99 Ausschnitt aus dem NOE-Spektrum des Isolates; Kreuzsignal zwischen CH₃-20 und H-2 und fehlendes Kreuzsignal zwischen CH₃-20 und H-4.

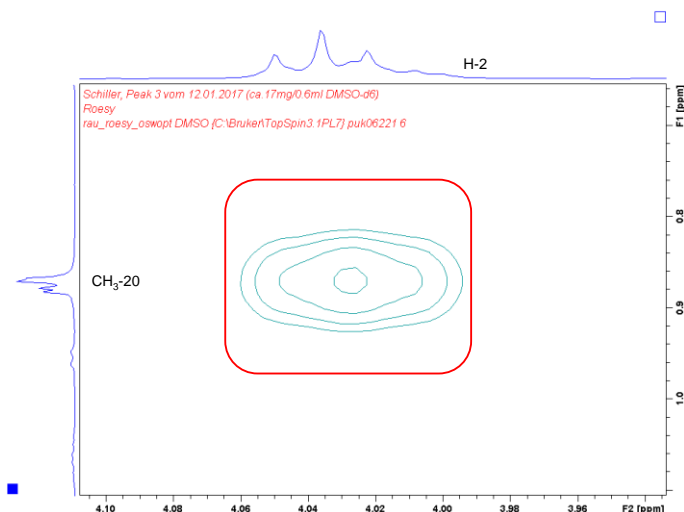


Abbildung 100 Ausschnitt aus dem NOE-Spektrum des Isolates mit einem Kreuzsignal zwischen CH₃-20 und H-2.

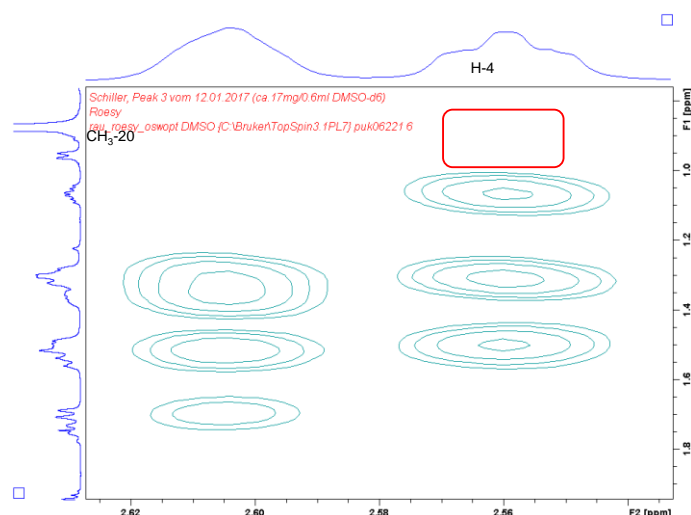


Abbildung 101 Ausschnitt aus dem NOE-Spektrum des Isolates mit einem fehlenden Kreuzsignal zwischen CH₃-20 und H-4.

Nach Analyse des NOE-Spektrums konnte in Bezug auf C-4, die in der Literatur postulierte Stereochemie bestätigt werden (Brucoli et al., **2012**).

Unter zu Hilfenahme der TopSpin Software sollte das theoretische Aufspaltungsmuster im ¹H-Spektrum für H-4 unter Berücksichtigung des Spinsystems von H-3 und H-5 berechnet, dargestellt und mit dem tatsächlichem ¹H-Spektrum per Overlay verglichen werden. Dafür wurden der Software die jeweiligen Verschiebungen, inklusive der Kopplungskonstanten *J*, abgeschätzt mit Hilfe der Bindungswinkel unter Zuhilfenahme der Karplus-Kurve (Hesse et al., **2016**) vorgegeben, um ein theoretisches Aufspaltungsmuster zu berechnen und darzustellen. Abbildung 102 zeigt das berechnete ¹H-Spektrum mit ähnlichem Aufspaltungsmuster für H-4 (2,56 ppm) und kann somit als weiteres Argument für die angegebene Stereochemie am C4 angegeben werden.

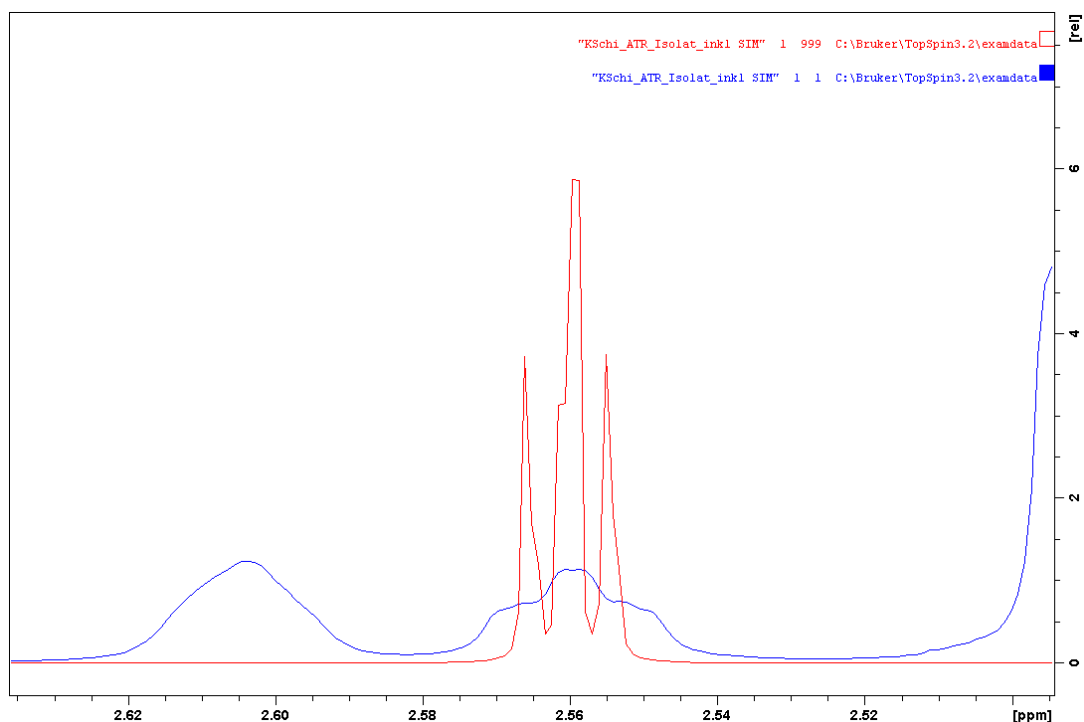


Abbildung 102 Overlay des gemessenen ¹H-Spektrums (blau) mit einem simuliertem ¹H-Spektrum (rot).

Die ESI-HRMS Messung ergab einen Wert von m/z 725,2150 [M-H]⁻. Nach Datenbankabgleich wurde die Summenformel von C₃₀H₄₆O₁₆S₂, die der dem ATR entspricht, mit einem Score von 99,08 vorgeschlagen.

Das Isolat zeigte ein $[\alpha]_{589}^{24}$ von -45,9 (1,0; H₂O), was in einem vergleichbaren Bereich mit den Literaturangaben (Brucoli et al., **2012**) liegt.

In Hinblick auf die erhobenen Daten per MS, NMR und Polarimetrie konnte abschließend die Identität des Atractylosids bestätigt werden. Per HPLC/DAD wurde zusätzlich die Reinheit (94,35%) des Diterpens nach der Normalisierungsmethode (Abbildung 103) bestimmt.

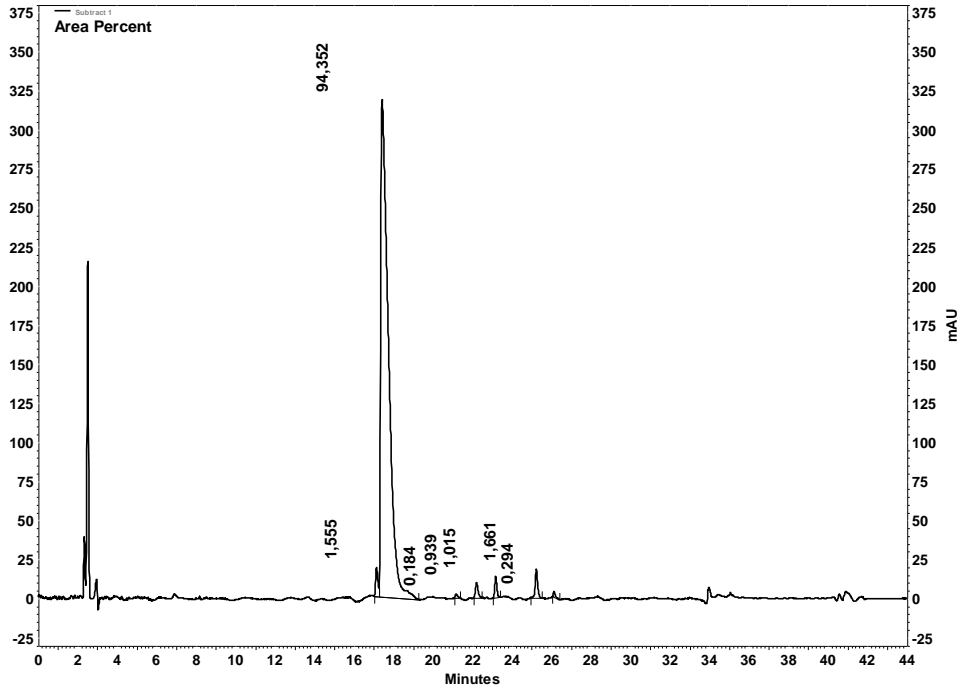


Abbildung 103 Chromatogramm (Maxplot) zur Reinheitsbestimmung des Isolates.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Isolierung des Diterpens ATR aus einem methanolischem Extrakt (Methanol 70% V/V) der Sibirischen Spitzklettenfrucht in drei Schritten (Abbildung 104) gelungen ist.

Basierend darauf, konnten sowohl die *in vitro* Testungen (Kapitel 4.4) als auch die Methodenentwicklung für die Reinheitsbestimmung auf ATR im Extrakt (Kapitel 4.2.3.3) vorgenommen werden.

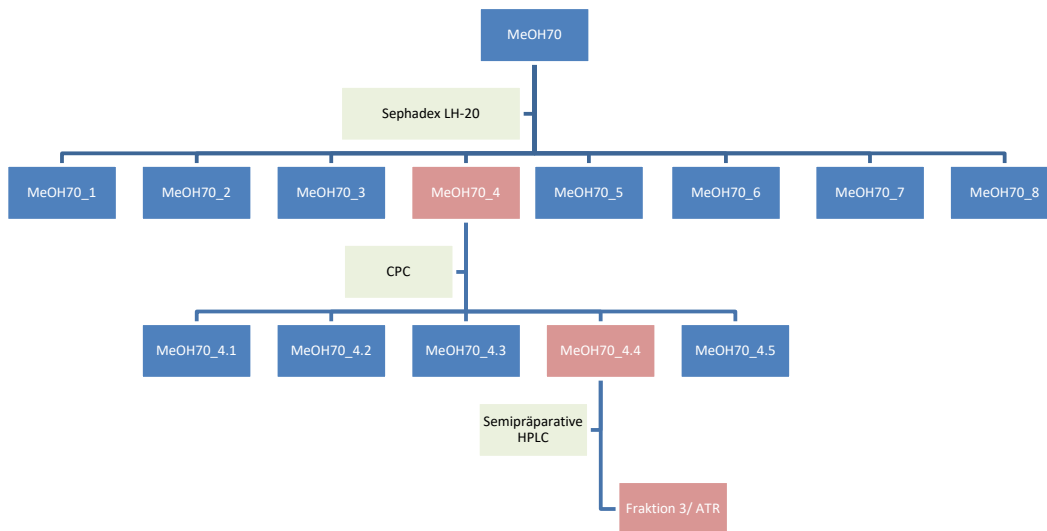


Abbildung 104 Flussdiagramm zur Isolierung von Atractylosid aus einem methanolischen 70% (V/V) Xanthii fructus Extrakt.

4.4 Zellbiologische *in-vitro* Testungen

4.4.1 Einleitung

Seit dem ChP 2015 werden in den Xanthii fructus Monographien die beiden Diterpene CATR und ATR in ihrem Gehalt limitiert. Für CATR wird in der Rohdroge ein Maximalgehalt von 0,35% gefordert. Für ATR gibt das ChP 2015 für die „processed“ Droge eine Spanne von 0,1 bis 0,3%, bezogen auf die getrocknete Droge, vor (Xanthii Fructus, **2015**). Nach der (Chinese Herbal Medicine: Materia Medica, **2004**) liegt die therapeutische Dosis des Drogenmaterials bei 3-9 g. Eine Überdosis kann zu Erbrechen, Abdominalschmerzen und Diarrhö führen. Toxische Reaktionen können bei Erwachsenen bei einer Einnahme von mehr als 30 g auftreten. Neben oben genannten Symptomen kann es zu Bewusstseinsverlust, Arrhythmien, Leber- oder Nierenversagen und Atemstillstand kommen. (Chinese Herbal Medicine: Materia Medica, **2004**) Aus diesem Grund soll von Einnahmen großer Mengen Xanthii fructus, vor allem der Rohdroge, abgesehen werden, wohingegen die Einnahme der gerösteten Droge als weniger bedenklich bzw. toxisch gilt (Chinese Herbal Medicine: Materia Medica, **2004**; Su et al., **2016**). Grund dafür kann sein, dass durch den Röstvorgang („processing“) der Anteil an CATR in der Droge ab- und die Menge an ATR zunimmt (Nikles et al., **2015**). Beide Diterpene gelten als Inhibitoren des mitochondrialen ADP/ATP Transportsystem entlang der mitochondrialen Membran (Dahout-Gonzalez et al., **2006**) und werden für die toxische, v.a. hepatotoxische Wirkung der Droge verantwortlich gemacht (Cole et al., **1980**; Wang et al., **2011**; Xue et al., **2014**). Man geht davon aus, dass CATR toxischer ist als ATR (Carpenedo et al., **1974**; Luciani et al., **1978**; Luciani et al., **1971**; Weil, **1952**).

ATR wurde erstmals aus dem Rhizom von *Atractylis gummifera* isoliert (Lefranc, **1868**). CATR konnte zum ersten Mal ebenfalls aus *Atractylis gummifera* (Stanislas and Vignais, **1964**) als Gummiferin isoliert und im Anschluss als Carboxyatractylosid beschrieben und identifiziert werden (Danieli et al., **1972**, **1971**; Defaye et al; Luciani et al., **1978**).

Die beiden Diterpene ATR und CATR sind Inhibitoren (ATR kompetitiv, CATR nicht kompetitiv) des mitochondrialen ADP/ATP Transportsystemes und interagieren dabei mit dem ADP/ATP-Translokator, der auch Adeninnucleotid-Translokase genannt wird (Chappell and Crofts, **1965**; Dahout-Gonzalez et al., **2006**; Duee and Vignais, **1965**; Klingenberg and Pfaff, **1966**; Pebay-Peyroula et al., **2003**; Pfaff et al., **1965**; Santi, **1958**; Vignais et al., **1973**; Vignais et al., **1971**; Voet et al., **2010**).

Die Aufgabe des in der inneren mitochondrialen Membran befindlichen ADP/ATP-Translokators besteht im Transport des durch oxidative Phosphorylierung gebildeten ATPs aus der Matrix. Im Gegenzug dazu wird ADP aus dem Cytosol in die Matrix transportiert. (Voet et al., **2010**)

Durch die Hemmung dieses Transporters kommt es zur Störung einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen, wie der oxidativen Phosphorylierung und des Citratzyklus. Unter Umständen kann es zu einer Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore kommen, die wiederum zur erhöhten Durchlässigkeit der Membran führt. Proteine wie beispielsweise das Cytochrom C gelangen vom Mitochondrium in das Cytosol und führen unter Umständen zum Zelltod. (Haouzi et al., **2002**; Kantrow and Piantadosi, **1997**; Kholodenko et al., **1987**; Quintanilla et al., **1979**; Vancompernelle et al., **1998**)

In folgenden Versuchen soll die Wirkung der beiden Diterpene und speziell angefertigter Dekokte, wie sie in der TCM Praxis als beliebteste Zubereitungsart (Chinesische Pharmakologie I, **2012**) Anwendung finden, *in vitro* evaluiert werden. Das zugrundeliegende Modell ist ein MTT-assay, durchgeführt an zwei unterschiedlichen humanen Hepatomzelllinien, Huh7 und HepG2 und einer Zervixkarzinomzelllinie (HeLa).

4.4.2 Material und Methoden

4.4.2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Kulturmedien und sonstige Lösungen

Die in den folgenden Tabellen (Tabellen 111-114) aufgeführten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Kulturmedien und sonstige Lösungen wurden im Rahmen der zellbiologischen Testungen eingesetzt.

Tabelle 111 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die *in vitro* Testung.

Bezeichnung	Spezifizierung (ggf. Bestellnummer)	Hersteller
DMEM	Gibco, Dulbecco's Modified Eagle Medium, [+] 4.5 g/L D-Glucose, L Glutamine, [-] Pyruvate (FG 0415)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Falcon tubes	15 ml, 50 ml	Greiner, Frickenhausen (Deutschland)
FBS	FBS superior (S 0615)	Biochrom, Berlin (Deutschland)
Kryovials	2 ml	Greiner, Frickenhausen (Deutschland)
Kulturflaschen	25/75 cm ²	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
L-Glutamin	L-Glutamine 200 mM, low endotoxin (K 0283)	Biochrom, Berlin (Deutschland)
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (M2128)	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Pasteurpipetten (Glas)	230 mm	VWR, Darmstadt (Deutschland)

PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D8537)	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Pipetten, serologische	5, 10, 25 ml (steril)	Greiner, Frickenhausen (Deutschland)
Pipettenspitzen	0,5, 10, 100,1000 µl	Kinesis, Lengenfeld (Deutschland) Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Reaktionsgefäße	Eppendorf Tubes 3810X (1,5 ml) Eppendorf Tubes (5,0 ml)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
RPMI 1640 Medium	w 2.0 g/L NaHCO ₃ , w/o L-Glutamine, low endotoxin (F 1215)	Biochrom, Berlin (Deutschland)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (L5750)	Sigma-Aldrich, Darmstadt (Deutschland)
Testplatten	96-well	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Trypanblau	Trypane blue (T-0887)	Sigma-Aldrich, Darmstadt (Deutschland)

Tabelle 112 Geräte für die *in vitro* Testungen.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Autoklav	Melag Autoklav 23 Varioklav 500	Melag Medizintechnik, Berlin (Deutschland) HP Medizintechnik, Oberschleißheim (Deutschland)
Hämozytometer	C-Chip, DHC-N01	NanoEnTek, Inc., Waltham (USA)
Inkubator	AutoFlow IR Direct Heat, NU-5500 E T=37 °C, CO ₂ =5%	Integra Biosciences GmbH, Fernwald (Deutschland)
Mikroskop	CKX41SF	Olympus, Hamburg (Deutschland)
Pipetten	2,5 research (0,1-2,5 µl) 10 reference (2,5-10 µl) 100 research (10-100 µl) 1000 reference(100-1000 µl) 5 research plus (0,5-5 ml) 100 12-multichannel research (10-100 µl)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Pipettor	Accu jet pro	Brand, Wertheim (Deutschland)
Plattenlesegerät	SpectraFluor Plus, Xfluor4 V 4.40 Software	Tecan, Crailsheim (Deutschland)
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure, Bodenheim (Deutschland)
Sicherheitswerkbänke	HERASafeKS	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Trockenschrank	Tv50ul 770169	Memmert, Schwabach (Deutschland)
Ultraschallbad	USC-TH1700 (480W/240W)	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Wasser für Injektionszwecke	Wasser für Injektionszwecke Aqua ad iniectabilia Ph.Eur.	Bayer, Leverkusen (Deutschland)
Wasserbad	WB 22	Memmert, Schwabach (Deutschland)
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R Sepatech	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Tabelle 113 Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien.

Bezeichnung	Bestandteile, Zusammensetzung
Kulturmedium für HepG2-Zellen	RPMI 1640 Medium 500 ml 10% FCS _{hi} Glutamin 5 ml
Kulturmedium für Huh-7 und HeLa-Zellen	DMEM 10% FCS _{hi}
Wegfriermedium	70% DMEM 20% FCS _{hi} 10% DMSO

Tabelle 114 Zusammensetzung sonstiger verwendeter Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
MTT-Reagenz	4 mg/ml MTT in PBS, sterilfiltriert
SDS-Lösung	10% (m/V) in Reinstwasser, sterilfiltriert
Trypanblau-Lösung	0,4% (m/V) Trypanblau in PBS, sterilfiltriert
Trypsin/EDTA-Lösung, verdünnt	10% (V/V) Trypsin/EDTA-Lösung in PBS

4.4.2.2 Zelllinien

Huh7-Zellen

Die menschliche Hepatom-Zelllinie Huh7 wurde von der Health Science Research Recourses Bank (HSRRB) der Japan Health Sciences Foundation erworben.

Um einen Mycoplasmenbefall auszuschließen, wurden die Zellen im Vorfeld getestet (Mycoplasmacheck, GATC Biotech, Konstanz, Deutschland).

Tabelle 115 Charakterisierung der verwendeten Huh7-Zellen.

Zellname	Gewebe	Charakterisierung	Herkunft	Zellbank	Zellnummer
Huh7	Leber	Hepatom	Mensch	OUCI (JCRB)	JCRB0403

HepG2-Zellen

Die menschliche Hepatom-Zelllinie HepG2 wurde über das Leibniz-Institut (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen.

Tabelle 116 Charakterisierung der verwendeten HepG2-Zellen

Zellname	Gewebe	Charakterisierung	Herkunft	Zellbank	Zellnummer
HepG2	Leber	Hepatom	Mensch	DSMZ	ACC 180

HeLa-Zellen

Die menschliche Zervixkarzinom-Zelllinie wurde freundlicherweise vom Arbeitskreis Prof. Dr. Joachim Wegener (Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik; Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt.

4.4.2.3 Getestete Substanzen und Extrakte

Tabelle 117 Reinsubstanzen und Extrakte inklusive der getesteten Konzentrationen.

Probe/ Verbindung	Herkunft/Herstellung und getestete Konzentrationen
ATR	Isolat (Kapitel 4.3) c \triangleq 25/50/100/250/500 μ M
CATR	Carboxyatractyloside potassium salt (Sigma-Aldrich, Darmstadt (Deutschland), Artikelnummer: C4992; Chargennummer: 096M4766V), auch Tabelle 54, Kapitel 4.2.1. c \triangleq 25/50/100/250/500 μ M
Dekokt Droge	10 g ganze Droge (<i>Xanthii fructus</i> , <i>Xanthium sibiricum</i> PATR., Ch.-B.: 150801H164, Vorbehandlung: <i>chaocangerzi</i>) der Firma Herbasinica werden mit 60 ml Wasser (Leitungswasser) versetzt und 60 min bei Raumtemperatur mazeriert. Nach erstem Aufkochen, auf einer Heizplatte, wird die Wärmezufuhr reduziert und der Extrakt während 20 min unter Sieden auf der Heizplatte belassen. Der erste Extrakt wird abgeseiht und die Extraktion mit 50 ml Leitungswasser wiederholt. Die vereinigten Extrakte werden gefriergetrocknet und bis zum Gebrauch kühl und unter Lichtausschluss aufbewahrt; m (Extrakt nach Gefriertrocknung)=0,65 g. c \triangleq 100/250/500/750 μ g/ml
Dekokt Pulver	Analog Dekokt Droge \rightarrow ausgenommen der Ausgangssubstanz 10 g pulverisierte (500 μ m) Droge (<i>Xanthii fructus</i> , <i>Xanthium sibiricum</i> PATR., Ch.-B.: 150801H164, Vorbehandlung: <i>chaocangerzi</i>); m (Extrakt nach Gefriertrocknung)=0,98 g c \triangleq 100/250/500/750 μ g/ml

4.4.2.4 Allgemeine Behandlung der Zellen

Kultivierung und Passagieren der Zellen

Die Zelllinien (HepG2-/HeLa- und Huh-7) wurden im Inkubator unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Um die konfluent gewachsenen Zellen zu passagieren, wurde zunächst das Medium abgesaugt und diese mit PBS (5 ml) gewaschen. Nach Entfernen des Puffers sollten durch Zugabe einer verdünnten Trypsin/EDTA-Lösung (2 ml) und Aufbewahrung der Zellen für 2-3 min im Inkubator die Zellen abgelöst werden. Nach Zugabe von frischem Medium (8 ml) wurden die Zellen resuspendiert, in ein Zentrifugenröhrchen/Falcon überführt und abzentrifugiert (700 rpm, 3 min, 21 °C). Der Überstand wurde entfernt und der Zellkuchen im Medium suspendiert. Je nach Wachstum wurde ein Aliquot der Zellsuspension (meist: 1 ml aus 5 ml Zellsuspension → Splittverhältnis 1:5) in eine neue Kulturflasche mit Medium überführt und im Inkubator aufbewahrt. Der Zustand der Zellen und das Wachstum wurden regelmäßig mikroskopisch kontrolliert.

Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zur Lagerung der Zellen wurden diese zunächst in einer Kulturflasche bei Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) bis zur Konfluenz wachsen gelassen und anschließend, analog zum Passagieren der Zellen, mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, das überschüssige Medium entfernt und in Wegfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in Portionen von 2 ml in Kryovials abgefüllt. Pro Vial waren 1,0-1,5x10⁶ Zellen enthalten. Zunächst wurden die Aliquots in einer Styroporbox bei -80 °C eingefroren und nach 24 h zur Lagerung in flüssigem Stickstoff in einen Dewer überführt.

Nach Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff, wurden diese zunächst bei 37 °C aufgetaut, mit Kulturmedium verdünnt und abzentrifugiert um das Wegfriermedium zu entfernen. Unter Resuspendierung mit Kulturmedium wurden die Zellen in eine Kulturflasche zur weiteren Kultivierung überführt.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt. Ausgehend von dieser Suspension wurde per Hämozytometer, durch Auszählen der vier Quadranten und Berechnung nach Formel 40 die Zellzahl/ml bestimmt.

Formel 40 Berechnung der Zellzahl pro ml nach Auszählen mit Hilfe eines Hämozytometers.

$$\frac{\text{Summe der Zellzahl aus den vier Feldern} * 2 * 10000}{4}$$

4

In den Experimenten wurden jeweils 100 µl/well an Zellsuspension in die 96-well Platten ausgesät. In Vorversuchen sollte die optimale Zellzahl für die drei Zelllinien bestimmt werden. Tabelle 118 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen.

Tabelle 118 In den *in vitro* Versuchen verwendete Zellzahlen.

Zelllinie	Zellzahl pro ml	Zellzahl pro well
HeLa	8×10^4	8×10^3
HepG2	$3,5 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$
Huh-7	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$

Herstellung der Stammlösungen und Verdünnungen

Die Stammlösungen wurden mit Wasser für Injektionszwecke, in einer Konzentration von 1 mM (Reinsubstanzen) bzw. 1 mg/ml (Dekokte), hergestellt und bei -20 °C gelagert. Die Verdünnungen, wurden mit Hilfe des Kulturmediums, gemäß der gewünschten Endkonzentration (Tabelle 117) jeweils frisch hergestellt.

4.4.2.5 MTT-Assay

Versuchsdurchführung

Bei der Durchführung des MTT-Assays handelt es sich um eine modifizierte Vorgehensweise nach (Mosmann, **1983**), wie sie in Abbildung 105 dargestellt ist. Dabei wurden in 96-well Platten 100 µl der Zellsuspension von Huh7-/HepG- und HeLa-Zellen, ausgesät. Nach einer 24-stündigen Wachstumsphase bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator, wurde altes Medium abgesaugt und die Zellen für weitere 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (100 µl) der zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde im Anschluss das frisch zubereitete MTT-Reagenz auf die Zellen aufgebracht. Es folgte eine Inkubation für drei Stunden unter Standardbedingungen im Inkubator. Im Anschluss wurde die MTT-Lösung abgesaugt und durch eine 10%ige SDS-Lösung ersetzt. Nach Lagerung der Platte unter Lichtausschluss über Nacht, wurde die Absorption bei 560 nm am Plattenlesegerät photometrisch vermessen. Als Kontrolle, bzw. 100%-Wert dienten unbehandelte Zellen, die nur mit Kulturmedium inkubiert wurden. Die gemessene Absorption der behandelten Zellen wurde in prozentualer Relation zu den Absorptionswerten der unbehandelten Zellen angegeben und in prozentualer Viabilität (Viabilität/Restaktivität [% von Kontrolle]) dargestellt. Die Tests wurden jeweils in Hexaplikaten und in vier bzw. fünf unabhängigen (n=4 bzw. 5) Versuchen durchgeführt.

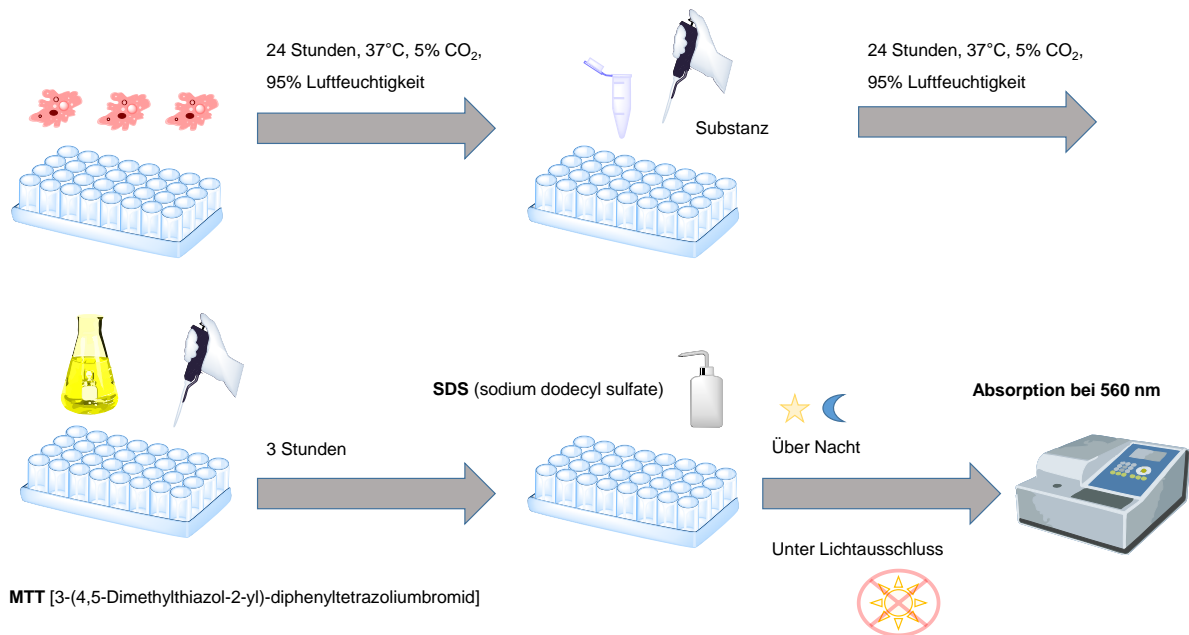


Abbildung 105 Versuchsablauf des durchgeführten MTT-Assays modifiziert nach (Mosmann, 1983), Graphik mit Hilfe der ChemDraw Professional Software (16.0.0.82), Bielefeld (Deutschland) und Microsoft Power Point 2013 erstellt.

Versuchsprinzip (Berridge et al; Berridge and Tan, 1993; Mosmann, 1983)

Mit Hilfe des MTT-Assays soll die mitochondriale Aktivität gemessen und somit auf toxische Einflüsse von Substanzen auf Zellen in verwendetem System rückgeschlossen werden. Dem Versuch zugrunde liegt die Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT durch die Oxidation u.a. von NAD(P)H oder Succinat zum blaugefärbten und schlecht löslichem Formazan unter Spaltung des Tetrazoliumringes (Abbildung 106). Durch die Zugabe von SDS werden die Zellen aufgelöst, Formazan geht in Lösung und kann somit photometrisch (560 nm) vermessen werden. Da MTT nur von lebenden, metabolisch aktiven Zellen reduziert wird und die gebildete Formazanmenge dem proportional ist, wird davon ausgegangen, dass der Assay die Zahl und Aktivität lebender, bzw. mitochondrial aktiver Zellen wiedergibt. Nach (Berridge et al.) gibt dieser Assay jedoch nicht direkt die Anzahl lebensfähiger Zellen wieder, sondern vielmehr eine Gesamtheit an Enzym-katalysierten, die in vielerlei Möglichkeiten mit dem Zellmetabolismus in Verbindung stehen. Dies sollte in der Aus- und Bewertung der Daten berücksichtigt werden.

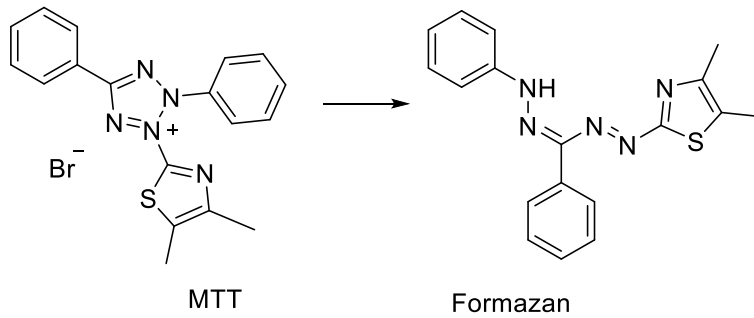


Abbildung 106 Reduktion des gelbgefärbten Tetrazoliumsalses MTT zum blau gefärbten Formazan.

4.4.2.6 Statistik und Auswertung

Die Ergebnisse aus den zellulären Testungen sind als $MW \pm StabW$ angegeben. Die Versuche wurden mindestens in vier unabhängigen Versuchen ($n=4$) in Hexaplikaten durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte gemäß Abbildung 107 mit Hilfe der IBM SPSS Statistics 25 Software (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland). Die Daten wurden ungeachtet der Normalverteilung getestet, da eine ANOVA als robust gegenüber der Verletzung dieser Annahme erachtet wird (Schmider et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurden die Daten je nach Varianzenhomogenität bzw. Inhomogenität per einfaktorieller ANOVA und Bonferroni Post-Hoc Test bzw. Kruskal-Wallis-Test (paarweiser Vergleich) auf Signifikanz untersucht (Signifikanzlevel: $*p<0,05$ signifikant, $**p<0,01$ sehr signifikant, $***p<0,001$ hochsignifikant). Die Daten wurden graphisch per Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Washington, USA) ausgewertet und dargestellt.

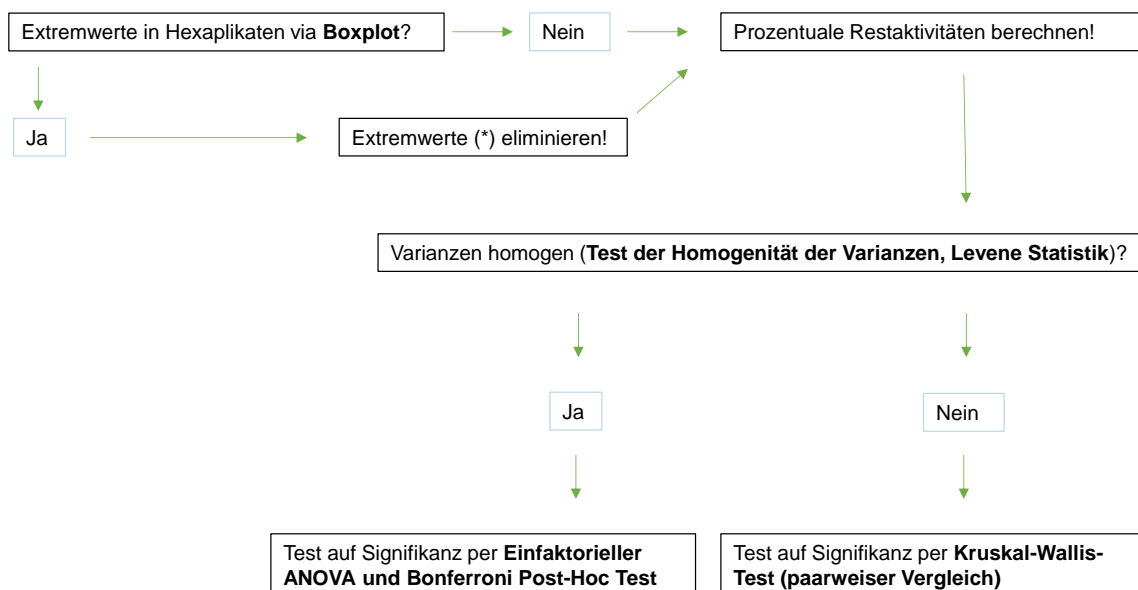


Abbildung 107 Flussdiagramm zur statistischen Auswertung der Daten aus den *in vitro* Testungen.

4.4.3 Ergebnisse und Diskussion

Die mitochondriale (Rest-) Aktivität bzw. Viabilität der Zellen wurde in nachfolgenden Graphiken nach Durchführung des unter 4.4.2.5 beschriebenen MTT-Assays dargestellt. Ziel der Versuche war es, zusätzlich zu den analytischen Untersuchungen zu *Xanthii fructus*, eine Reaktion der unterschiedlichen Zelltypen, sowohl Hepatom, als auch Zervixkarzinom, zu evaluieren und eine Relation der Wirkung der beiden Diterpene bzw. Dekokte experimentell zu ermitteln.

Bei allen vier untersuchten Substraten (CATR, ATR, Dekokt Droge und Pulver) konnte durchgängig eine mehr oder weniger starke, konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität beobachtet werden. Bei der Testung des ATRs (Abbildung 108) konnte nach einer Behandlung der Zellen mit der höchsten Konzentration (500 μM) in allen drei Zelllinien eine hochsignifikante (36,4% mit HepG2-Zellen und 31,5% mit Huh7-Zellen) bzw. sehr signifikante (40,5% mit HeLa-Zellen) Abnahme der Zellviabilität, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, gemessen werden.

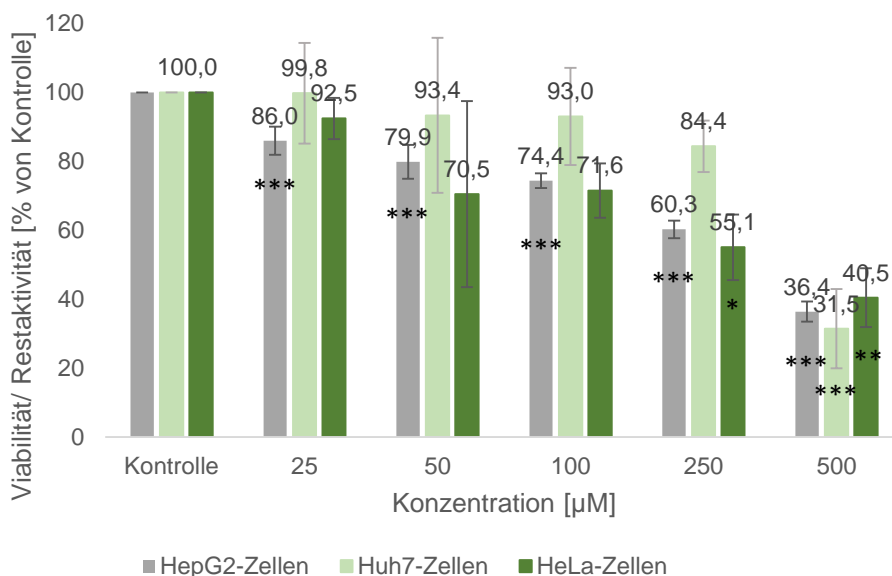


Abbildung 108 Ergebnisse der Testung von Atractylosid im MTT-assay mit **HepG2-Zellen** (grau), **Huh7-Zellen** (hellgrün) und **HeLa-Zellen** (dunkelgrün), angegeben in MW \pm StabW in prozentualer Relation zu unbehandelten Zellen (\pm 100% Kontrolle). Das Experiment wurde in Hexaplikaten durchgeführt und fünfmal (Huh7-Zellen) bzw. viermal (HepG2-Zellen, HeLa-Zellen) unabhängig voneinander wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Abbildung 107. Signifikanzniveaus: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

Nach der Testung der Zellen mit CATR kam es in einem Konzentrationsbereich von 25-500 μM (Abbildung 109) zu einer weniger starken Abnahme der Zellviabilität. Die Ergebnisse liegen nach Inkubation mit der höchsten Konzentration an CATR (500 μM) mit 60,2% bzw. 45,3% Viabilität in einem sehr signifikanten (Huh7-Zellen und HepG2-Zellen) und mit 37,8% in einem signifikanten (HeLa-Zellen) Bereich.

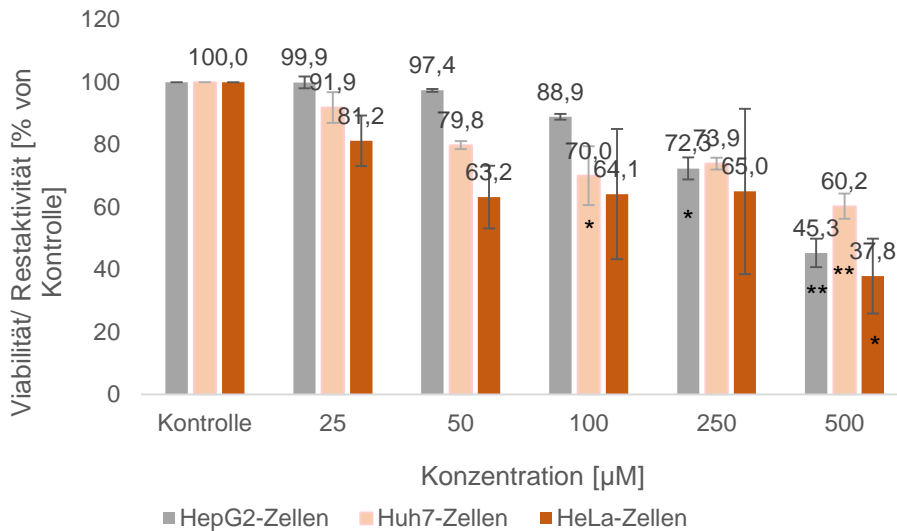


Abbildung 109 Ergebnisse der Testung von Carboxyatractylosid im MTT-assay mit **HepG2-Zellen** (grau), **Huh7-Zellen** (beige) und **HeLa-Zellen** (braun), angegeben in MW \pm StabW in prozentualer Relation zu unbehandelten Zellen (\pm 100% Kontrolle). Das Experiment wurde in Hexaplikaten durchgeführt und viermal unabhängig voneinander wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Abbildung 107. Signifikanzniveaus: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

Im Gegensatz zu den dargestellten Ergebnissen wurde aufgrund von Literaturdaten eine weitaus stärkere Viabilitätshemmung durch CATR als durch ATR erwartet. Nach intraperitonealer Injektion von unterschiedlichen Dosen der Diterpene in Mäuse wurde ein LD₅₀-Wert für CATR von 10,7 mg/kg und für ATR von 124 mg/kg ermittelt (Luciani et al., 1971). Der LD₅₀-Wert für CATR nach subkutaner Injektion in Ratten liegt bei 5,3 mg/kg und für ATR bei 155 mg/kg (Luciani et al., 1978). Nach Versuchen von (Wang et al., 2011), bezugnehmend auf die Hepatotoxizität in Mäusen, wurden die beiden Diterpene für fünf Tage in unterschiedlichen Konzentrationen (in Anlehnung an Daten aus früheren Arbeiten mit LD₅₀ für CATR von 203,5 mg/kg und LD₅₀ für ATR von 398,3 mg/kg in Mäusen i.p.) intraperitoneal in Mäuse injiziert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über histopathologische Beobachtungen und der Untersuchung von biochemischen Parametern wie ALT, AST, CAT oder GSH. Nach histologischer Auswertung konnten keine Schädigungen in Lunge, Herz, Milz, Niere und dem zentralen Nervensystem gefunden werden. Verletzungen der Leber waren, indiziert durch beide Diterpene, in ähnlichem Ausmaß, deutlich zu erkennen. ALT und AST Aktivitäten waren erhöht, wohingegen die Aktivität der biologischen Parameter CAT und GSH signifikant reduziert waren. In Anbetracht der Tatsache, dass in Tumorzellen die mitochondriale Aktivität herabgesetzt bzw. der ADP/ATP Transport verlangsamt ist (Dahout-Gonzalez et al., 2006; Knowles, 1984; Obatomi and Bach, 1998), könnte man ausgehend von den Ergebnissen aus den Hepatom-/bzw. Zervixkarzinomzellversuchen hypothetisch eine deutlichere Viabilitätshemmung in gesunden menschlichen Leberzell(mitochondrien) erwarten. Testungen von ATR und CATR an Leberzellen (L-02, BRL) im MTT-Assay (100 $\mu\text{mol/L}$ für 48 Stunden) zeigten nach (Xue et al., 2014) aber ebenso eine verhaltene

Reduktion der Viabilität in einem vergleichbaren Maße (CATR und ATR jeweils über 50% Restviabilität), was den Ergebnissen aus durchgeführten Ergebnissen zumindest nicht widersprach. Die Testung des wässrigen Extraktes aus *Xanthii fructus* (1 kg Droge, 1 l Extraktionsmittel; DEV unbekannt) durch (Xue et al., **2014**) führte jedoch zu einer signifikanten Hemmung der Viabilität der Zellen (L-02-Zellen) auf 30,1% bzw. 40,8% (BRL-Zellen). Dieser Unterschied in den Ergebnissen zwischen Reinsubstanzen und Extrakt bzw. Dekokt konnte auch in durchgeführten Testungen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Die Testung von Dekokten des unpulverisierten Drogenmaterials (Dekokt Droge) führte, wie in Abbildung 110 dargestellt, in der höchstingesetzten Konzentration von 750 mg/ml zu einer sehr signifikanten Hemmung der Zellviabilität auf 41,0% (HepG2-Zellen), 14,2% (Huh7-Zellen) und 12,9% (HeLa-Zellen).

Da die Früchte der Sibirischen Spitzklettenfrucht eine sehr harte und widerstandsfähige Konsistenz besitzen (*Xanthii Fructus*, **2015**), sollte neben Extrakten des ungemahlene Drogenmaterials auch Extrakte des gemahlene Drogenmaterials untersucht werden. Inhaltsstoffe, die sich im Inneren der Frucht befinden und durch wässrige Extraktion unter Umständen nicht gelöst werden, könnten aufgrund der gemahlene Matrix besser extrahiert und so interessant für die *in vitro* Testung sein.

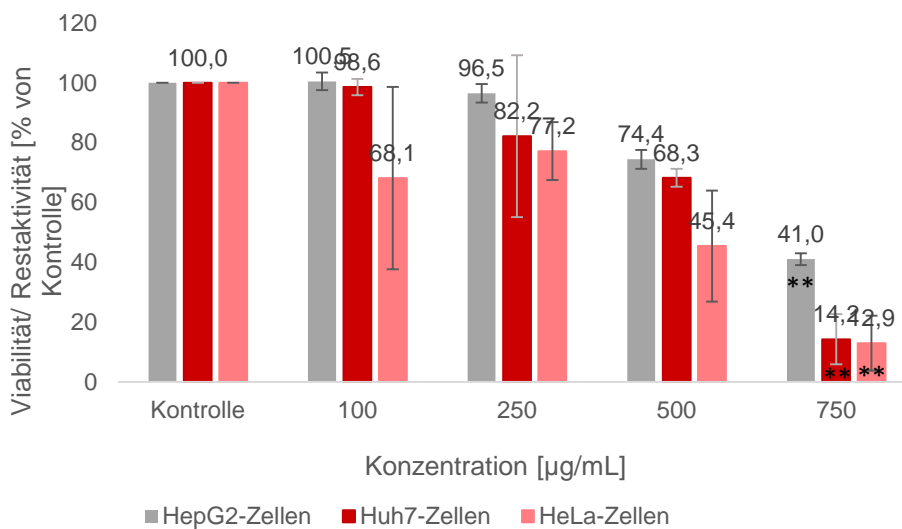


Abbildung 110 Ergebnisse der Testung der Probe Dekokt Droge im MTT-assay mit **HepG2-Zellen** (grau), **Huh7-Zellen** (rot) und **HeLa-Zellen** (rosa), angegeben in MW ± StabW in prozentualer Relation zu unbehandelten Zellen (± 100% Kontrolle). Das Experiment wurde in Hexaplikaten durchgeführt und viermal unabhängig voneinander wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Abbildung 107. Signifikanzniveaus: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

Durch die Testungen der wässrigen Extrakte aus pulverisiertem Drogenmaterial (500 µm, Dekokt Pulver) wurden deutlich stärkere Verluste der prozentualen Restaktivität verzeichnet. In der höchsten Konzentration (750 mg/ml) reduzierte der Dekokt (Abbildung 111) die Viabilität

auf 24,5% (HepG2-Zellen), hochsignifikante 6,4% (Huh7-Zellen) bzw. sehr signifikante 5,8% (HeLa-Zellen).

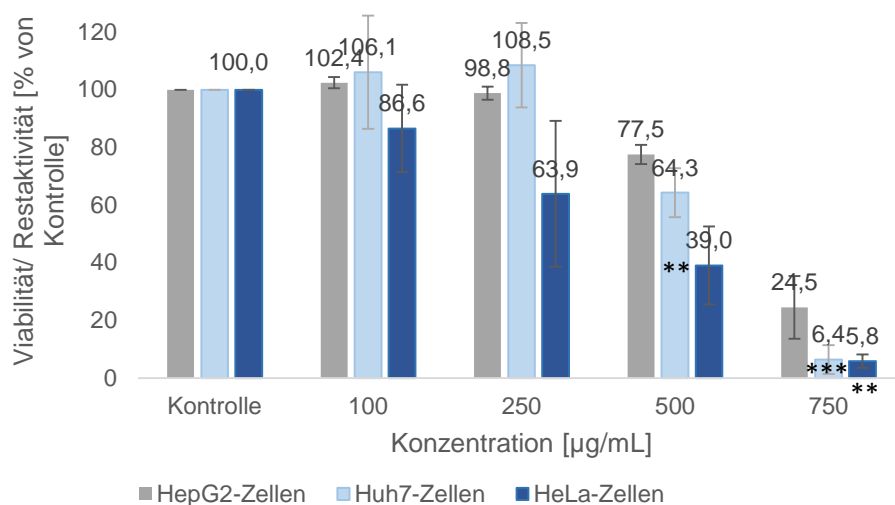


Abbildung 111 Ergebnisse der Testung der Probe Dekokt Pulver im MTT-assay mit HepG-Zellen (grau), Huh7-Zellen (hellblau) und HeLa-Zellen (dunkelblau), angegeben in MW \pm StabW in prozentualer Relation zu unbehandelten Zellen (\pm 100% Kontrolle). Das Experiment wurde in Hexaplikaten durchgeführt und viermal unabhängig voneinander wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Abbildung 107. Signifikanzniveaus: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

Ähnliche Ergebnisse wurden durch (Popat et al., 2002) unter Verwendung eines *Callilepis laureola* (*Impila*) Extraktes und reinem ATR, welches ebenfalls in dem Extrakt enthalten sein soll (Cheeke, 1989), ermittelt. Der getestete wässrige *Callilepis laureola* Extrakt (10 mg/ml) führte *in vitro* (MTT-Assay, HepG2-Zellen) nach 3, 4, 5 und 6 Stunden zu einer signifikanten Toxizität (100% Viabilität der Zellen wurde als 0% Toxizität definiert) und nach 3 Stunden zu einer maximalen und signifikanten Verminderung des GSH Gehaltes (Tietz-Assay, HepG2-Zellen). Im Gegensatz dazu wurden HepG2-Zellen ebenso unterschiedlicher Konzentrationen von ATR (5 µm bis 5 mM, MTT-Assay) ausgesetzt und deren Zellviabilität gemessen. Nach einer 24-stündigen Inkubation hatte ATR in keiner der getesteten Konzentration einen signifikanten Effekt auf die mitochondriale Aktivität. Diese Ergebnisse ließen die Arbeitsgruppe vermuten, dass die Toxizität des Drogenmaterials nicht nur alleine durch ATR verursacht werden könnte.

Die Testung des Diterpens ATR im MTT-Assay in Konzentrationen von 33 ng/ml bis 3,3 mg/ml an Huh7-Zellen führte nach (Stewart and Steenkamp, 2000) ebenso zu keinerlei Verlust der Zellviabilität ($\geq 98\%$).

Zusammenfassend betrachtet konnten durch die getesteten Extrakte/Dekokte eine stärkere Hemmung der Zellviabilität erreicht werden, als durch die getesteten Reinsubstanzen. Die Unterschiede in der *in vitro* Reaktion der Reinsubstanzen waren invers und deutlich geringer als nach der teilweise dargestellten (v.a. *in vivo*) Datenlage in der Literatur erwartet. Im Rahmen der Erarbeitung eines Monographieentwurfes sollte demnach nicht nur eine der

beiden Substanzen quantifiziert bzw. limitiert sein, sondern CATR und ATR. Die Abnahme der konzentrationsabhängigen Zellviabilität verlief bei allen getesteten Zelllinien, sowohl HepG2-, Huh7- als auch HeLa in einem vergleichbaren Maße.

Auch wenn es sich beim MTT-Assay um ein sehr unspezifisches Testsystem handelt und die Ergebnisse nicht als direkter Indikator für Toxizität verstanden werden dürfen, kann dennoch eine Tendenz abgeleitet werden. Ausgehend von dargestellter Datenlage kann einerseits hinterfragt werden, ob die belegte Toxizität der Pflanze (Botha et al., **2014**; Cole et al., **1980**; Debetto, **1978**; Luciani et al., **1978**; Turgut et al., **2005**; Yu et al., **2013**), tatsächlich ausschließlich auf die beiden Diterpene zurückzuführen ist, aber auch andererseits bezweifelt werden, ob belegt durch die histologischen Befunde (Botha et al., **2014**; Turgut et al., **2005**; Wang et al., **2011**; Xue et al., **2014**) von einem anderen Toxizitätsmechanismus ausgegangen werden kann, der durch den durchgeführten MTT-Assay nicht abgedeckt wird. Eine durch Metaboliten und demnach im *in vitro* Testsystem nicht detektierbare Toxizität wäre ebenfalls denkbar.

Weiterhin zu berücksichtigen ist die Empfehlung zur Verminderung der Toxizität, das Drogenmaterial zu rösten (Xanthii Fructus, **2004**; Dharmananda; Körfers and Sun, **2009**; Su et al., **2016**). Bei dem durchgeführten Assay wurden ausschließlich processed oder geröstete Früchte verwendet. weiterführenden Versuchen wäre es notwendig, sowohl Rohdroge als auch geröstete Droge vergleichsweise zu testen und zudem das Portfolio der durchgeführten Zytoxizitätsassays zu erweitern.

5 Abschließende Zusammenfassung

Das wachsende Interesse und der aktuelle Zuspruch für pflanzliche Drogen aus dem Bereich der TCM führte dazu, dass im Oktober 2005 die DAB-Kommission den Beschluss fasste, dass für insgesamt 19 Drogen nationale Monographien erarbeitet werden sollten. Vorrangig wurde dabei toxikologisch bedenkliches Pflanzenmaterial, z.B. bei dem es zu Verwechslungen mit Aristolochiasäurehaltigen Drogen kommen könnte, ausgewählt. (DAB-Kommission: Monographien für TCM-Drogen, **2005**; Auszug des Protokolls der DAB-Kommission 2005, **2005**) Astragali radix, Coptidis rhizoma und Bupleuri radix zählten unter anderem zu der Liste an TCM-Drogen, die für die ersten Monographievorschläge ausgewählt wurden (Auszug des Protokolls der DAB-Kommission 2005, **2005**). Sechs Arzneidrogen wurden bereits in vorhergehenden Arbeiten an der Universität Regensburg (Brem, **2010**; Scherübl, **2014**) untersucht und als Monographievorschläge für das DAB eingereicht und implementiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das pflanzliche Drogenmaterial von Scrophulariae radix und Xanthii fructus qualitativen und quantitativen analytischen Untersuchungen, mit dem Ziel eines Monographievorschlages, unterzogen werden. Verwendung fand dabei verfügbares Drogenmaterial von TCM-Importeuren (z.B. Chinamedica, Sinophyto und Herbasinica) und im Falle von Scrophulariae radix, zusätzliches Drogenmaterial aus deutschem Versuchsanbau der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Heuberger et al., **2010**).

In den zu erarbeitenden Monographien setzt sich die Definition des Drogenmaterials aus der Stammpflanze, der Droge, bzw. deren Gewinnung und dem ermittelten Gehalt zusammen. Bei der Gewinnung der Droge, insbesondere dem „processing“ oder der Vorbehandlung, die auch mit einer Fermentation einhergehen kann, war es nicht uneingeschränkt möglich, die Vorschriften des ChP zu übernehmen. Angaben wie „dried in the sun or baked to be half-dried“ (Scrophulariae Radix, **2010**) konnten aufgrund fehlender Präzision und Standardisierung der Methoden, was längst ein bekanntest Problem darstellt (Wu et al., **2018**), nicht übernommen werden. Die makroskopische und mikroskopische Untersuchung (Prüfung auf Identität A und B) des Drogenmaterials wurde ausgehend vom ChP (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2015**; Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2010**), deren deutscher Übersetzung (Arzneibuch der Chinesischen Medizin, **2005, 2010 und 2015**) und geeigneter Literatur anhand der vorhandenen Drogenproben überprüft und gegebenenfalls angepasst. Für die weitere Identitätsbestimmung wurde eine zeitsparende DC/HPTLC Methode (Identität C) unter Vermeidung toxikologisch bedenklicher Fließmittel gefunden bzw. entwickelt, mittels derer das Drogenmaterial eindeutig anhand zweier Marker identifiziert werden konnte (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, **2007**; International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, **2016**). Für Scrophulariae radix wurden die Marker Harpagid, Harpagosid und für

Xanthii fructus Chlorogensäure und 1,5-Dicaffeoylchinasäure gewählt und die entsprechende Methode validiert (Reich and Schibli, **2007**).

Reinheitsuntersuchungen, wie beispielsweise Trocknungsverlust und Asche wurden, wie nach ChP gefordert, aber entsprechend der Vorschriften aus dem Ph.Eur. (Europäisches Arzneibuch, **2017**) durchgeführt und deren Grenzwerte gegebenenfalls abweichenden Analyseergebnissen angepasst.

Eine Gehaltsbestimmung sollte primär mittels HPLC-DAD durchgeführt werden. Dafür wurden ebenfalls bestehende Vorschriften evaluiert, optimiert und in Anlehnung an die ICH Guidelines (International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, **2005**) validiert. Im Falle von *Scrophulariae radix* wurde zusätzlich eine densitometrische Gehaltsbestimmungsmethode (HPLTC) neu entwickelt, diese aber aufgrund der Diskrepanzen zu den ermittelten Gehalten per HPLC-DAD nicht weiterverfolgt.

Im Zuge der Reinheitsbestimmung von *Xanthii fructus* sollte zudem eine Quantifizierungsmethode (HPLC-DAD) entwickelt werden, mittels derer beide toxikologisch relevanten Diterpene, CATR und ATR (Xue et al., **2014**), detektiert werden können. Abweichend vom ChP (*Xanthii Fructus*, **2015**), das zwischen unverarbeitetem (Quantifizierung von CATR) und verarbeitetem (processed) Drogematerial (Quantifizierung von ATR) unterscheidet, sollte eine Methode für den Monographievorschlag entwickelt werden, die beide Analyten in einem Lauf quantifiziert. Da nur CATR kommerziell erhältlich war, musste das zweite Diterpen ATR, anhand verschiedener Trenn- und Aufarbeitsverfahren aus Drogenmaterial isoliert und anhand von Literaturdaten charakterisiert werden, um für die Methodenentwicklung als Marker verwendet werden zu können. Eine Validierung der Methode war lediglich für CATR möglich, aufgrund der fehlenden kommerziellen Verfügbarkeit des ATRs konnte die Methode nicht für den Monographievorschlag übernommen werden (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, **2007**). Zusätzlich zu den analytischen und phytochemischen Untersuchungen zu *Xanthii fructus* wurden zellbiologische *in vitro* Testungen der beiden Diterpene inklusive wässriger pflanzlicher Extrakte (Dekokte) mit Hilfe dreier verschiedener Zellreihen am Modell des MTT-Assays, zur Abschätzung der mitochondrialen Aktivität, durchgeführt. Überraschenderweise kam es erst in hohen Konzentrationen der Substanzen zu einer deutlichen Abnahme der Viabilität. Zudem konnte die aus der Literatur beschriebene deutlich stärkere Toxizität des CATRs im Gegensatz zum ATR (Luciani et al., **1978**; Luciani et al., **1971**) nicht bestätigt werden.

6 Summary

The increasing interest and support on herbal drug material from TCM led in 2005 to the decision of the Commission of the German Pharmacopoeia to establish quality monographs on 19 TCM herbal drugs. As a priority, herbal drug material with toxicological concerns or likelihood of confusion with aristolochia acid containing herbal drug material were chosen. (DAB-Kommission: Monographien für TCM-Drogen, **2005**; Auszug des Protokolls der DAB-Kommission 2005, **2005**) Among others, Astragali radix, Coptidis rhizoma and Bupleuri radix were part of this first TCM herbal drug list, which was created for the monograph proposals (Auszug des Protokolls der DAB-Kommission 2005, **2005**). Six herbal drugs were already evaluated in earlier PhD thesis at the University of Regensburg and resulted in monograph proposals for the German Pharmacopoeia (Brem, **2010**; Scherübl, **2014**).

The present thesis focuses on the analytical (qualitativ and quantitativ) investigations on herbal drug material of Scrophulariae radix and Xanthii fructus. Samples of authentic herbal drug material deriving from TCM-importers (e.g. Chinamedica, Sinophyto, Herbasinica) and in the case of Scrophulariae radix additionally from cultivation trials initiated by the Bavarian State Research Center for Agriculture (Heuberger et al., **2010**) were examined.

The definition of herbal drug material consists of the originating plant, the herbal drug preparation and the content of a reference marker. Due to the preparation of the herbal drug material, in particular the processing procedure, which is often accompanied by fermentation procedures, it was only possible to adopt the requirements of the ChP to a limited extend. Due to the lack of standardized method descriptions, which is an already known problem (Wu et al., **2018**), the adoption of instructions like “dried in the sun or baked to be half-dried” (Scrophulariae Radix, **2010**) was not possible. The macroscopic and microscopic examination of the herbal drug material (Identification A and B) was performed, and if necessary adapted, with existing samples following the ChP (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2015**; Pharmacopoeia of the People's Republic of China, **2010**), including the German translation (Arzneibuch der Chinesischen Medizin, **2005, 2010 und 2015**) and suitable literature. For further identification of the herbal drug material (Identification C), a time-saving TLC/HPTLC- method, with the aim of unambiguous identification while using two reference marker and avoiding solvents of toxicological concern, had to be evaluated, newly developed and finally validated (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, **2007**; International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, **2016**; Reich and Schibli, **2007**). Harpagide and harpagoside were chosen for Scrophulariae radix, while chlorogenic acid and 1,5- dicaffeoylquinic acid were selected for Xanthii fructus. Tests, like water content and ash, were performed in accordance with the ChP and following the instructions of the Ph.Eur. (Europäisches Arzneibuch, **2017**).

In case of discrepancies between results and the permitted limits of the ChP, the respective limits for the monograph proposal were adjusted. The assay should favorably being performed by HPLC-DAD. Therefore, existing or established methods were evaluated, optimized and validated, according to the ICH guidelines (International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, **2005**). In the case of *Scrophulariae radix*, an alternative assay using HPTLC-densitometry was developed. Due to discrepancies to the results in content obtained by HPLC-DAD, the densitometric method was not validated or implemented for the monograph proposal. Concerning the test section of *xanthii fructus*, a method to quantify both toxicologic relevant diterpenes, CATR and ATR (Xue et al., **2014**), should be developed. In contrast to the ChP (*Xanthii Fructus*, **2015**), which distinguishes between unprocessed (quantification of CATR) and processed (quantification of ATR) herbal drug material, the monograph proposal for processed herbal drug material should contain a HPLC-DAD method to quantify both diterpenes in one single run. Only CATR was commercially available, ATR had to be isolated via different separation procedures and being characterized via literature data to be used as reference marker for the method development. The method was only validated for CATR, due to lack of availability of ATR, the method could not be implemented in the monograph proposal (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, **2007**). In addition to analytical and phytochemical investigations, the two diterpenes and the respective decoctions were subject of *in vitro* tests using MTT-assay with three different cell lines. Surprisingly, a significant reduction of cell viability was obtained only in higher concentrations of the toxic substrates.

In accordance with the literature, the obvious higher toxicity of CATR in contrast to ATR could not be confirmed (Luciani et al., **1978**; Luciani et al., **1971**).

7 Monographievorschläge für das Deutsche Arzneibuch (DAB)

7.1 Monographievorschlag zu *Scrophulariae radix*

Ningpo-Braunwurzwurzel

Scrophulariae radix

Xuanshen

Definition:

Stammpflanze: *Scrophularia ningpoensis* HEMSL.

Droge: Die im Winter ausgegrabenen und von Rhizomresten, Sprossen und feinen Nebenwurzeln befreiten Wurzeln. Die Wurzeln werden während des Trocknungsprozesses fermentiert. Der Vorgang wird solange wiederholt, bis die Wurzeln trocken sind.

Gehalt: Mindestens 0,45 Prozent für die Summe von Harpagid ($C_{15}H_{24}O_{10}$) und Harpagosid ($C_{24}H_{30}O_{11}$), bezogen auf die getrocknete Droge.

Prüfung auf Identität:

A. Die 6 bis 20 cm lange und 1 bis 3 cm dicke Wurzel zeigt eine rundzylindrische, im Mittelteil leicht verdickte oder oben und unten schmaler werdende Form.

Die Schnittdroge besteht aus runden bis ovalen, dünnen Scheiben. Die äußere Oberfläche dieser Wurzelfragmente ist hellbraun bis gelblich braun und von unregelmäßigen, groben, verhältnismäßig tiefen Längsfurchen gekennzeichnet. Die Schnittfläche ist dunkelbraun bis schwarz glänzend.

B. Die Droge wird pulverisiert (355). Das Pulver ist graugelb bis graubraun. Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat-Lösung *R* verwendet wird. Das Pulver zeigt folgende Merkmale:

Zahlreiche Sklereiden sowohl einzeln als auch in Gruppen zu mehreren angeordnet, deren rundliche über quadratische bis hin zu langgestreckte, faserförmige Form sehr inhomogen ist. Die Wanddicke liegt zwischen 5 bis 26 μm . Tüpfelkanäle sind deutlich zu erkennen.

Zudem zeigen sich zahlreiche lignifizierte Gefäße und Gefäßfragmente.

Weiterhin treten parenchymatische Gewebeteile mit dunklen kernähnlichen Bestandteilen auf.

C. Die Prüfung erfolgt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (2.2.27)

Untersuchungslösung: 1,5 g pulverisierte Droge (355) wird mit 10 ml 1-Butanol *R* versetzt, im Ultraschallbad 30 min lang extrahiert und anschließend filtriert. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 1 ml Methanol *R* aufgenommen.

Referenzlösung: 1,0 mg Harpagid *RN* beziehungsweise 1,0 mg Harpagosid *RN* werden in 1,0 ml Methanol *R* gelöst.

Untersuchungsbedingungen

Stationäre Phase: DC-Platte mit Kieselgel *R* [HPTLC-Platte mit Kieselgel *R*].

Auftragevolumen: 15 µl [10 µl] Untersuchungslösung und 15 µl [10 µl] Referenzlösungen werden bandförmig 1 cm [8 mm] aufgetragen.

Fließmittel: Ethylacetat *R*, Methanol *R*, Wasser *R* (77:15:8, V/V/V).

Laufstrecke: 10 cm [6 cm].

Detektion und Auswertung: Nach Verdunsten des Fließmittels wird zuerst mit ethanolischer Vanillinlösung (1% (m/V); hergestellt aus Vanillin *R* und wasserfreiem Ethanol *R*) und im Anschluss mit ethanolischer Schwefelsäure (10% (m/m); hergestellt aus wasserfreiem Ethanol *R* und Schwefelsäure *R*) besprüht. Nach 3 min langem Erwärmen auf der Heizplatte (110 °C) kann die Auswertung bei Tageslicht erfolgen. Die Zonenfolge in den Chromatogrammen von Referenzlösung und Untersuchungslösung ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich.

Oberer Plattenrand	
Harpagosid (1 rote Zone)	2 violette Zonen 1 violette Zone 1 rote Zone (Harpagosid)
Harpagid (1 rote Zone)	1 gelbe Zone 1 rote Zone (Harpagid) 1 graubraune Zone
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit der Schnittdroge:

Trocknungsverlust (2.2.32): Höchstens 12,0 Prozent, mit 1,000 g pulverisierter Droge (355) durch 2 Stunden langes Trocknen bei 100 bis 105 °C bestimmt.

Asche (2.4.16): Höchstens 5,0 Prozent.

Salzsäureunlösliche Asche (2.8.1): Höchstens 2,0 Prozent.

Gehaltsbestimmung:

Die Bestimmung erfolgt mit Hilfe der Flüssigchromatographie (2.2.29).

Untersuchungslösung: 0,500 g pulverisierte Droge (355) werden mit 25,0 ml Methanol 50% (V/V) *RN* versetzt, 10 min lang bei Raumtemperatur mazeriert und 30 min lang im Ultraschallbad extrahiert. Nach dem Abkühlen wird der Extrakt filtriert und das Filtrat mit Methanol 50% (V/V) *RN* zu 25,0 ml verdünnt.

Referenzlösung: 4,0 mg Harpagid *RN* werden in 50,0 ml Methanol 50% (V/V) *RN* gelöst.

1,0 mg Harpagosid *RN* wird in 50,0 ml Methanol 50% (V/V) *RN* gelöst.

Säule:

Material: rostfreier Stahl.

Abmessungen: Länge 0,250 m, innerer Durchmesser 0,4 mm.

Stationäre Phase: octadecylsilyliertes nachsilanisierendes Kieselgel für Chromatographie *R* (5 µm); (z.B. Merck Hibar® 250-4; Purospher® STAR RP18e (5 µm), mit Vorsäule).

Säulentemperatur: 25 °C.

Elution:

Mobile Phase: A: eine 0,03%ige Lösung von Phosphorsäure 85% *R*.

B: Acetonitril *R*.

Durchflussrate: 1 ml * min⁻¹.

Typ: Gradientenelution.

Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
0	95	5
0 – 8	95 → 90	5 → 10
8 – 23	90 → 50	10 → 50
23 – 26	50	50
26 – 28	50 → 10	50 → 90
28 – 31	10	90

Detektor: Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 210 nm.

Untersuchungsbedingungen:

Injektionsvolumen: je 10 µl, getrennt eingespritzt.

Chromatographiedauer: 31 min.

Auswertung:

Anhand der Retentionszeiten im Chromatogramm der Referenzlösungen werden die Peaks von Harpagid/Harpagosid gekennzeichnet. Die Flächen von Harpagid, Harpagosid und den Untersuchungslösungen werden ermittelt.

Der Prozentgehalt an Harpagid und Harpagosid, bezogen auf die getrocknete Droge, wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{m_1 * F_3 * p_1}{F_1 * m_3 * 2000} + \frac{m_2 * F_4 * p_2}{F_2 * m_3 * 2000}$$

F₁= Peakfläche von Harpagid im Chromatogramm der Referenzlösung

F₂= Peakfläche von Harpagosid im Chromatogramm der Referenzlösung

F₃= Peakfläche von Harpagid im Chromatogramm der Untersuchungslösung

F₄= Peakfläche von Harpagosid im Chromatogramm der Untersuchungslösung

m₁= Masse von Harpagid in Milligramm

m₂= Masse von Harpagosid in Milligramm

m₃= Einwaage der Droge in Gramm

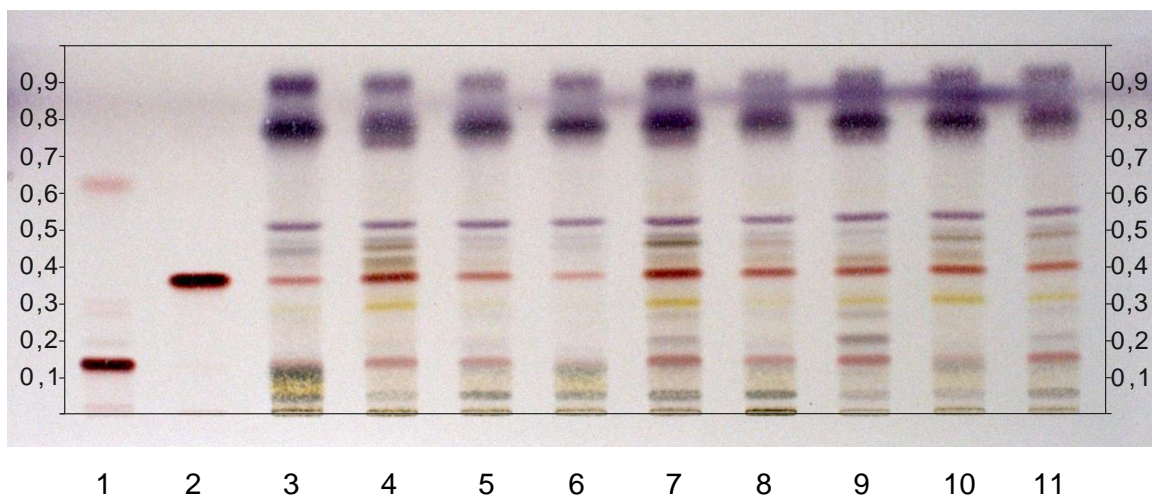
p₁= Prozentgehalt an Harpagid in Harpagid RN [%]

p₂= Prozentgehalt an Harpagosid in Harpagosid *RN* [%]

Anhang:

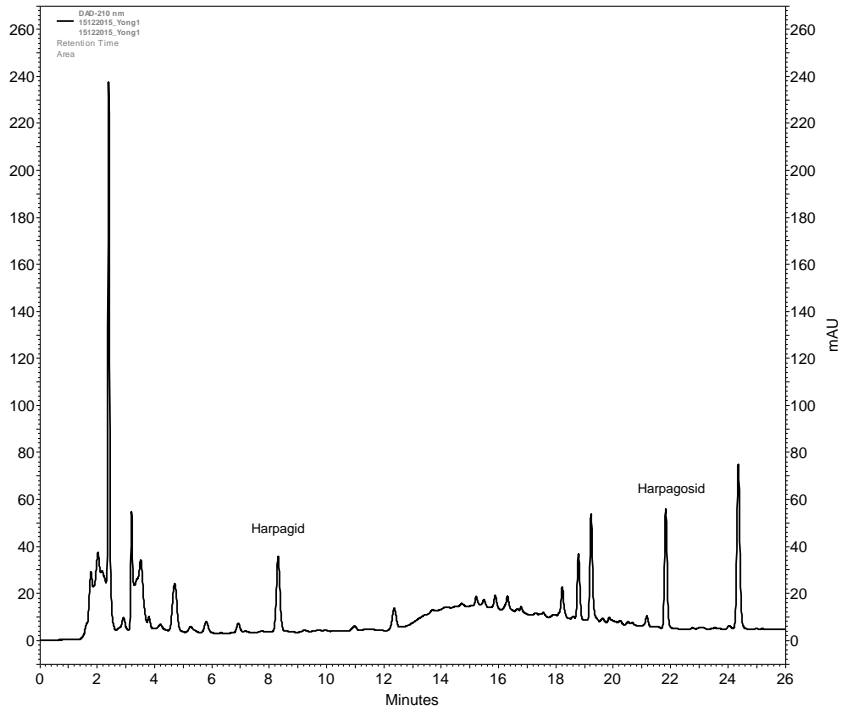
HPTLC-Chromatogramm von *Scrophulariae radix* (Identität C)

Bild bei Tageslicht nach Derivatisierung



Bahn	Probe	Bahn	Probe
1	Harpagid	7	<i>Scrophulariae radix</i> China #5
2	Harpagosid	8	<i>Scrophulariae radix</i> China #6
3	<i>Scrophulariae radix</i> China #1	9	<i>Scrophulariae radix</i> deutscher Versuchsanbau
4	<i>Scrophulariae radix</i> China #2	10	<i>Scrophulariae radix</i> China #7
5	<i>Scrophulariae radix</i> China #3	11	<i>Scrophulariae radix</i> China #8
6	<i>Scrophulariae radix</i> China #4		

Chromatogramm bei 210 nm von Scrophulariae radix (Gehaltsbestimmung)



7.2 Monographievorschlag zu *Xanthii fructus*

Sibirische Spitzklettenfrucht

Xanthii fructus

Chaocang'erzi

Definition:

Stammpflanze: *Xanthium sibiricum* PATR.

Droge: Die im Herbst gesammelten reifen und getrockneten Früchte.

Die gereinigte Droge wird nach der *qingchao*-Methode (ChP) so lange geröstet, bis sie eine gelbbraune Farbe angenommen hat, dann werden die Stacheln entfernt und durch Sieben eliminiert.

Gehalt: Mindestens 0,25 Prozent Chlorogensäure (C₁₆H₁₈O₉), bezogen auf die getrocknete Droge.

Prüfung auf Identität:

A. Die spindelförmigen, oval bis eiförmigen Früchte haben eine Länge von 0,7 bis 1,7 cm und eine Breite von 0,4 bis 0,8 cm. Die Oberfläche der gerösteten Früchte ist gelbbraun bis zu kräftigem braun. Am Scheitel der Frucht sind zwei deutlich größere Stacheln bzw. Stachelreste zu erkennen, die entweder einzeln stehen oder miteinander verwachsen sind. Im Querschnitt der harten Frucht lassen sich eine Trennwand und zwei Kammern finden, in welchen sich je eine schmale spindelförmige Frucht, die an einem Ende relativ eben ist, befindet. Die Fruchtschale ist dünn, grauschwarz und zeigt Längslinien. Die Samenschale ist membranartig, es sind zwei Keimblätter vorhanden.

B. Die Droge wird pulverisiert (500). Das Pulver ist hellbraun bis graugelb. Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat-Lösung *R* verwendet wird. Das Pulver zeigt folgende Merkmale:

Fasern der Fruchthülle in Bündeln, oft überkreuzt angeordnet; annähernd rechteckige Epidermiszellen des Perikarps, oft verbunden mit Fasern der darunterliegenden Schicht; Fasern des Perikarps in Bündeln angeordnet oder einzeln, langezogen spindelförmig mit mehr oder weniger deutlichen Tüpfeln und Tüpfelkanälen; Epidermiszellen der Testa, annähernd

rechteckig bis abgerundet mit Wandverdickungen; Fragmente von Keimblattzellen neben Öltropfen und Aleuronkörpern; lignifizierte, längliche, annähernd rechteckige, getüpfelte Parenchymzellen; Fragmente des Leitgewebes in Form von Schraub-/bzw. Spiralgefäßen.

C. Die Prüfung erfolgt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (2.2.27)

Untersuchungslösung: 0,5 g pulverisierte Droge (500) werden mit 10,0 ml Methanol 70% (V/V) *R* versetzt, im Ultraschallbad 30 min lang extrahiert und zentrifugiert. Der Überstand ist als Untersuchungslösung zu verwenden.

Referenzlösung: 1,0 mg Chlorogensäure *R* beziehungsweise 1,0 mg 1,5-Dicaffeoylchinasäure *R* werden in 10,0 ml Methanol 70% (V/V) *R* gelöst.

Untersuchungsbedingungen

Stationäre Phase: DC-Platte mit Kieselgel *R* [HPTLC-Platte mit Kieselgel *R*].

Auftragevolumen: 10 µl [5 µl] Untersuchungslösung und 10 µl [5 µl] Referenzlösungen werden bandförmig 1 cm [8 mm] aufgetragen.

Fließmittel: Ethylacetat *R*, wasserfreie Ameisensäure *R*, Essigsäure 99% *R*, Wasser *R* (100:11:11:27, V/V/V).

Laufstrecke: 10 cm [6 cm].

Detektion und Auswertung: Die Auswertung erfolgt im ultravioletten Licht bei 366 nm. Die Zonenfolge in den Chromatogrammen von Referenzlösung und Untersuchungslösung ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich.

Oberer Plattenrand	
1,5-Dicaffeoylchinasäure (1 blau fluoreszierende Zone)	1 blau fluoreszierende Zone (1,5-Dicaffeoylchinasäure)
Chlorogensäure (1 blau fluoreszierende Zone)	1 blau fluoreszierende Zone (Chlorogensäure) 1 schwach grünlich fluoreszierende Zone 1 blau fluoreszierende Bande
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit:

Trocknungsverlust (2.2.32): Höchstens 10,0 Prozent, mit 1,000 g pulverisierter Droge (500) durch 2 Stunden langes Trocknen bei 100 bis 105 °C bestimmt.

Asche (2.4.16): Höchstens 5,0 Prozent.

Gehaltsbestimmung:

Die Bestimmung erfolgt mit Hilfe der Flüssigchromatographie (2.2.29).

Untersuchungslösung: 0,500 g pulverisierte Droge (500) werden mit 25,0 ml Methanol 50% (V/V) RN versetzt, 30 min im Ultraschallbad bei 40 °C extrahiert. Nach der Extraktion wird die Probe 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt und in einen 25,0 ml Messkolben filtriert. Unter Nachspülen des Extraktionsgefäßes und des Rückstandes wird der Extrakt mit Methanol 50% (V/V) RN auf 25,0 ml aufgefüllt.

Referenzlösung: 3,5 mg Chlorogensäure R werden in 50 ml Methanol 50% (V/V) RN gelöst.

Säule:

Material: rostfreier Stahl.

Abmessungen: Länge 0,250 m, innerer Durchmesser 0,4 mm.

Stationäre Phase: nachsilanisieretes, octadecylsilyliertes Kieselgel für Chromatographie R (5 µm); (z.B. Merck Hibar® 250-4; Purospher® STAR RP18e (5 µm), mit Vorsäule)

Säulentemperatur: 25 °C.

Elution:

Mobile Phase: A: eine 0,4%ige Lösung von Phosphorsäure 85% R.

B: Acetonitril R.

Durchflussrate: 1 ml * min⁻¹.

Typ: Gradientenelution.

Zeit [min]	Mobile Phase A [% V/V]	Mobile Phase B [% V/V]
0	90	10
0 – 15	90	10
15 – 20	90 → 10	10 → 90
20 – 25	10	90
25 – 30	10 → 90	90 → 10
30 – 40	90	10

Detektor: Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 327 nm.

Untersuchungsbedingungen:

Injektionsvolumen: je 10 µl, getrennt eingespritzt.

Auflösung: Mindestens 1,5 zwischen den Peaks von Chlorogensäure und dem folgenden Peak.

Aufzeichnungsdauer: 40 min.

Auswertung:

Anhand der Retentionszeiten im Chromatogramm der Referenzlösung wird der Peak von Chlorogensäure gekennzeichnet. Die Fläche von Chlorogensäure und den Untersuchungslösungen werden ermittelt.

Der Prozentgehalt an Chlorogensäure, bezogen auf die getrocknete Droge, wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{m_1 * F_2 * p}{F_1 * m_2 * 2000}$$

F₁= Peakfläche von Chlorogensäure im Chromatogramm der Referenzlösung

F₂= Peakfläche von Chlorogensäure im Chromatogramm der Untersuchungslösung

m₁= Einwaage von Chlorogensäure in Milligramm

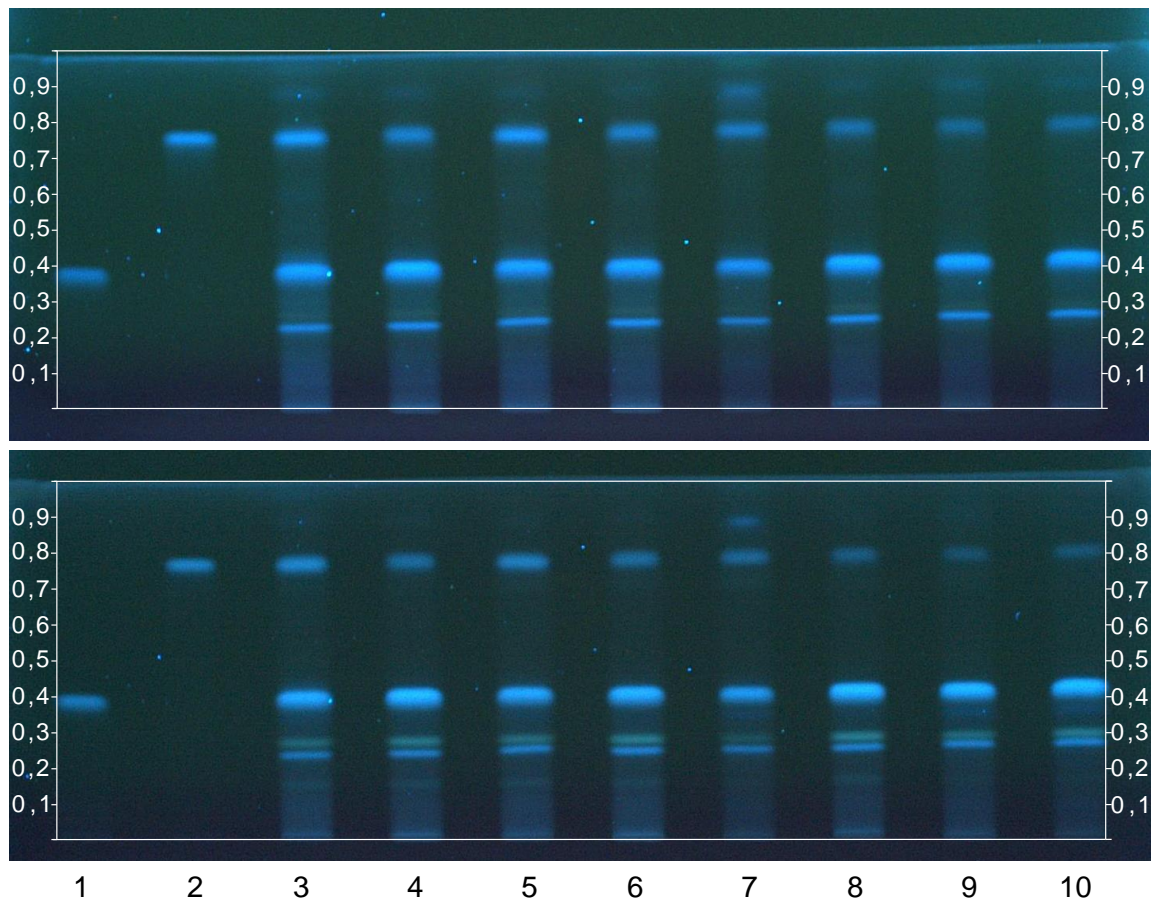
m₂= Einwaage der Droge in Gramm

p= Prozentgehalt an Chlorogensäure in Chlorogensäure R [%]

Anhang:

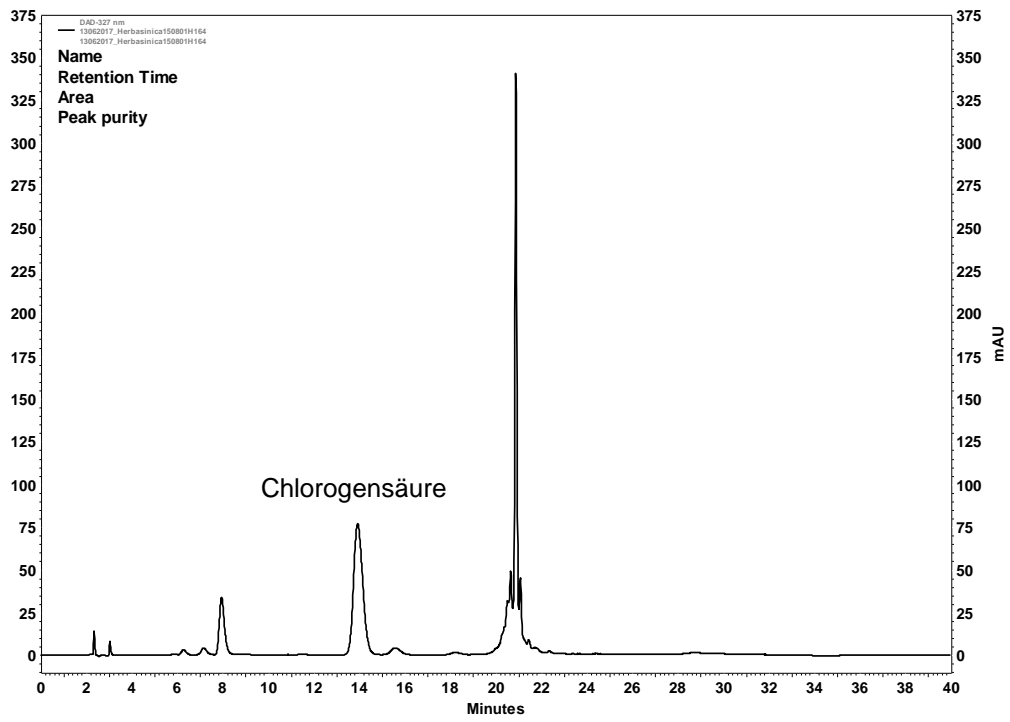
HPTLC-Chromatogramm von Xanthii fructus (Identität C)

Bild bei 366 nm



Bahn	Probe	Bahn	Probe
1	Chlorogensäure	7	Xanthii fructus China #5
2	1,5-Dicaffeoylchinasäure	8	Xanthii fructus China #6
3	Xanthii fructus China #1	9	Xanthii fructus China #7
4	Xanthii fructus China #2	10	Xanthii fructus China #8
5	Xanthii fructus China #3		
6	Xanthii fructus China #4		

Chromatogramm bei 327 nm von Xanthii fructus (Gehaltsbestimmung)



8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(m)M	(Milli)molar
°	Grad
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Å	Ångström
AA	Anisaldehyd-Reagenz
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMG	Arzneimittelgesetz
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
ApBetrO	Apothekenbetriebsordnung
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATR	Atractylosid
AUC	Area under the curve
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
Bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
c	Konzentration
CAT	Katalase
CATR	Carboxyatractylosid
ChP	Chinesisches Arzneibuch
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPC	Centrifugal partition chromatography
CRS	Chemical Reference Standard
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	Deutscher Arzneimittel Codex
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (Europäisches Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	Extracted Ion chromatogram
ESI	Electrospray Ionization
FCS _{ni}	Fetales Kälber Serum, hitzeinaktiviert
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GSH	Glutathion
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HKCMMS	Hong Kong Chinese Materia Medica Standards
HPLC	High-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPTLC	High-performance thin layer chromatography (Hochleistungsdünnschichtchromatographie)
HRS	Herbal Reference Standard
Hz	Hertz
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
Inc.	Incorporated
<i>J</i>	Kopplungskonstante
JP	Japanese Pharmacopoeia
l	Liter
LD ₅₀	Letale dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
LGL	Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LOD/DL	Limit of detection, Detection limit, Detektionslimit
LOQ/QL	Limit of quantification, Quantification limit, Quantifizierungslimit
m/V	Masse pro Volumen
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter

Abkürzungsverzeichnis

ms	Millisekunde
MTT	[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromid]
MW	Mittelwert
n. Chr.	nach Christus
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanzspektroskopie)
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NRF	Neues Rezeptur-Formularium
p.a.	pro analysis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylenglykol
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch
Ph.Helv.	Pharmacopoea Helvetica
PI	Prognoseintervall
Q-TOF	Quadrupole-Time of Flight
r ²	Bestimmtheitsmaß
R _f	Retentionsfaktor
RP18	Reversed Phase 18
Rpm	rounds per minute
SATCM	Chinese State Administration of TCM
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
StabW	Standardabweichung
T	Temperatur
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TFA	Trifluoressigsäure
TV	Trocknungsverlust
U/min	Umdrehungen pro Minute
UHD	Ultra High Definition
USD	US-Dollar
USP	United States Pharmacopeia

UV	Ultraviolett
v. Chr.	vor Christus
V/V	Volumen pro Volumen
V _K	Variationskoeffizient

9 Literatur

- 2.2.32 Trocknungsverlust, in: Europäisches Arzneibuch, vol. 1, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, pp. 72–73.
- 2.4.1 Siebe, in: Europäisches Arzneibuch, vol. 1, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, pp. 22–23.
- 2.4.16 Asche, in: Europäisches Arzneibuch, vol. 1, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, p. 187.
- 2.8.1 Salzsäureunlösliche Asche, in: Europäisches Arzneibuch, vol. 1, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, p. 391.
- 5.22 Bezeichnungen von in der Traditionellen Chinesischen Medizin verwendeten pflanzlichen Drogen, in: Europäisches Arzneibuch 9. Ausgabe, 2. Nachtrag. Amtliche deutsche Ausgabe (Ph. Eur. 9.2), 1st ed. Deutscher Apotheker Verlag, **2018**, Stuttgart, pp. 6345–6346.
- Acker, L., Bergner, K.-G., Diemair, W., Heimann, W., Kiermeier, F., Schormüller, J., Souci, S.W., Acker, L., Bressau, G., Brubacher, G.B., Bürger, K.M., Diemair, S., Diemair, W., Doerffel, K., Franck, R., Gudjons, H., Joppien, P., Kotter, L., Kröller, E., Libert, H., Mühlshlegel, H., Niedermaier, T., Pfeilsticker, K., Pfeleiderer, G., Postel, W., Probst, H.P., Rödder, W., Schäfer, W., Schmid, L., Schneider, E., Seher, A., Sommer, H., Thaler, H., Vuilleumier, J.P., Woidich, H. Analytik der Lebensmittel Nachweis und Bestimmung von Lebensmittel-Inhaltsstoffen. Springer, **1967**, Berlin, Heidelberg.
- An, H.-J., Jeong, H.-J., Lee, E.-H., Kim, Y.-K., Hwang, W.-J., Yoo, S.-J., Hong, S.-H., Kim, H.-M. Xanthii Fructus inhibits inflammatory responses in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Inflammation* 28 (5), **2004**, 263–270.
- Artischockenblätter, in: Europäisches Arzneibuch, vol. 2, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, pp. 1930–1932.
- Artischockenblättertrockenextrakt, in: Europäisches Arzneibuch, vol. 2, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, pp. 1933–1934.
- Arzneibuch der Chinesischen Medizin: Monographien des Arzneibuches der Volksrepublik China 2005, 2010 und 2015. Gesamtwerk mit 16. Aktualisierungslieferung 2017, 2nd ed. Deutscher Apotheker Verlag, **2005, 2010 und 2015**, Stuttgart.
- Auszug des Protokolls der DAB-Kommission 2005: Erarbeitung von Monographien für Drogen der traditionellen chinesischen Medizin, **2005** A0-11-24.
- Bauer, R., Franz, G. Modern European monographs for quality control of Chinese herbs. *Planta Medica* 76 (17), **2010**, 2004–2011.

- Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. TCM - Stellungnahme des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) zur Verwendung von TCM-Granulaten in der Rezeptur - Bayerische Landesapothekerkammer, **2016**. <http://www.blak.de/d/items/tcm-stellungnahme-des-bayerischen-landesamts-fuer-gesundheit-und.html>. Accessed 7 February 2017.
- Bensky, D., Clavey, S., Stöger, E. (Eds.). Chinese herbal medicine: Materia medica, 3rd ed. Eastland Press, **2004**, Seattle, WA.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, in: Biotechnology Annual Review, vol. 11, pp. 127–152.
- Berridge, M.V., Tan, A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Archives of Biochemistry and Biophysics 303 (2), **1993**, 474–482.
- Bocksdornfrüchte, in: Europäisches Arzneibuch, vol. 2, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, pp. 1973–1974.
- Botha, C.J., Lessing, D., Rösemann, M., van Wilpe, E., Williams, J.H. Analytical confirmation of *Xanthium strumarium* poisoning in cattle. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 26 (5), **2014**, 640–645.
- Brem, T. Untersuchungen zur pharmazeutischen Qualität pflanzlicher Drogen aus der Traditionellen Chinesischen Medizin an den Beispielen von *Astragalus membranaceus*, *Coptis spec.*, *Forsythia suspensa* und *Leonurus japonicus*. Dissertation, **2010**, Regensburg.
- Brennnesselblätter, in: Europäisches Arzneibuch, vol. 2, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, pp. 1981–1982.
- Brucoli, F., Borrello, M.T., Stapleton, P., Parkinson, G.N., Gibbons, S. Structural characterization and antimicrobial evaluation of atractyloside, atractyligenin, and 15-didehydroatractyligenin methyl ester. Journal of Natural Products 75 (6), **2012**, 1070–1075.
- Bundesapothekerkammer. Kommentar zur Leitlinie der Bundesapothekerkammer zur Qualitätssicherung, **2016**: Prüfung und Lagerung der Ausgangsstoffe Bundesapothekerkammer. https://www.abda.de/fileadmin/assets/Praktische_Hilfen/Leitlinien/Pruefung_Ausgangsstoffe_Primaerpackmittel/LL_Pruefung_Ausgangsstoffe_Kommentar.pdf. Accessed 7 August 2018.
- Bundesministerium der Justiz für Verbraucherschutz. Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz - AMG) (Zugriff 07.08.2018, 14:22 Uhr), **1976**.

- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. Verordnung über den Betrieb von Apotheken (Apothekenbetriebsordnung - ApBetrO) (Zugriff 07.08.2018, 14:30 Uhr), **1987**.
- Cao, G., Wu, X., Li, Q., Cai, H., Cai, B., Zhu, X. Influence of processing procedure on the quality of Radix Scrophulariae: A quantitative evaluation of the main compounds obtained by accelerated solvent extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 38 (3), **2015**, 390–394.
- Carpenedo, F., Luciani, S., Scaravilli, F., Palatini, P., Santi, R. Nephrotoxic effect of atractyloside in rats. *Archives of Toxicology* 32 (3), **1974**, 169–180.
- Chappell, J.B., Crofts, A.R. The effect of atractylate and oligomycin on the behaviour of mitochondria towards adenine nucleotides. *Biochemical Journal* 95 (3), **1965**, 707–716.
- Cheeke, P.R. Toxicants of plant origin: Glycosides. CRC Press, **1989**, Boca Raton, Fla.
- Chen, B., Liu, Y., Liu, H.-W., Wang, N.-L., Yang, B.-F., Yao, X.-S. Iridoid and aromatic glycosides from *Scrophularia ningpoensis* HEMSL. and their inhibition of $[Ca^{2+}]$ increase induced by KCl. *Chemistry & Biodiversity* 5 (9), **2008**, 1723–1735.
- Chen, J.K., Chen, T.T. Chinesische Pharmakologie I, 1st ed. Verlag Systemische Medizin AG, **2012**, Bad Kötzing, München.
- Chen, L., Liu, J., Wang, Q., Chen, J. Fingerprint comparison between Gegen Qinlian preparations of three different pharmaceutical forms including decoction, dispensing granule and pill. *Chromatographia* 69 (1-2), **2009**, 123–127.
- Chen, L., Wang, Q., Liu, J. Simultaneous analysis of nine active components in Gegen Qinlian preparations by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Separation Science* 29 (14), **2006**, 2203–2210.
- Cheung, F. TCM: Made in China. *Nature* 480 (7378), **2011**, S82-3.
- China Chamber of Commerce for Import & Export of Medicines & Health Products. Top 20 export markets of traditional chinese medicines 2010, **2011**.
<http://www.cccmhpie.org.cn/Pub/3737/25545.shtml>. Accessed 7 August 2018.
- Chinese Herbal Medicine: Materia Medica, 3rd ed. Eastland Press Inc, **2004**, Seattle, Washington.
- Chinesische Pharmakologie I, 1st ed. Verlag Systemische Medizin AG, **2012**, Bad Kötzing, München.
- Cole, R.J., Stuart, B.P., Lansden, J.A., Cox, R.H. Isolation and redefinition of the toxic agent from Cocklebur (*Xanthium strumarium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28 (6), **1980**, 1330–1332.
- Council of Europe. Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparations, **2007**.
https://www.edqm.eu/medias/fichiers/Technical_Guide_for_the_Elaboration_of_Monographs_on_herbal_drugs_and_herbal_drug_preparations_2007.pdf. Accessed 17 July 2018.

- Cutler, H.G., Cole, R.J. Carboxyatractyloside: A compound from *Xanthium strumarium* and *Atractylis gummifera* with plant growth inhibiting properties. The probable „Inhibitor A“. *Journal of Natural Products* 46 (5), **1983**, 609–613.
- DAB-Kommission: Monographien für TCM-Drogen. *Deutsche Apothekerzeitung* 2005 (42), **2005**, 32.
- Dahout-Gonzalez, C., Nury, H., Trézéguet, V., Lauquin, G.J.-M., Pebay-Peyroula, E., Brandolin, G. Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Physiology* 21, **2006**, 242–249.
- Danieli, B., Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B. Carboxyatractyloside, a new glycoside from *Atractylis gummifera* L. *Fitoterapia* (42), **1971**, 91–93.
- Danieli, B., Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B. Structure of the diterpenoid carboxyatractyloside. *Phytochemistry* 11 (12), **1972**, 3501–3504.
- Das ZL informiert: Aristolochiasäure in TCM nachgewiesen. *Deutsche Apothekerzeitung* 143 (30), **2003**, 46.
- Debetto, P. Plants recently found to contain atractylosides, in: Santi, R., Luciani, S. (Eds.), *Atractyloside. Chemistry, Biochemistry and Toxicology*. Piccin Medical Books, **1978**, Padova, pp. 125–129.
- Defaye, G., Vignais, P.M., Vignais, P.V. Evidence expérimentale pour l'identification de la gummiférine au carboxy-atractyloside. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* (273), 2671–2673.
- Deutsche Ärztegesellschaft für Akupunktur e.V.
https://www.daegfa.de/PatientenPortal/Chinesische_Medizin.Yin_und_Yang.aspx.
 Accessed 1 August 2018.
- Deutsches Arzneibuch, 6th ed. Deutscher Apotheker Verlag, **2017**, Stuttgart.
- Dharmananda, S. Safety issues affecting chinese herbs: The case of *Xanthium* Institute for Traditional Medicine. <http://www.itmonline.org/arts/xanthium.htm>. Accessed 14 October 2018.
- Duee, E.D., Vignais, P.V. Échange entre adenine-nucleotides extra- et intramitochondriaux. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 107 (1), **1965**, 184–188.
- EDQM Council of Europe. About EDQM, **2018a**: History EDQM Council of Europe.
<https://www.edqm.eu/en/EDQM-history-93.html>.
- EDQM Council of Europe. Knowledge Database, **2018b**: EDQM Council of Europe.
<https://www.edqm.eu/en/knowledge-database>. Accessed 4 September 2018.
- Eibischblätter, in: *Europäisches Arzneibuch*, vol. 2, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, pp. 2027–2028.
- Eisenkraut, in: *Europäisches Arzneibuch*, vol. 2, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, pp. 2030–2032.

- Enzianwurzel, in: Europäisches Arzneibuch, vol. 2, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, pp. 2033–2035.
- Europäisches Arzneibuch, 8th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2014**, Stuttgart, Eschborn.
- Europäisches Arzneibuch, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn.
- Flora of China. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=129905. Accessed 25 May 2018.
- Frey, H.-P., Zieloff, K. Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie (Planar chromatography): Grundlagen und Praxis. VCH, **1993**, Weinheim.
- Fulmer, G.R., Miller, A.J.M., Sherden, N.H., Gottlieb, H.E., Nudelman, A., Stoltz, B.M., Bercaw, J.E., Goldberg, K.I. NMR chemical shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* 29 (9), **2010**, 2176–2179.
- Funk, W. Statistische Methoden in der Wasseranalytik: Begriffe, Strategien, Anwendungen. VCH Verlagsgesellschaft, **1985**, Weinheim.
- Ghahari, S., Alinezhad, H., Nematzadeh Gh., A., Tajbakhsh M., Baharfar, R. Biochemical composition, antioxidant and biological activities of the essential oil and fruit extract of *Xanthium strumarium* LINN. from northern Iran. *Journal Of Agricultural Science And Technology* (19), **2017**, 1603–1616.
- Gottwald, W. Statistik für Anwender. Wiley VCH, **2000**, Weinheim.
- Hahn-Deinstrop, E. Dünnschicht-Chromatographie: Praktische Durchführung und Fehlervermeidung. Wiley-VCH, **1998**, Weinheim.
- Han, T., Li, H., Zhang, Q., Zheng, H., Qin, L. New thiazinediones and other components from *Xanthium strumarium*. *Chemistry of Natural Compounds* 42 (5), **2006**, 567–570.
- Han, T., Li, H.-L., Zhang, Q.-Y., Han, P., Zheng, H.-C., Rahman, K., Qin, L.-P. Bioactivity-guided fractionation for anti-inflammatory and analgesic properties and constituents of *Xanthium strumarium* L. *Phytomedicine* 14 (12), **2007**, 825–829.
- Haouzi, D., Cohen, I., Vieira, H.L.A., Poncet, D., Boya, P., Castedo, M., Vadrot, N., Belzacq, A.-S., Fau, D., Brenner, C., Feldmann, G., Kroemer, G. Mitochondrial permeability transition as a novel principle of hepatorenal toxicity *in vivo*. *Apoptosis* 7 (5), **2002**, 395–405.
- Hempfen, N., Huber, R. Qualität und Sicherheit chinesischer Arzneidroge in Deutschland - ein Update. *Forschende Komplementärmedizin* 21 (6), **2014**, 401–412.
- Henke, H. Präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20. Henke, **1994**, Obernburg.
- Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., Bienz, S., Bigler, L., Fox, T. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 9th ed. Georg Thieme Verlag, **2016**, Stuttgart, New York.

- Heuberger, H. Scrophulariae radix - Anbau und Ernte. mündlich, 19.11.2014.
- Heuberger, H., **2014**. E-Mail.
- Heuberger, H., Bauer, R., Friedl, F., Heubl, G., Hummelsberger, J., Nögel, R., Seidenberger, R., Torres-Londoño, P. Cultivation and breeding of Chinese medicinal plants in Germany. *Planta Medica* 76 (17), **2010**, 1956–1962.
- Holzapfel, C., Seidenberger, R., Heuberger, H., Schmücker, R., Londoño, P.T., Friedl, F., Hummelsberger, J. Qualität vier chinesischer Heilpflanzen aus bayerischem Versuchsanbau im Vergleich zu Importware — heimisch produzierte TCM-Drogen für den Praxisalltag. *Chinesische Medizin* 31 (4), **2016**, 207–218.
- Hong, S.-H., Jeong, H.-J., Kim, H.-M. Inhibitory effects of *Xanthii fructus* extract on mast cell-mediated allergic reaction in murine model. *Journal of Ethnopharmacology* 88 (2-3), **2003**, 229–234.
- Hong Kong Chinese Materia Medica Standards. Chinese Medicine Division, Department of Health, Government of the Hong Kong Special Administrative Region, **2011**, Hong Kong.
- Hong Kong Chinese Materia Medica Standards. Chinese Medicine Division, Department of Health, Government of the Hong Kong Special Administrative Region, **2012**, Hong Kong.
- Huang, M.-H., Wang, B.-S., Chiu, C.-S., Amagaya, S., Hsieh, W.-T., Huang, S.-S., Shie, P.-H., Huang, G.-J. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of *Xanthii Fructus* extract. *Journal of Ethnopharmacology* 135 (2), **2011**, 545–552.
- Hwang, S.H., Wang, Z., Yoon, H.N., Lim, S.S. *Xanthium strumarium* as an inhibitor of α -glucosidase, protein tyrosine phosphatase 1 β , protein glycation and ABTS⁺ for diabetic and its complication. *Molecules* 21 (9), **2016**.
- Ihrig, M., Kaunzinger, A., Baumann, J., Orbig, H., Reising, K., Schäfer, R., Scholl, C. Qualitätsmängel bei TCM-Drogen. *Pharmazeutische Zeitung* 149 (43), **2004**, 40–47.
- Ingawale, A.S., Sadiq, M.B., Nguyen, L.T., Ngan, T.B. Optimization of extraction conditions and assessment of antioxidant, α -glucosidase inhibitory and antimicrobial activities of *Xanthium strumarium* L. fruits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14, **2018**, 40–47.
- International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, **2005**: Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1).
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Accessed 17 April 2018.
- International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, **2016**: Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R6).

- http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C__R6__Step_4.pdf. Accessed 26 June 2018.
- Jiang, H., Yang, L., Xing, X., Yan, M., Guo, X., Yang, B., Wang, Q., Kuang, H. HPLC-PDA combined with chemometrics for quantitation of active components and quality assessment of raw and processed fruits of *Xanthium strumarium* L. *Molecules* 23 (2), **2018**.
- Jing, J., Chan, C.-o., Xu, L., Jin, D., Cao, X., Mok, D.K.W., Parekh, H.S., Chen, S. Development of an in-line HPLC fingerprint ion-trap mass spectrometric method for identification and quality control of Radix Scrophulariae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 56 (4), **2011**, 830–835.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H. *Dünnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden*. VCH, **1993**, Weinheim.
- Kalg, A. *Chinesische Arzneipflanzen: Wesensmerkmale und klinische Anwendung*. Elsevier, Urban & Fischer, **2009**, München.
- Kantrow, S.P., Piantadosi, C.A. Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 232 (3), **1997**, 669–671.
- Kholodenko, B., Žilinskis, V., Borutaitis, V., Ivanovienė, L., Toleikis, A., Praškevičius, A. The role of adenine nucleotide translocators in regulation of oxidative phosphorylation in heart mitochondria. *FEBS Letters* 223 (2), **1987**, 247–250.
- Klingenberg, M., Pfaff, E. Structural and functional compartmentation in mitochondria, in: Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E., Slater, E.C. (Eds.), *Regulation of metabolic processes in mitochondria*, 180-201, 7th ed. B.B.A. Library, **1966**.
- Knowles, A.F. Characteristics of adenine nucleotide fluxes and transport in human tumor mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 764 (2), **1984**, 203–212.
- Körfers, A., Sun, Y. *Traditionelle Chinesische Medizin: Arzneidrogen und Therapie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, **2009**, Stuttgart.
- Kromidas, S. *Validierung in der Analytik*, 2nd ed. Wiley-VCH, **2011**, Weinheim.
- Lefranc, M. Sur l'acide atractylique et les atractylates, produits immédiats extraits de la racine de l'*Atractylis gummifera*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* (67), **1868**, 954–956.
- Li, G., Yu, F., Wang, Y., Yao, L., Qiu, Z., Wang, T., Wang, Z., Yang, F., Peng, D., Yu, N., Chen, W. Comparison of the chromatographic fingerprint, multicomponent quantitation and antioxidant activity of *Salvia miltiorrhiza* Bge. between sweating and nonsweating. *Biomedical Chromatography*, **2018**, e4203.

- Li, X., Li, Z., Xue, M., Ou, Z., Liu, M., Yang, M., Liu, S., Yang, S., Li, X. Fructus Xanthii attenuates hepatic steatosis in rats fed on high-fat diet. *PloS one* 8 (4), **2013**, e61499.
- Li, Y.-M., Jiang, S.-H., Gao, W.-Y., Zhu, D.-Y. Iridoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry* 50 (1), **1999**, 101–104.
- Li, Y.-M., Jiang, S.-H., Gao, W.-Y., Zhu, D.-Y. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry* 54 (8), **2000**, 923–925.
- Lin, A.X., Chan, G., Hu, Y., Ouyang, D., Ung, C.O.L., Shi, L., Hu, H. Internationalization of traditional Chinese medicine: current international market, internationalization challenges and prospective suggestions. *Chinese Medicine* 13, **2018**, 9.
- Lord, G.M., Tagore, R., Cook, T., Gower, P., Pusey, C.D. Nephropathy caused by Chinese herbs in the UK. *The Lancet* 354 (9177), **1999**, 481–482.
- Luciani, S., Carpenedo, F., Tarjan, E.M. Effects of Atractyloside and Carboxyatractyloside in the whole animal, in: Santi, R., Luciani, S. (Eds.), *Atractyloside. Chemistry, Biochemistry and Toxicology*. Piccin Medical Books, **1978**, Padova, pp. 109–124.
- Luciani, S., Martini, N., Santi, R. Effects of carboxyatractyloside a structural analogue of atractyloside on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Life Sciences* 10 (17), **1971**, 961–968.
- Luo, H., Li, Q., Flower, A., Lewith, G., Liu, J. Comparison of effectiveness and safety between granules and decoction of Chinese herbal medicine: A systematic review of randomized clinical trials. *Journal of Ethnopharmacology* 140 (3), **2012**, 555–567.
- Ma, Y.-T., Huang, M.-C., Hsu, F.-L., Chang, H.-F. Thiazinedione from *Xanthium strumarium*. *Phytochemistry* 48 (6), **1998**, 1083–1085.
- Marston, A., Hostettmann, K. Counter-current chromatography as a preparative tool - applications and perspectives. *Journal of Chromatography A* 658 (2), **1994**, 315–341.
- Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry: Applications in Drug Discovery*. Wiley-VCH, **2007**, Weinheim.
- Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G. *Lebensmittelanalytik: Grundzüge, Methoden, Anwendungen*, 2nd ed. Springer-Verlag, **1992**, Berlin [etc.].
- Miyazawa, M., Okuno, Y. Volatile components from the roots of *Scrophularia ningpoensis* HEMSL. *Flavour and Fragrance Journal* 18 (5), **2003**, 398–400.
- Miyazawa, M., Okuno, Y., Nakamura, S.-i., Kameoka, H. Suppression of SOS-inducing activity of chemical mutagens by cinnamic acid derivatives from *Scrophulia ningpoensis* in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 *umu* Test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (3), **1998**, 904–910.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2), **1983**, 55–63.

- Nikles, S. Diplomarbeit - Phytochemische Untersuchungen zum Gehalt von Carboxyatractylosid und Atractylosid in *Xanthii fructus* (Cang'erzi), **2012**, Graz.
- Nikles, S., Heuberger, H., Hilsdorf, E., Bauer, R. (Eds.). Analysis of Carboxyatractyloside and Atractyloside in *Xanthii Fructus* (Cang'erzi), **2014**.
- Nikles, S., Heuberger, H., Hilsdorf, E., Schmücker, R., Seidenberger, R., Bauer, R. Influence of processing on the content of toxic Carboxyatractyloside and Atractyloside and the microbiological status of *Xanthium sibiricum* Fruits (Cang'erzi). *Planta Medica* 81 (12-13), **2015**, 1213–1220.
- Nortier, J.L., Vanherweghem, J.L. Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *Toxicology* 181-182, **2002**, 577–580.
- Obatomi, D.K., Bach, P.H. Biochemistry and toxicology of the diterpenoid glycoside Atractyloside. *Food and Chemical Toxicology* 36 (4), **1998**, 335–346.
- Obatomi, D.K., Brant, S., Anthonypillai, V., Bach, P.H. Toxicity of Atractyloside in precision-cut rat and porcine renal and hepatic tissue slices. *Toxicology and Applied Pharmacology* 148 (1), **1998**, 35–45.
- Oberverwaltungsgericht Niedersachsen. 24.10.2002-11 LC 207/02, **2002**.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G.J.-M., Brandolin, G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426 (6962), **2003**, 39–44.
- Pfaff, E., Klingenberg, M., Heldt, H.W. Unspecific permeation and specific exchange of adenine nucleotides in liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 104 (1), **1965**, 312–315.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 9th ed. China Medical Science Press, **2010**, Beijing.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015th ed. China Medical Science Press, **2015**, Beijing.
- Pharmazeutische Verarbeitungshinweise: Vorbehandlung nach traditionellen Verfahren (*paozhi*), in: Arzneibuch der Chinesischen Medizin. Monographien des Arzneibuches der Volksrepublik China 2005, 2010 und 2015. Gesamtwerk mit 16. Aktualisierungslieferung 2017, vol. 2, 2nd ed. Deutscher Apotheker Verlag, **2005, 2010 und 2015**, Stuttgart, IV. 3.
- Popat, A., Shear, N.H., Malkiewicz, I., Thomson, S., Neuman, M.G. Mechanism of *Impila* (*Callilepis laureola*)-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Clinical biochemistry* 35 (1), **2002**, 57–64.
- Poria-cocos*-Fruchtkörper, in: Europäisches Arzneibuch, vol. 2, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, pp. 2236–2237.

- Qian, J., Hunkler, D., Rimpler, H. Iridoid-related aglycone and its glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry* 31 (3), **1992**, 905–911.
- Qian, J., Hunkler, D., Safayhi, H., Rimpler, H. New iridoid-related constituents and the anti-inflammatory activity of *Scrophularia ningpoensis*. *Planta Medica* 57 (Supplement Issue 2), **1991**, A 56.
- Quintanilla, A.P., Levin, M.L., Lastre, C.C., Yokoo, H., Levin, N.W. Effect of diuretics on ADP incorporation in kidney mitochondria. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 211 (3), **1979**, 456–459.
- Radix Scrophulariae, in: Wagner, H., Bauer, R., Melchart, D., Xiao, P.-G., Staudinger, A. (Eds.), *Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicines. Thin-layer and high performance liquid chromatography of chinese drugs*, vol. 1. Springer-Verlag, **2011**, Wien, pp. 427–437.
- Reich, E., Schibli, A. (Eds.). *High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants*. Thieme, **2007**, New York.
- Ruan, G.-H., Li, G.-K. The study on the chromatographic fingerprint of *Fructus xanthii* by microwave assisted extraction coupled with GC-MS. *Journal of Chromatography B* 850 (1-2), **2007**, 241–248.
- Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G.G. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden*, 5th ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, **2013**, Stuttgart.
- Santi, R. Potassium atractylate, a new inhibitor of the tricarboxylic acid cycle. *Nature* 182 (4630), **1958**, 257.
- Scheid, V. The globalisation of Chinese medicine. *The Lancet* 354, **1999**, SIV10.
- Scherübl, R. *Qualitative und quantitative Analytik von Pflanzen aus der Traditionellen Chinesischen Medizin am Beispiel von Artemisiae scopariae herba, Saposhnikoviae radix und Siegesbeckiae herba*. Dissertation, **2014**, Regensburg.
- Schiller, K., Heilmann, J., Manns, D., Franz, G. Comparison of granules for prescription and classical decoctions by high-performance thin-layer chromatography-fingerprint analysis. *World Journal of Traditional Chinese Medicine* 1 (4), **2018**, 1–7.
- Schmider, E., Ziegler, M., Danay, E., Beyer, L., Bühner, M. Is it really robust? Reinvestigating the robustness of ANOVA against violations of the normal distribution assumption. *Methodology* 6 (4), **2010**, 147–151.
- Schmincke, C. Geschichte der TCM in China und im Westen, in: Schmincke, C. (Ed.), *Chinesische Medizin für die westliche Welt*. Springer Berlin Heidelberg, **2014**, Berlin, Heidelberg, pp. 95–103.

- Schmoltzi, P., Scherges, M. Verwechslungen chinesischer Arzneidrogen. Deutsche Apothekerzeitung 140 (36), **2000**, 36–45.
- Scrophularia* - The Plant List, **2013**.
<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Scrophulariaceae/Scrophularia/>. Accessed 22 June 2018.
- Scrophulariaceae - The Plant List, **2013**.
<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Scrophulariaceae/>. Accessed 22 June 2018.
- Scrophulariae Radix, in: Bensky, D., Clavey, S., Stöger, E. (Eds.), Chinese herbal medicine. Materia medica, 3rd ed. Eastland Press, **2004**, Seattle, WA, pp. 124–126.
- Scrophulariae Radix, in: Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 9th ed. China Medical Science Press, **2010**, Beijing, pp. 398–399.
- Scrophulariae Radix, in: Hong Kong Chinese Materia Medica Standards. Chinese Medicine Division, Department of Health, Government of the Hong Kong Special Administrative Region, **2011**, Hong Kong, pp. 279–290.
- Scrophulariae Radix (Figwort Root), in: A colored identification atlas of Chinese Materia Medica and plants as specified in the Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Peoples Medical Publishing House, **2010**, Beijing, pp. 364–365.
- Shen, X., Eichhorn, T., Greten, H.J., Efferth, T. Effects of *Scrophularia ningpoensis* HEMSL. on inhibition of proliferation, apoptosis induction and NF- κ B signaling of immortalized and cancer cell lines. Pharmaceuticals 5 (2), **2012**, 189–208.
- Shi, Y.-S., Liu, Y.-B., Ma, S.-G., Li, Y., Qu, J., Li, L., Yuan, S.-P., Hou, Q., Li, Y.-H., Jiang, J.-D., Yu, S.-S. Bioactive sesquiterpenes and lignans from the fruits of *Xanthium sibiricum*. Journal of Natural Products 78 (7), **2015**, 1526–1535.
- Song, M.-Y., Kim, E.-K., Lee, H.-J., Park, J.-W., Ryu, D.-G., Kwon, K.-B., Park, B.-H. *Fructus Xanthii* extract protects against cytokine-induced damage in pancreatic beta-cells through suppression of NF-kappaB activation. Int J Mol Med 23 (4), **2009**, 547–553.
- Stahl-Biskup, E., Reichling, J. Anatomie und Histologie der Samenpflanzen: Mikroskopisches Praktikum für Pharmazeuten, 3rd ed. Deutscher Apotheker Verlag, **2010**, Stuttgart.
- Stanislas, E., Vignais, P.M. Sur les principes toxique d'*Atractylis gummifera* L. Comptes rendus de l'Académie des Sciences (259), **1964**, 4872–4875.
- Steenkamp, P.A., Harding, N.M., van Heerden, F.R., van Wyk, B.-E. Identification of atractyloside by LC-ESI-MS in alleged herbal poisonings. Forensic Science International 163 (1-2), **2006**, 81–92.
- Stewart, M.J., Steenkamp, V. The biochemistry and toxicity of atractyloside: A review. Therapeutic Drug Monitoring 22 (6), **2000**, 641–649.
- Sticher, O., Heilmann, J., Zündorf, I. (Eds.). Hänsel/Sticher, Pharmakognosie Phytopharmazie, 10th ed., **2015**.

- Stöger, E. Drogen der traditionellen chinesischen Medizin in westlichen Ländern, in: Sticher, O., Heilmann, J., Zündorf, I. (Eds.), Hänsel/Sticher, Pharmakognosie Phytopharmazie, 10th ed., **2015**.
- Strasburger - Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften, 37th ed. Springer Berlin, **2014**, Berlin.
- Su, T., Cheng, B.C.-Y., Fu, X.-Q., Li, T., Guo, H., Cao, H.-H., Kwan, H.-Y., Tse, A.K.-W., Yu, H., Cao, H., Yu, Z.-L. Comparison of the toxicities, activities and chemical profiles of raw and processed *Xanthii Fructus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16 (24), **2016**.
- TCM-Klinik Bad Kötzting. TCM Klinik. <http://www.tcm-klinik-koetzting.de/tcmde/tcm-klinik/index.php>. Accessed 6 August 2018.
- Technische Universität München. Traditionelle Chinesische Medizin (TCM): Master of Science (M.Sc.). <https://www.tum.de/studium/studienangebot/detail/traditionelle-chinesische-medizin-tcm-master-of-science-msc/>. Accessed 7 August 2018.
- Teufelskrallenwurzel, in: Europäisches Arzneibuch, vol. 2, 9th ed. Deutscher Apotheker Verlag; Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag, **2017**, Stuttgart, Eschborn, pp. 2331–2333.
- The HPLC-MS Handbook for Practitioners, 1st ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2017**, Weinheim.
- Tohda, C., Kakihara, Y., Komatsu, K., Kuraishi, Y. Inhibitory effects of methanol extracts of herbal medicines on substance P-induced itch-scratch response. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 23 (5), **2000**, 599–601.
- Tu, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine* 17 (10), **2011**, 1217–1220.
- Turgut, M., Alhan, C.C., Gurgoze, M., Kurt, A., Dogan, Y., Tekatli, M., Akpolat, N., Aygun, A.D. Carboxyatractyloside poisoning in humans. *Annals of Tropical Paediatrics* 25 (2), **2005**, 125–134.
- Tyler, V.E. Phytomedicines: Back to the Future. *Journal of Natural Products* 62 (11), **1999**, 1589–1592.
- Uehleke, B., Frank, B., Reinhard E. Bewertung und Vergleichbarkeit von Phytopharmaka: Einführung des Begriffs „Phytoäquivalenz“. *Deutsche Apothekerzeitung* 134 (19), **1994**, 1772–1774.
- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. Memory of the World: Ben Cao Gang Mu (Compendium of Materia Medica). <http://www.unesco.org/new/en/communication-and-information/memory-of-the-world/register/full-list-of-registered-heritage/registered-heritage-page-1/ben-cao-gang-mu-compendium-of-materia-medica/>. Accessed 17 August 2018.

- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. Memory of the World: Programme Objectives. <https://en.unesco.org/programme/mow>. Accessed 17 August 2018.
- Unschuld, P.U. Chinesische Medizin, 2nd ed. Beck, **2003**, München.
- Unschuld, P.U. Traditionelle Chinesische Medizin. Beck, **2013**, München.
- Vancompernelle, K., van Herreweghe, F., Pynaert, G., van de Craen, M., Vos, K. de, Totty, N., Sterling, A., Fiers, W., Vandenabeele, P., Grooten, J. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Letters* 438 (3), **1998**, 150–158.
- Vignais, P.V., Vignais, P.M., Defaye, G. Gummiferin, an inhibitor of the adenine-nucleotide translocation. Study of its binding properties to mitochondria. *FEBS Letters* 17 (2), **1971**, 281–288.
- Vignais, P.V., Vignais, P.M., Lauquin, G., Morel, F. Binding of adenosine diphosphate and of antagonist ligands to the mitochondrial ADP carrier. *Biochimie* 55 (6), **1973**, 763–778.
- Voet, D., Pratt, C.W., Voet, J.G. *Lehrbuch der Biochemie*, 2nd ed. Wiley VCH, **2010**, Weinheim.
- Wagner, H., Bauer, R., Melchart, D., Xiao, P.-G., Staudinger, A. (Eds.). *Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicines: Thin-layer and high performance liquid chromatography of chinese drugs*. Springer-Verlag, **2011**, Wien.
- Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E.M. *Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen*. Springer, **1983**, Berlin, New York.
- Wang, M., Franz, G. The role of the European Pharmacopoeia (Ph Eur) in quality control of Traditional Chinese Herbal Medicine in European member states. *World Journal of Traditional Chinese Medicine* 1 (1), **2015**, 5–15.
- Wang, S., Hua, Y., Xu, L., Zou, L., Liu, X., Luo, Y., Liu, J., Yan, Y. Quality evaluation of *Scrophulariae Radix* processed by different ‘sweating’ methods based on simultaneous determination of multiple bioactive constituents combined with grey relational analysis. *Molecules* 21 (7), **2016**, 850.
- Wang, Y., Han, T., Xue, L.-M., Han, P., Zhang, Q.-Y., Huang, B.-K., Zhang, H., Ming, Q.-L., Peng, W., Qin, L.-P. Hepatotoxicity of kaurene glycosides from *Xanthium strumarium* L. fruits in mice. *Die Pharmazie* 66 (6), **2011**, 445–449.
- Wanner, G. *Mikroskopisch-botanisches Praktikum*, 2nd ed. Thieme, **2004**, Stuttgart.
- Weil, C.S. Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD 50 or ED 50) and instructions in their use. *Biometrics* 8 (3), **1952**, 249.
- Wu, Q., Yuan, Q., Liu, E.-H., Qi, L.-W., Bi, Z.-M., Li, P. Fragmentation study of iridoid glycosides and phenylpropanoid glycosides in *Radix Scrophulariae* by rapid resolution

- liquid chromatography with diode-array detection and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 24 (8), **2010**, 808–819.
- Wu, X., Wang, S., Lu, J., Jing, Y., Li, M., Cao, J., Bian, B., Hu, C. Seeing the unseen of Chinese herbal medicine processing (*Paozhi*): advances in new perspectives. *Chinese Medicine* 13, **2018**, 4.
- X A Determination of extractives: Determination of water-soluble extractives, hot extraction method, in: *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, 9th ed. China Medical Science Press, **2010**, Beijing, A-77.
- Xanthii fructus, in: *A colored identification atlas of Chinese Materia Medica and plants as specified in the Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. Peoples Medical Publishing House, **2010**, Beijing, pp. 504–505.
- Xanthii fructus, in: *Arzneibuch der Chinesischen Medizin. Monographien des Arzneibuches der Volksrepublik China 2005, 2010 und 2015. Gesamtwerk mit 16. Aktualisierungslieferung 2017*, vol. 2, 2nd ed. Deutscher Apotheker Verlag, **2005, 2010 und 2015**, Stuttgart.
- Xanthii fructus, in: *Hong Kong Chinese Materia Medica Standards*, vol. 5. Chinese Medicine Division, Department of Health, Government of the Hong Kong Special Administrative Region, **2012**, Hong Kong, pp. 507–520.
- Xanthii Fructus, in: *Chinese Herbal Medicine: Materia Medica*, 3rd ed. Eastland Press Inc, **2004**, Seattle, Washington, pp. 39–41.
- Xanthii Fructus, in: *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, 9th ed. China Medical Science Press, **2010**, Beijing, p. 461.
- Xanthii Fructus, in: *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, 2015th ed. China Medical Science Press, **2015**, Beijing, pp. 481–482.
- Xanthium sibiricum* PATRIN EX WIDDER. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-9198>. Accessed 28 June 2018.
- Xue, L.-M., Zhang, Q.-Y., Han, P., Jiang, Y.-P., Yan, R.-D., Wang, Y., Rahman, K., Jia, M., Han, T., Qin, L.-P. Hepatotoxic constituents and toxicological mechanism of *Xanthium strumarium* L. fruits. *Journal of Ethnopharmacology* 152 (2), **2014**, 272–282.
- Yang, L., Su, Z., Zeng, X., Li, X., Wu, Z., Xu, S., Yan, Y. Quality assessment of *Fructus xanthii* based on fingerprinting using high-performance liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 95 (4), **2012**, 1053–1058.
- Yu, J., Song, M.-Z., Wang, J., Li, Y.-F., Lin, P., Que, L., Bao, Z. *In vitro* cytotoxicity and *in vivo* acute and chronic toxicity of Xanthii Fructus and its processed product. *BioMed Research International*, **2013**, 1–12.

- Zhang, J., Ip, F.C.F., Tong, E.P.S., Chan, K.W., Li, L.-C., Ng, Y.P., Ip, N.Y. Ningpoensines A–C: unusual zwitterionic alkaloids from *Scrophularia ningpoensis*. *Tetrahedron Letters* 56 (40), **2015**, 5453–5456.
- Zhang, Y., Cao, G., Ji, J., Cong, X., Wang, S., Cai, B. Simultaneous chemical fingerprinting and quantitative analysis of crude and processed Radix Scrophulariae from different locations in China by HPLC. *Journal of Separation Science* 34 (12), **2011**, 1429–1436.
- Zhao, Z., Guo, P., Brand, E. The formation of *daodi* medicinal materials. *Journal of Ethnopharmacology* 140 (3), **2012**, 476–481.
- Zhou, X., Razmovski-Naumovski, V., Chan, K. A multivariate analysis on the comparison of raw notoginseng (*Sanqi*) and its granule products by thin-layer chromatography and ultra-performance liquid chromatography. *Chinese medicine* 10 (13), **2015**.

10 Anhang

UPLC-MS Analyseergebnisse für die Referenzlösungen CATR/ ATR und verschiedene *Xanthium*-Extrakte nach Methode IX (4.2.1.3).

Referenzlösungen CATR/ ATR

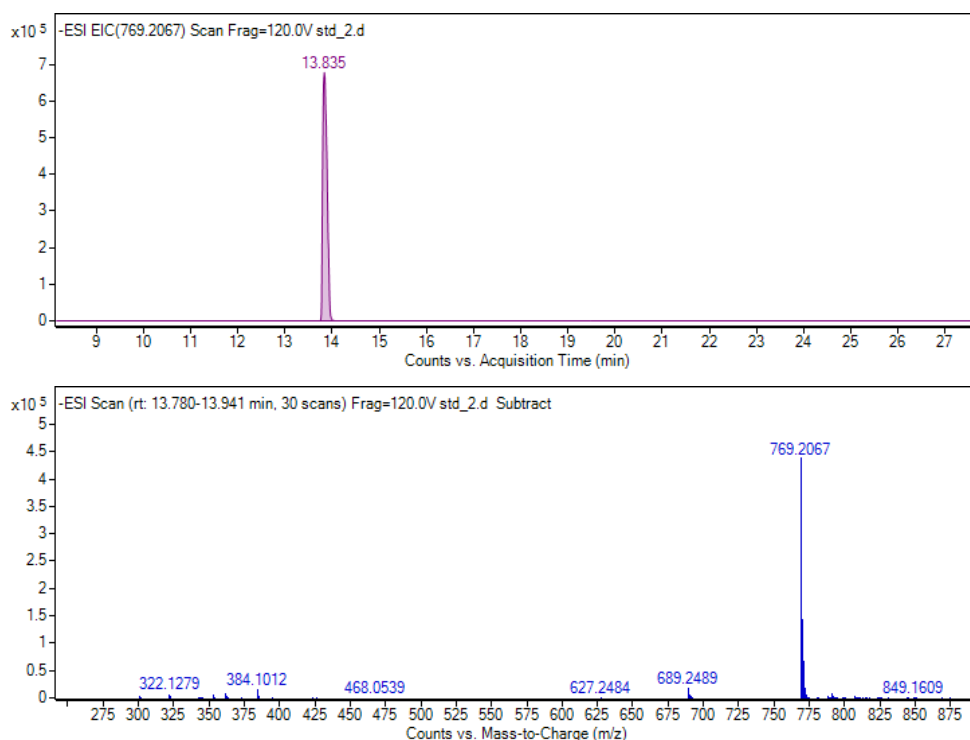


Abbildung 112 oben: ESI-EIC von m/z 769,2067 [M-H]⁻ bei 13,835 min; unten: MS-Spektrum 13,780-13,941 min.

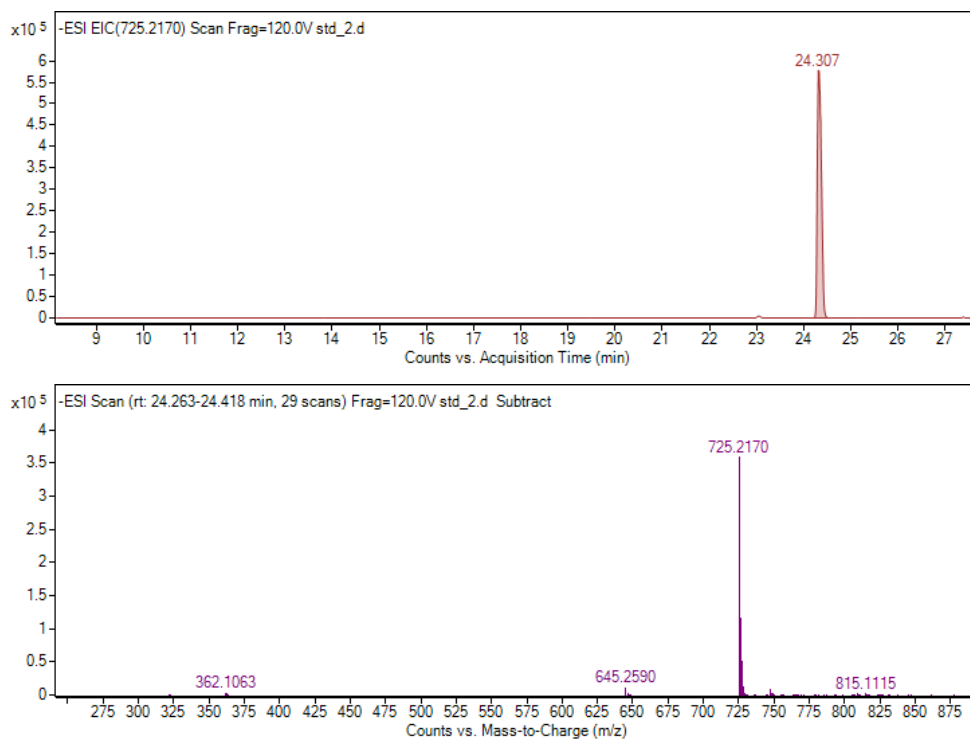


Abbildung 113 oben: ESI-EIC von m/z 725,2170 [M-H]⁻ bei 24,307 min; unten: MS-Spektrum 24,263-24,418 min.

Probe Sinophyto 01270638

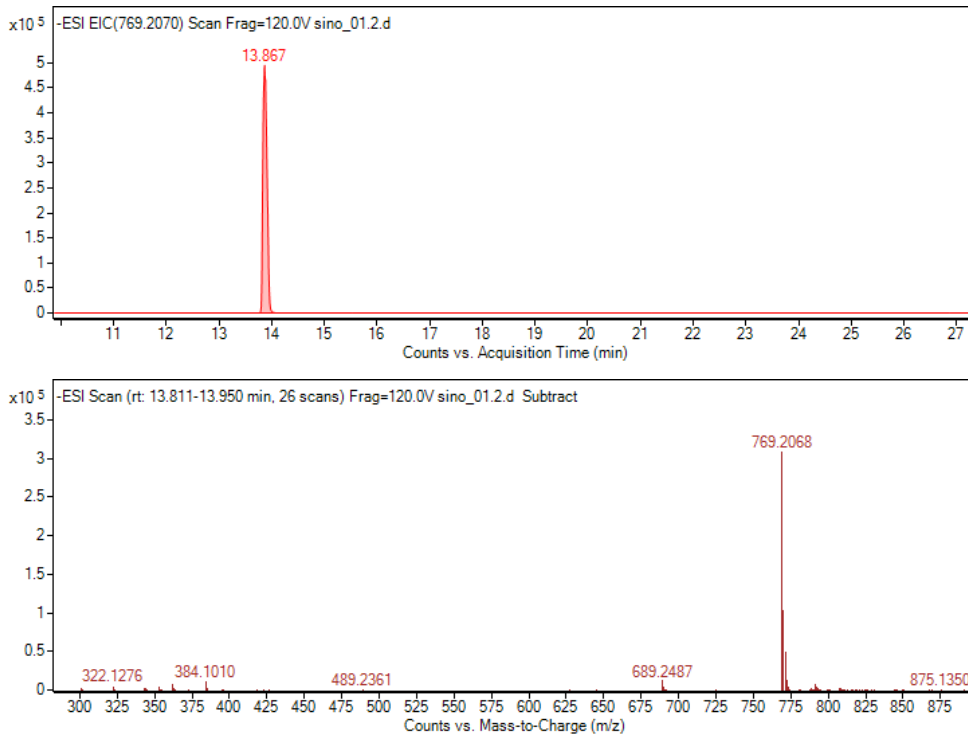


Abbildung 114 oben: ESI-EIC von m/z 769,2070 [M-H]⁻ bei 13,867; unten: MS-Spektrum 13,811-13,950 min.

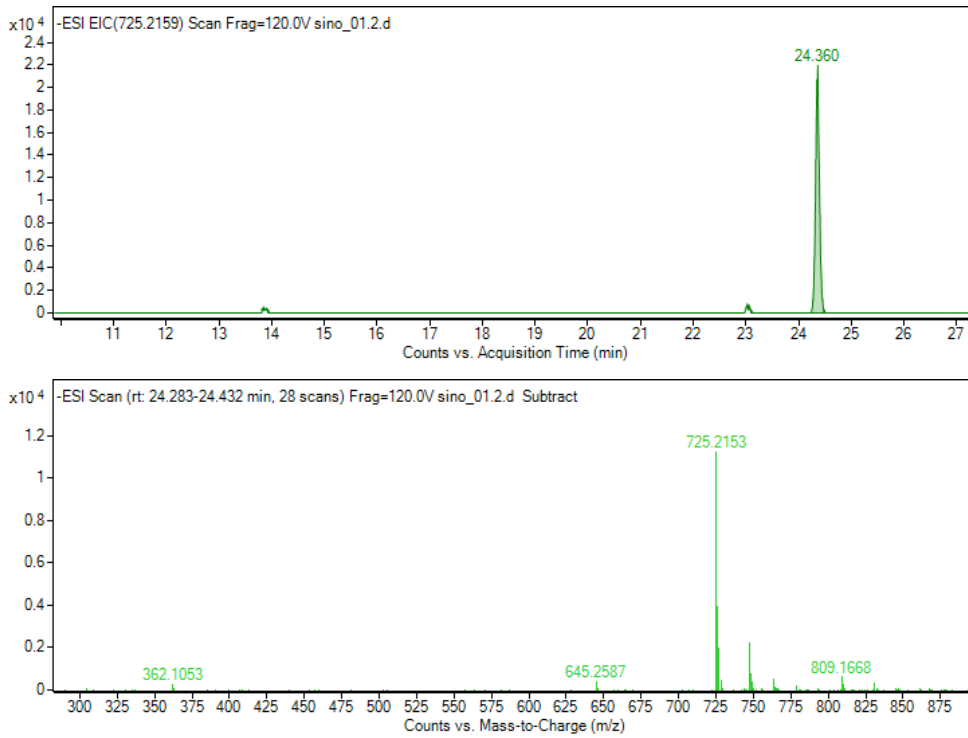


Abbildung 115 oben: ESI-EIC von m/z 725,2159 [M-H]⁻ bei 24,360 min; unten: MS-Spektrum 24,283-24,432 min.

Probe Sinophyto 02310340

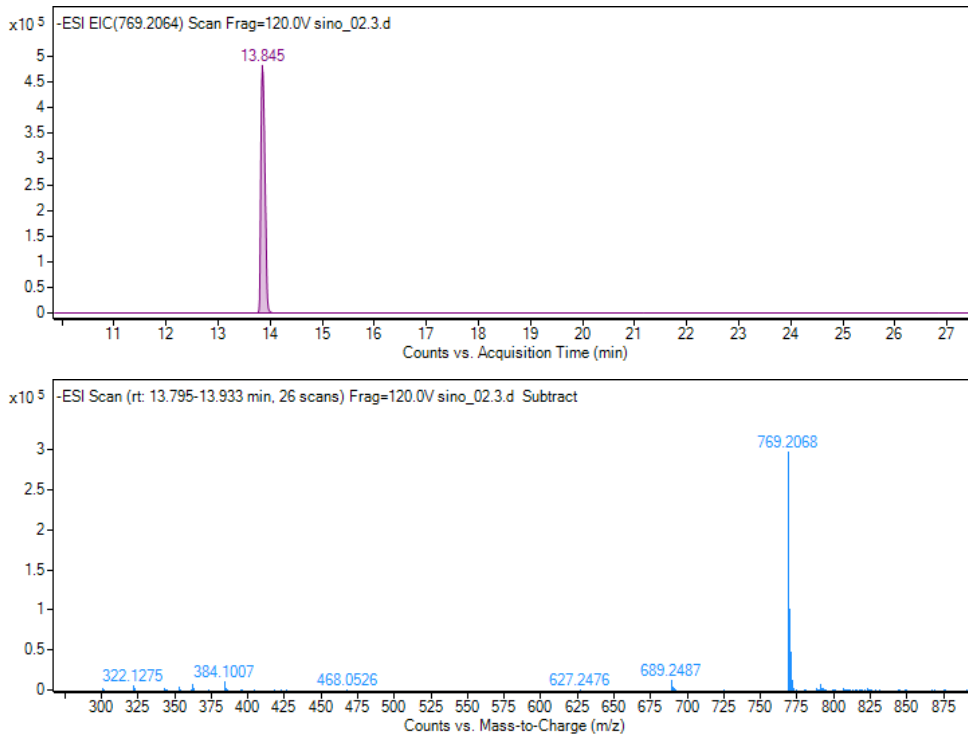


Abbildung 116 oben: ESI-EIC von m/z 769,2064 [M-H]⁻ bei 13,845; unten: MS-Spektrum 13,795-13,933 min.

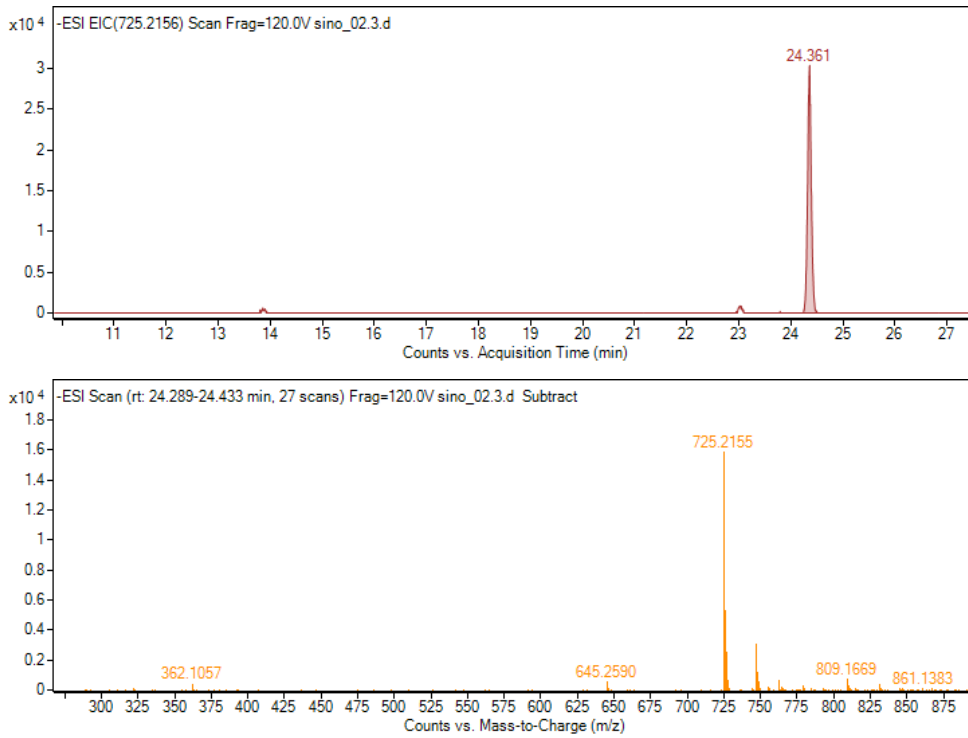


Abbildung 117 oben: ESI-EIC von m/z 725,2156 [M-H]⁻ bei 24,361 min; unten: MS-Spektrum 24,289-24,433 min.

Probe Herbasinica 150801H164

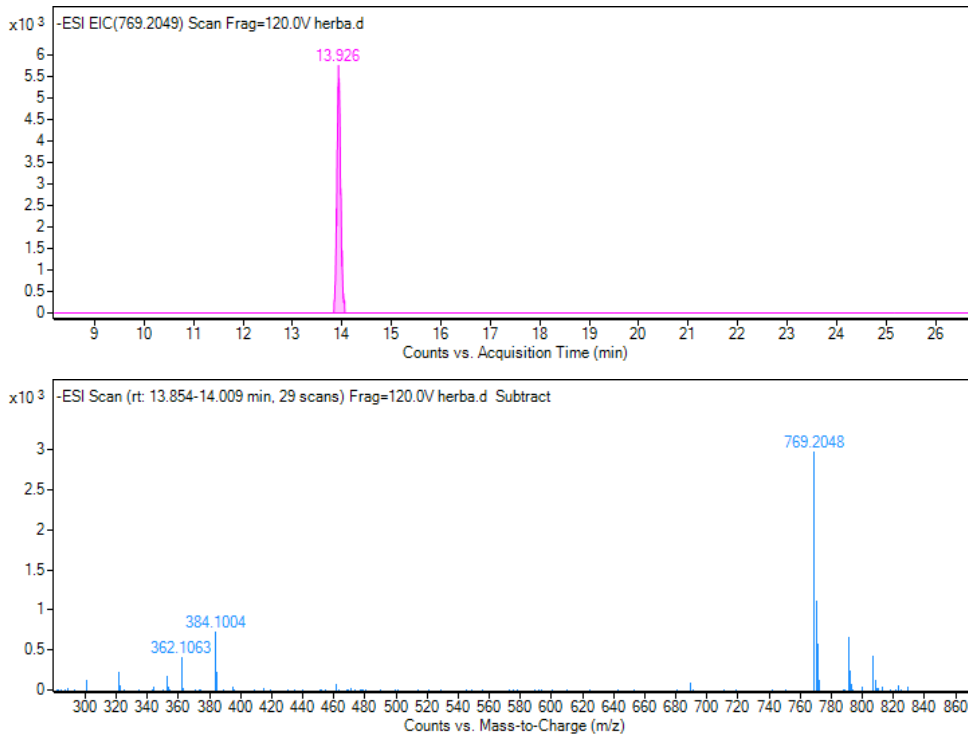


Abbildung 118 oben: ESI-EIC von m/z 769,2049 [M-H]⁻ bei 13,926; unten: MS-Spektrum 13,854-14,009 min.

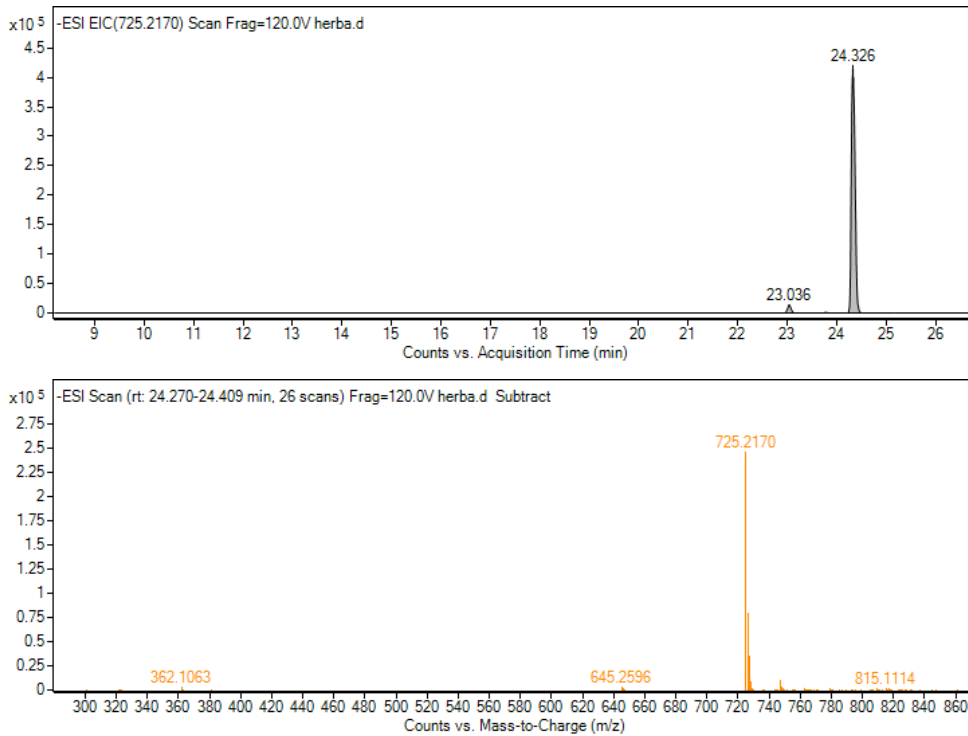


Abbildung 119 oben: ESI-EIC von m/z 725,2170 [M-H]⁻ bei 24,326 min; unten: MS-Spektrum 24,270-24,409 min.

Probe Chinamedica

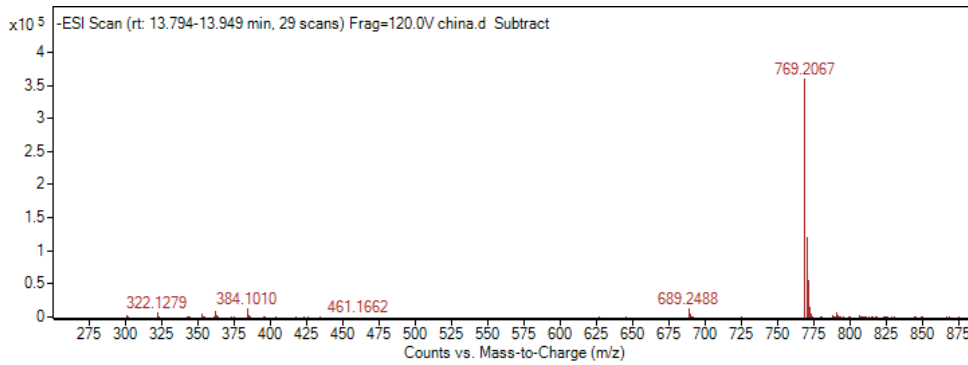
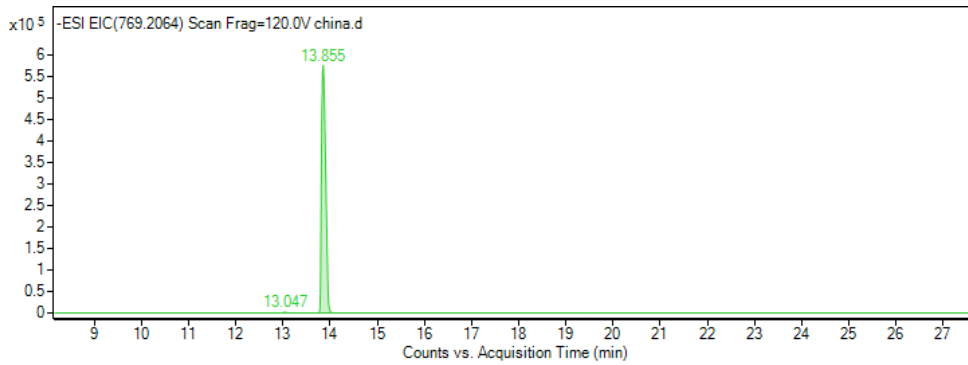


Abbildung 120 oben: ESI-EIC von m/z 769,2064 [M-H]⁻ bei 13,855 min; unten: MS-Spektrum 13,794-13,949 min.

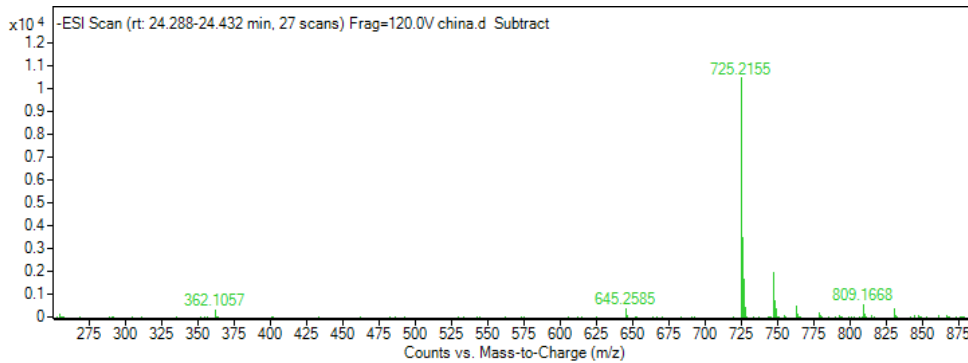
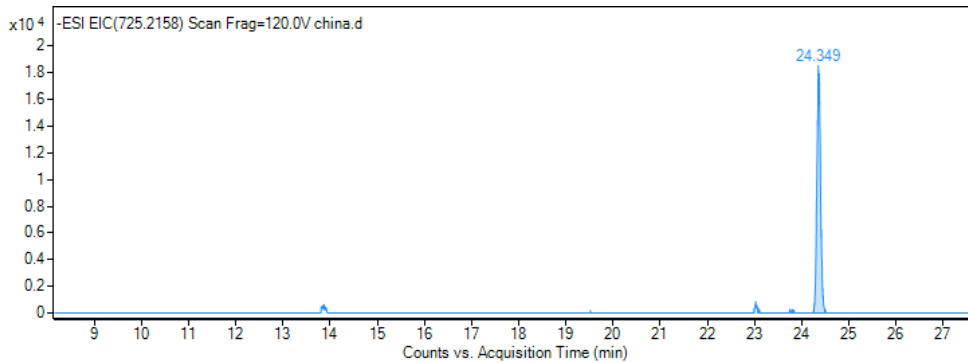


Abbildung 121 oben: ESI-EIC von m/z 725,2158 [M-H]⁻ bei 24,329 min; unten: MS-Spektrum 24,288-24,432 min.

Probe Plantasia

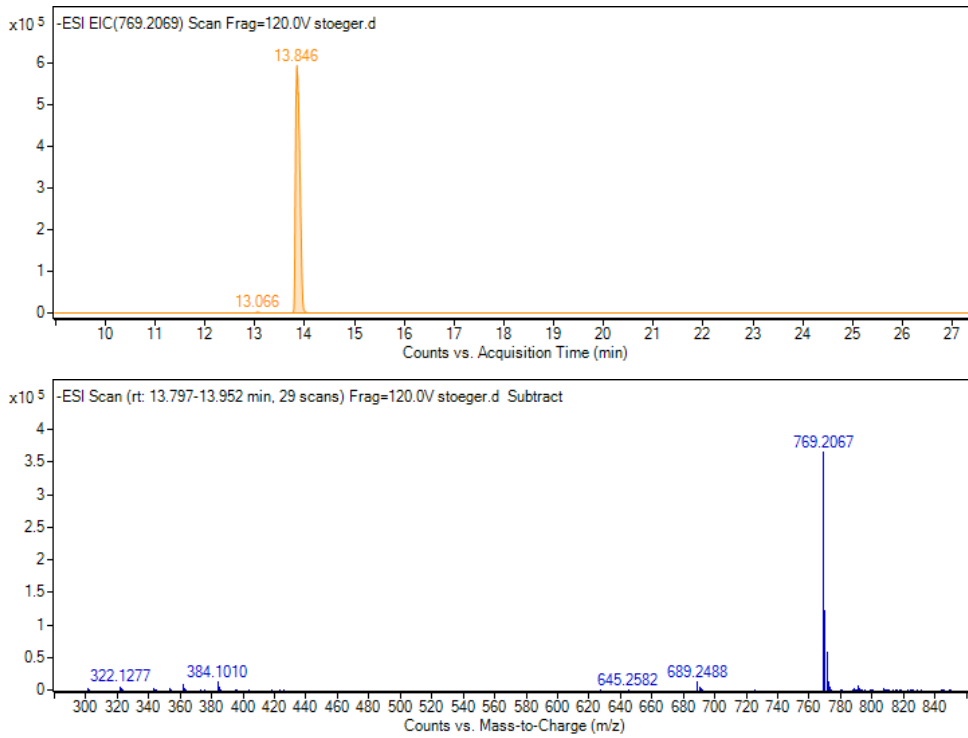


Abbildung 122 oben: ESI-EIC von m/z 769,2069 [M-H]⁻ bei 13,846 min; unten: MS-Spektrum 13,797-13,952 min.

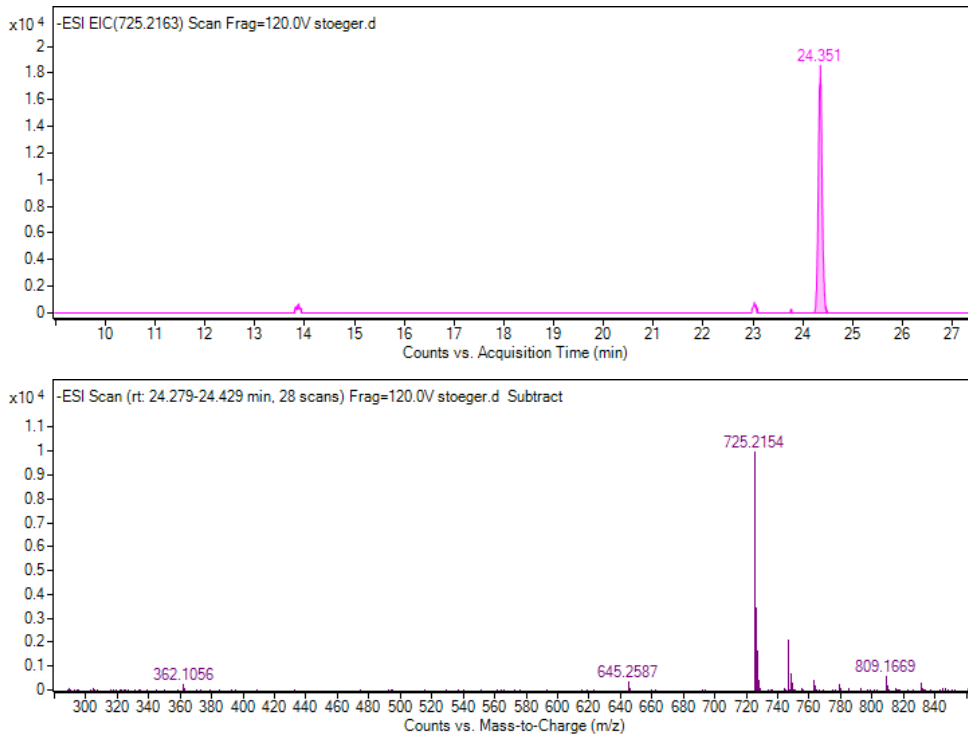


Abbildung 123 oben: ESI-EIC von m/z 725,2163 [M-H]⁻ bei 24,351 min; unten: MS-Spektrum 24,279-24,429 min.

Probe Dr. Mei Wang 20131101

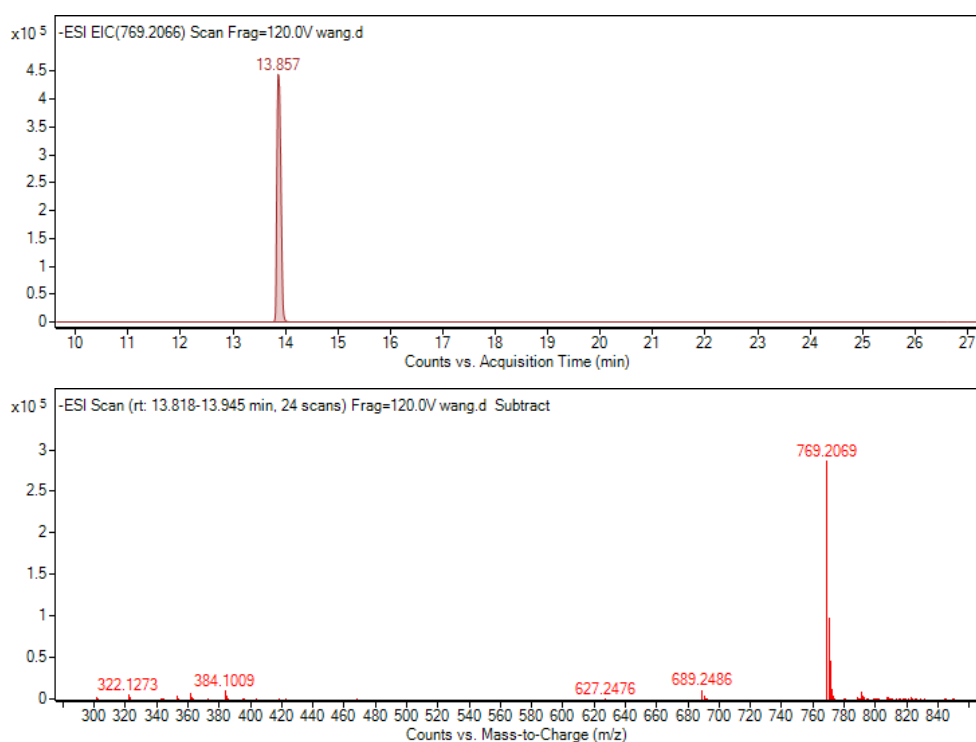


Abbildung 124 oben: ESI-EIC von m/z 769,2066 [M-H]⁻ bei 13,857 min; unten: MS-Spektrum 13,818-13,945 min.

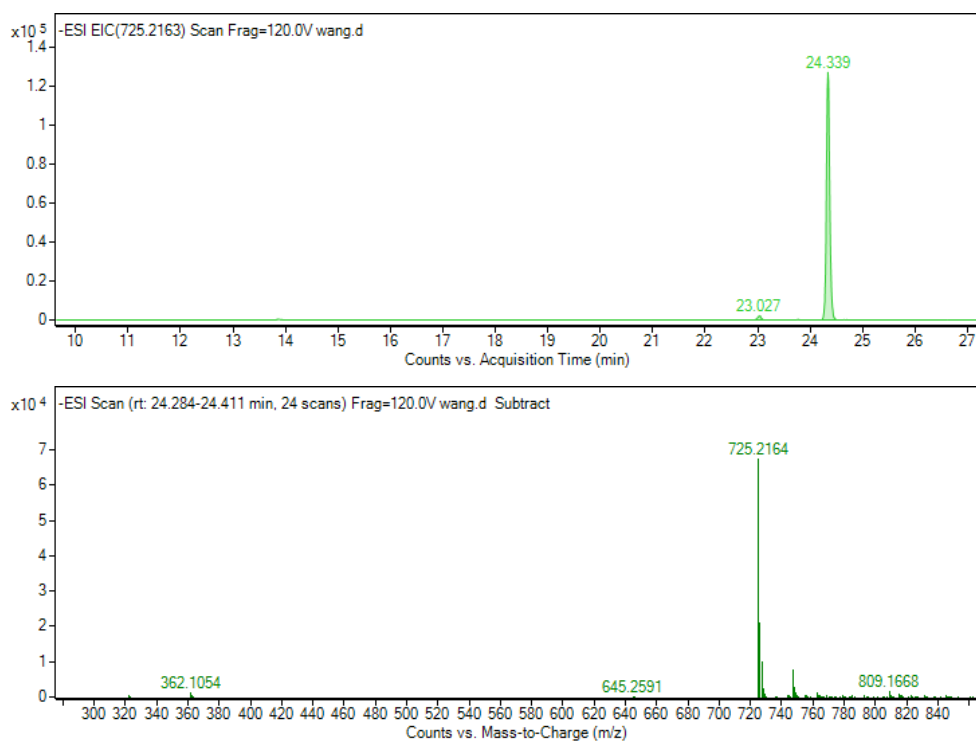


Abbildung 125 oben: ESI-EIC von m/z 725,2163 [M-H]⁻ bei 24,339 min; unten: MS-Spektrum 24,284-24,411 min.

Probe Arobemed

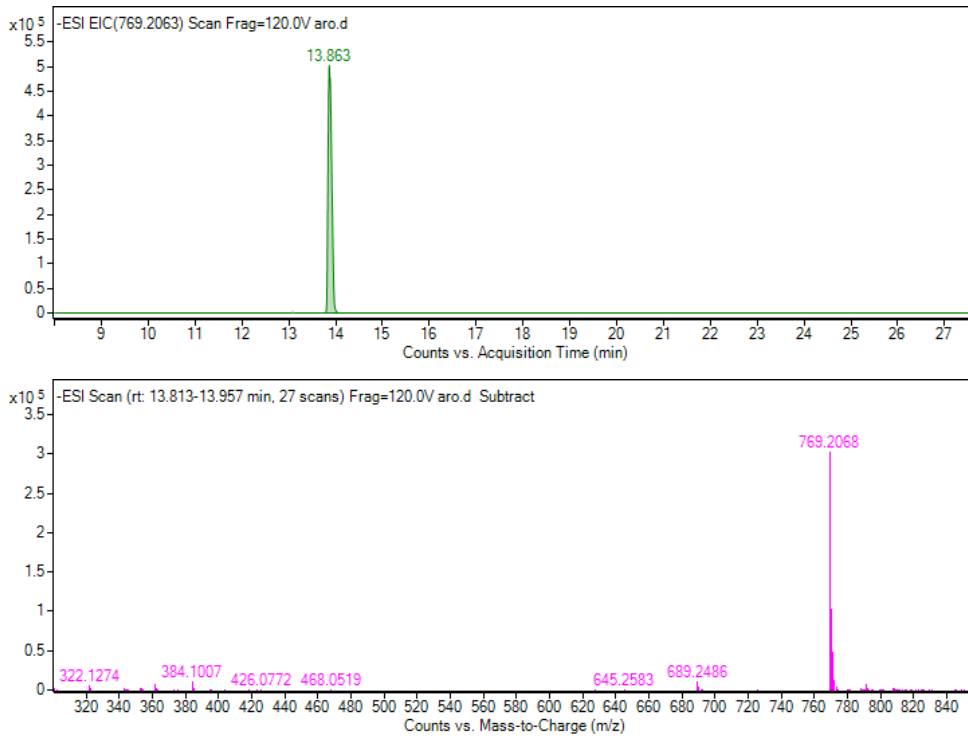


Abbildung 126 oben: ESI-EIC von m/z 769,2063 [M-H]⁻ bei 13,863 min; unten: MS-Spektrum 13,813-13,957 min.

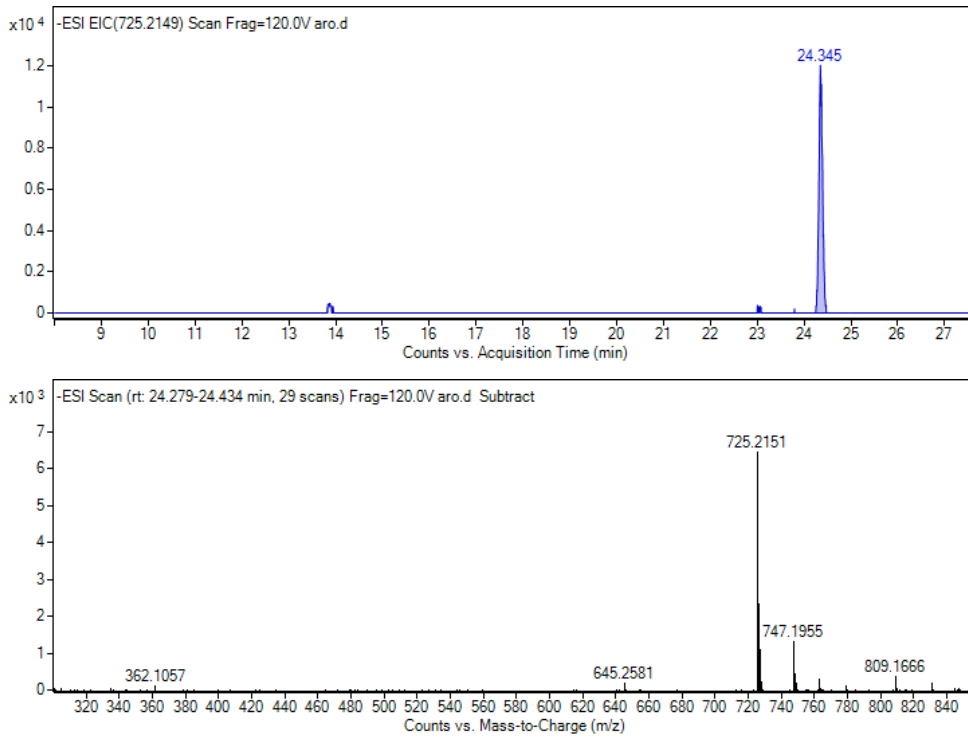


Abbildung 127 oben: ESI-EIC von m/z 725,2149 [M-H]⁻ bei 24,345 min; unten: MS-Spektrum 24,279-24,434 min.

11 Erklärung zur Eigenständigkeit

Hiermit erkläre ich, dass ich vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche gekennzeichnet.

Regensburg, den

Unterschrift