



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Erstellung der Monographien „Safran“ und „Meisterwurz“ für das
Österreichische Arzneibuch

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin: Katharina Waldbauer
Matrikel-Nummer: 0501149
Studienrichtung (lt. Studienblatt): Pharmazie
Betreuerin / Betreuer: Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp

Wien, am 20. Jänner 2011

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
2. MATERIAL	2
2.1.DROGENMATERIAL ZUR UNTERSUCHUNG	2
2.2.CHEMIKALIEN	5
2.3.REINSUBSTANZEN.....	6
3. METHODEN UND GERÄTE	7
3.1.MIKROSKOPIE.....	7
3.2.EXTRAKTIONSMETHODEN	7
3.3.DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE.....	7
3.4.HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY	8
3.5.METHODEN DER REINHEITSPRÜFUNG	10
3.6.DESTILLATION DES ÄTHERISCHEN ÖLS	10
4. CROCUS SATIVUS (L.).....	11
4.1.QUALITÄTSBESTIMMENDE INHALTSSTOFFE.....	13
4.2.Obsolete Methoden der Qualitätsprüfung.....	16
4.3.Bedeutung einer Gehaltsbestimmung mittels High Performance Liquid Chromatography	16
4.4.ERGEBNISSE	17
4.4.1. Die HPLC-Methode	17
4.4.2. Auswahl des externen Standards	18
4.4.3. Herstellung der Messlösungen	26
4.4.4. Quantifizierung.....	26
4.4.5. Messergebnisse	28
4.4.6. Reproduzierbarkeit	40
4.4.7. Diskussion.....	41
4.4.8. Überarbeiteter Monographievorschlag.....	42

5. PEUCEDANUM OSTRUTHIUM (L.) KOCH	48
5.1. BOTANIK UND VERBREITUNG.....	48
5.2. TRADITIONELLE ANWENDUNG	50
5.3. INHALTSSTOFFE DER WURZEL	56
5.4. PHARMAKOLOGISCH BELEGTE WIRKSAMKEIT.....	57
5.5. ERGEBNISSE	58
5.5.1. Makroskopische Merkmale der unterirdischen Teile	58
5.5.2. Mikroskopie der unterirdischen Teile	61
5.5.3. Dünnschichtchromatographie.....	70
5.5.4. Extraktionsmethoden	73
5.5.5. Prüfung auf Reinheit	75
5.5.6. Gehaltsbestimmung.....	78
5.5.7. Diskussion.....	87
5.5.8. Monographieentwurf „Meisterwurz“	88
6. ZUSAMMENFASSUNG	94
7. SUMMARY.....	95
8. LITERATURVERZEICHNIS	96

ANHANG

Curriculum vitae

Danksagung

Aufrichtig danken möchte ich an dieser Stelle jenen Menschen, durch deren Unterstützung das Entstehen meiner Diplomarbeit möglich war.

Frau Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp für die Aufnahme in das Diplmandenkolleg zur Überarbeitung von Monographien für das Österreichische Arzneibuch, sowie für die Betreuung bei der praktischen Arbeit, bei der Erstellung des Monographie-Entwurfes und dem Verfassen der Diplomarbeit.

A.o. Univ. Prof. Mag. Dr. Johannes Saukel für die Unterstützung bei der mikroskopischen Arbeit und der zeichnerischen Darstellung.

Frau Laborassistentin Brigitte Krones für das zur Verfügung stellen des Arbeitsplatzes im Studentenlabor und der Geräte für die Prüfungen nach dem Europäischen Arzneibuch.

Besonderen Dank widme ich Frau Mag. Sylvia Vogl und Frau Mag. Judith Singhuber, an die ich mich zu jeder Zeit mit labortechnischen oder wissenschaftlichen Fragen wenden durfte. Ihre Ratschläge und Erklärungen begleiteten und erleichterten meine erste selbstständig wissenschaftliche Arbeit an der Universität maßgeblich.

Aus dem Diplmandenkolleg danke ich Frau Monika Heß für die Vorarbeit bezüglich der Gehaltsbestimmung an der Monographie „Safran“ und Herrn Stefan Brenner für die Hilfe in EDV-technischen Fragen.

Zu guter Letzt richte ich den Dank an meine Familie.

An meine Eltern Johanna und Johannes Waldbauer, die mich in allen Lebenslagen unterstützen und mir alle Möglichkeiten für mein Studium geschaffen haben.

Ebenso an meine Tante Mag. pharm. Liselotte Gehringer und meinen Onkel Dipl.-Ing. Peter Gehringer für die Inspiration und den Zuspruch in allen Zeiten des Ausbildungsweges.

Abkürzungen

AUC	Area Under the Curve
AW	Auswaage
bzw.	beziehungsweise
DC	Dünnschichtchromatographie; dünnsschichtchromatographisch
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care
EW	Einwaage
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
k.A.m.	keine Auswertung möglich
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LTD	Limited
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
n.e.	nicht entsprechend
p. a.	pro analysi
Ph. Eur.	Pharmacopoeia Europaea
Rf-Wert	Retentionsfaktor-Wert
rpm	rounds per minute
ÖAB	Österreichisches Arzneibuch
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
usw.	und so weiter
z.B.	zum Beispiel

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Katharina Waldbauer

1 Einleitung

Als Mitglied der Europäischen Union ist für Österreich das Europäische Arzneibuch bzw. dessen deutsche Fassung, die mittels Verordnung des Bundesministeriums für Gesundheit in Kraft gesetzt wird, wie für alle Länder der Europäischen Union verbindlich. Ergänzt wird die Europäische Pharmakopöe (Ph. Eur.) durch das, ebenfalls durch Verordnung in Kraft gesetzte, Österreichische Arzneibuch (ÖAB), das ausschließlich Monographien enthält, die nicht in der Ph. Eur. aufgenommen sind.

Herausgegeben wird das ÖAB durch das Bundesministerium für Gesundheit, dem die Österreichische Arzneibuchkommission als beratendes Organ zur Verfügung steht.

Von dieser wurde die ÖAB-Expertenkommission mit der grundlegenden Überarbeitung des ÖAB beauftragt. Die Zielsetzung der ÖAB-Expertenkommission ist die Anpassung des ÖAB an das Europäische Arzneibuch, vor allem den „Allgemeinen Teil“ des ÖAB betreffend, weiters die Streichung jener Monographien, die bereits in der Ph. Eur. enthalten sind, bzw. die nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft, als obsolet anzusehen sind. Ebenfalls fällt in den Aufgabenbereich der ÖAB-Expertengruppe die Aktualisierung der im ÖAB verbleibenden Monographien, sowie die Ausarbeitung neuer Monographien für das ÖAB.

Als Mitglied der ÖAB-Expertengruppe und der ÖAB-Arzneibuchkommission erhielt Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp den Auftrag für die Überarbeitung von Monographien oder deren Ausarbeitung, betreffend Arzneidrogen und deren Zubereitungen. Dafür wurde ein Diplomandenkolleg am Departement für Pharmakognosie der Universität Wien eingerichtet, dem ich mich anschließen durfte.

Gegenstand meiner Diplomarbeit ist die Erstellung der Monographie „Meisterwurz“, die neu in das ÖAB aufgenommen werden soll, sowie die Ergänzung der Monographie „Safran“ um den Punkt „Gehaltsbestimmung“.

2 Material

2.1 Drogenmaterial zur Untersuchung

Die folgende Tabelle zeigt die für die Gehaltsbestimmung zur Verfügung stehenden Proben von *Crocus sativus* (L.).

Code	Quelle	Ablauf	Identitäts- und Reinheitsprüfung
1	KWIZDA Chnr. 924035	06/2012	entsprechend
2	RICHTER Chnr. 147938	06/2010	entsprechend
3	SONNENTOR Chnr. WO 08100903F03;	10/2010	entsprechend
4	Gahestan Saffron, Iran Chnr. unbekannt	nicht angegeben	nicht entsprechend (n. e.) bei der Reinheitsprüfung (Sulfatasche)
5	Geschäft für Traditionelle Chinesische Medizin (TCM) Chengdu, China	nicht angegeben	n. e. bei der Identitätsprüfung
6	Geschäft für TCM Chengdu, China	nicht angegeben	n. e. bei der Identitätsprüfung
7	Xin De Chinese Medicinal Herbs Processing Factory Shanghai Traditional Chinese Drugs Co. Limited (LTD.) Shanghai, China	nicht angegeben	n. e. bei der Identitätsprüfung
8	Shanghai Hua Yu Chinese Herbs Co. LTD Shanghai, China	nicht angegeben	n. e. bei der Identitätsprüfung

Tabelle 1. Herkunft des Untersuchungsmaterials zu Safran

Die Identitäts- und Reinheitsprüfungen des Drogenmaterials wurden in der vorangegangenen Diplomarbeit von Monika Heß (2010) durchgeführt.

Zur Erstellung der Arzneibuchmonographie „Meisterwurz“ standen folgende Proben von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH zur Verfügung:

Code	Quelle	Ablauf
KHWPO1	Kottas Chnr. 2634	04/2010
KHWPO2	Kwizda Chnr. 9201025	05/2011
KHWPO3	Galke Chnr. 16000	11/2012
KHWPO4	Richter Chnr. 156567	04/2013
KHWPO5	Wildsammlung Katschberg 16.7.2008	-
KHWPO6	Wildsammlung Weißenbachtal 18.7.2008	-
KHWPO7	Caelo Chnr. 09161905	12/2010
KHWPO8	Kottas Chnr. 9110258#2	05/2012

Tabelle 2. Herkunft des Untersuchungsmaterials zu Meisterwurz

Zu Vergleichszwecken standen Proben anderer Apiaceen zur Verfügung:

Code	Pflanzenart	Quelle
CA	Chaerophyllum aromaticum (L.)	Wilsammlung Laaab im Walde 30.6.2010
AP	Aegopodium podagraria (L.)	Wilsammlung Laaab im Walde 30.6.2010
B	Pimpinellae Radix	Teedrogenlager Universität Wien
A	Angelicae Radix	Teedrogenlager Universität Wien
Pe	Petroselini Radix	Teedrogenlager Universität Wien
Pa	Pastinacae Radix	Teedrogenlager Universität Wien
L	Levistici Radix	Teedrogenlager Universität Wien
S	Apiae Radix	Teedrogenlager Universität Wien

Tabelle 3. Herkunft der Vergleichsdrogen zu Meisterwurz

Meisterwurzschnaps: hergestellt mit Korn (38 % Ethanol):

Code	Wilsammlungen in Österreich	Herstellung aus unter- irdischen Teilen:
S 1	Weißpriachtal (Salzburg), 2009	frischer Pflanzen
S 2	Riedingtal (Salzburg), 2009	getrockneter Pflanzen
S 3	Katschberg (Kärnten), 2007	frischer Pflanzen
S 4	Königsalm (Niederösterreich), 2008	frischer Pflanzen

Tabelle 4. Herkunft und Zubereitungsart der Meisterwurzschnäpse

2.2 Chemikalien

Acetonitril p.a. (MeCN)	VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Chloralhydrat <i>R</i>	laut Ph. Eur. 6
Dichlormethan p.a.	VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Dietylether p.a.	VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 60 %	hergestellt aus Essigsäure 100 % und Wasser p.A.
Ethanol p.a.	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylacetat p.a.	VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Methanol p.a. (MeOH)	VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland entspricht Methanol <i>R</i> des Ph.Eur. 6
NaCl-Lösung, gesättigt	hergestellt aus NaCl (bezogen bei KWIZDA, Wien, Österreich)
Salzsäure <i>R</i>	laut Ph. Eur. 6 (73g/l)
Toluol	VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Wasser p. a.	entionisiertes, destilliertes Wasser Herstellung Universität Wien entspricht Wasser <i>R</i> des Ph.Eur. 6

2.3 Reinsubstanzen

Crocin 1	Chengdu Mansite Pharmaceutical Co. LTD, Chengdu, China Reinheit > 97 %
Crocin	Sigma-Aldrich, Wien, Österreich keine Angabe zur Reinheit
Crocin 2	Chengdu Mansite Pharmaceutical Co. LTD, Chengdu, China Reinheit > 98 %
Imperatorin	LGC Standards GmbH (Vertrieb von ChromaDex International) Wesel, Deutschland Reinheit > 97 %
Scopoletin	Extrasynthese, Genay, Frankreich keine Angabe zur Reinheit

3 Methoden und Geräte

3.1 Mikroskopie

Mikroskop	Nikon Labophot-2
Mikroskop mit bildgebender Technik	Nikon Labophot-2 Kamera: Cmex 5000 Software: Image Focus Version 2

3.2 Extraktionsmethoden

Accelerated Solvent Extractor (ASE) Meisterwurz: 3 Extraktionszyklen

Ultraschallbad	Meisterwurz: a) 5 Minuten bei Raumtemperatur b) 15 Minuten bei Raumtemperatur c) 15 Minuten bei 40 °C Safran: 15 Minuten unter Eiskühlung und Lichtausschluss
----------------	---

Wasserbad unter Rückflusskühlung	Meisterwurz: a) 5 Minuten bei 40°C b) 15 Minuten bei 40 °C
----------------------------------	---

Wasserbad	Meisterwurz: a) 5 Minuten bei 40°C b) 30 Sekunden bei 100°C
-----------	--

3.3 Dünnschichtchromatographie

Platte 1: Thin Layer Chromatography (TLC):
Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Alufolie
20 x 20 cm
Merck, Darmstadt, Deutschland

Platte 2: High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)
Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Glas
10 x 10 cm
Merck, Darmstadt, Deutschland

3.4 High Performance Liquid Chromatography

Instrument 1: **Shimadzu**

Pumpe: LC-10AD

Degasser: DGU-14A

Controller: SCL-10A

Autosampler: SIL-10AD

Detektor: Photodiode Array Detector (SPD-M10A)

Software: Shimadzu LC Solution Version 1.03 SP5

Instrument 2: **Shimadzu**

Pumpe: LC-20AD

Degasser: DGU-20A5

Controller: CBM-20A

Autosampler: SIL-20AC HT

Detektor: Photodiode Array Detector (SPD-M20A)

Säulenofen: CTO-20AC

Software: Shimadzu LC Solution Version 1.2

Instrument 3: **Shimadzu**

Pumpe: LC-20AD

Degasser: DGU-20A5

Controller: CBM-20A

Autosampler: SIL-20AC HT

Detektor: Photodiode Array Detector (SPD-M20A)

Säulenofen: CTO-20AC

Software: Shimadzu LC Solution Version 1.2

gekoppelt mit einem Niedrig-Temperatur-Lichtstrahldetektor: ELSD-LT

Instrument 4 : **UltiMate 3000 RS-LC**
gekoppelt an 3D Quadropol Ionenfallenmassenspektrometer mit orthogonaler Elektronensprayionisationsquelle
Kapillarspannung: -0,4 V
Nebulizer: 20 psi (N₂)
Kollisionsgas: Helium
Akquisition des Massenspektrometers:
1. Detektion: MS scan (*m/z* 100-700)
2. Detektion: MS² scan: 2 Vorläuferionen mit höchster Amplitude
(*m/z* 40-700, 0.7 V)
3. Detektion: MS³ scan: Ion mit höchster Amplitude im MS² scan
(*m/z* 40-700, 1.0 V)

Säule 1: BDS Hypersil C18
Thermo Hypersil-Keystone Inc., Bellefonte, United States
Länge: 250 mm
Durchmesser. 4,6 mm
Partikelgröße: 5 µm

Säule 2: Luna C18 (2)
Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Länge: 250 mm
Durchmesser. 4,6 mm
Partikelgröße: 5 µm

Säule 3: Dionex Acclaim 120 C18
Dionex, Germering, Deutschland
Länge: 150 mm
Durchmesser: 2,1 mm
Partikelgröße: 3 µm

3.5 Methoden der Reinheitsprüfung

Durchführung laut folgenden Vorschriften des allgemeinen Teils des Ph.Eur. 6:

- Prüfung auf fremde Bestandteile (2.8.2)
- Trocknungsverlust (2.2.32)
- Asche (2.4.16)
- Säureunlösliche Asche (2.8.1)

3.6 Destillation des ätherischen Öls

Verwendung der in der Ph. Eur. 6 (2.8.12) festgelegten Destillationsapparatur unter Austausch des 1-l-Kolbens durch einen 2-l-Kolben.

4 Crocus sativus (L.)

Die zur Familie der Iridaceen gehörende Pflanze wird seit der Bronzezeit als Arzneipflanze und auf Grund ihres Färbevermögens kultiviert (Lech, Witowska-Jarosz und Jarosz, 2009). Die Arzneidroge besteht aus den Narben der Safranblüte, die meist durch ein kurzes Griffelstück zusammengehalten werden.

Durch die jahrtausendlange Anwendung als Arzneipflanze wird dem Safran ein breites Spektrum an Wirkungen zugeschrieben. Im Jahr 1938 fasst Dr. med. Gerhard Madaus (Zitat aus Nachdruck 1976) in seinem „Lehrbuch der biologischen Heilmittel“ die Wirkungen von Safran folgendermaßen zusammen:

„... herz- und magenstärkend, diuresefördernd, aphrodisierend, wirksam bei Asthma, Brust- und anderen Geschwüren, äußerlich gegen Migräne, Podagra und Abszesse; ... expektorierende Wirkung ... emmenagog, geburts- und Wochenflussfördernd, ... nierenstärkendes Mittel ... Hämostatikum ... Abortivum ... bei schmerz- und krampfhaften Leiden der Respirations- und Digestionsorgane ... schmerzhafter Dysmenorrhöe ... Antidot gegen Gifte, besonders tierischer Herkunft ... Prophylaktikum und Heilmittel gegen Pest ... Zahnschmerzen ... beschleunigt im leichten Maße die Pulsfrequenz ... schlafbringend ... [in hohen Dosen] erzeugen [Safranzubereitungen] Kopfschmerz, heitere Delirien und lähmen die motorischen Nerven ...“

Einige dieser dem Safran zugeschriebenen Wirkungen, konnten schon wissenschaftlich bestätigt werden (siehe Kapitel 4.1, S. 13).

Heutzutage gelten der Iran, Indien, der europäische Mittelmeerraum und China als Hauptanbaugebiete des Safrans, von wo die Droge in die ganze Welt exportiert wird.

Aber auch in Österreich wurde und wird vereinzelt wieder, Safran kultiviert.

Franz Berger schreibt im 1949 herausgegebenen „Handbuch der Drogenkunde“, dass der niederösterreichische Safran als eine der besten Sorten gelte. Dieser wurde in der Vergangenheit z.B. in Kirchberg am Wagram, Ravelsbach, Herzogenburg, Krems und Melk kultiviert.

Seit 2006 wird Safran zum Beispiel wieder im Burgenland angebaut.

ARGE Pannonicus Safran

7013 Klingenbach

Österreich

Die Blütenernte führt in der Regel zu einer Ausbeute von 1 kg Narben aus 150 000 Blüten von *Crocus sativus* (L.) (Berger, 1949), weshalb Safran eine der teuersten Gewürz- und Arzneidrogen ist.

Auf Grund dieser Tatsache wird Safran häufig verfälscht in den Handel gebracht.

Deswegen sollte der Identitäts- und Reinheitsprüfung des Safrans stets höchste Bedeutung zugeschrieben werden.

Beispiele für die zahlreichen Verfälschungsmöglichkeiten der Droge sind die Zugabe von:

- a) Safrangriffel
- b) künstlich nachgefärbbten Safran
- c) Flos Calendulae
- d) Blüten von *Carthamus tinctorius* (L.)
- e) Blüten von *Onopordon acanthium* (L.)
- f) Blüten von *Cynara cardunculus* (L.)
- g) Maisgriffel
- h) Narben anderer *Crocus*-Arten
- i) Mit Eosin gefärbte Wickenkeimlinge
- j) Beschwerungsmittel, meist mineralischen Ursprungs.

(Berger, 1949)

Aktuell sind Monographien für Safran beispielsweise im Chinesischen Arzneibuch, im Homöopathie-Teil des Europäischen Arzneibuches (6. Ausgabe) und im Österreichischen Homöopathischen Arzneibuch (Ausgabe 2009) zu finden. Allerdings verfügt nur das Chinesische Arzneibuch über einen Punkt „Gehaltsbestimmung“.

Das ÖAB enthält bis zur amtlichen Ausgabe 2010 eine Monographie „Flos Croci“, deren Aufbau nicht vollständig den von der EDQM herausgegebenen Stilvorgaben für den Monographie-Aufbau pflanzlicher Arzneidrogen entspricht. Aus diesem Grund wurde von der ÖAB-Expertenkommission eine grundlegende Überarbeitung der Monographie „Flos Croci“ nach europäischen Richtlinien beschlossen.

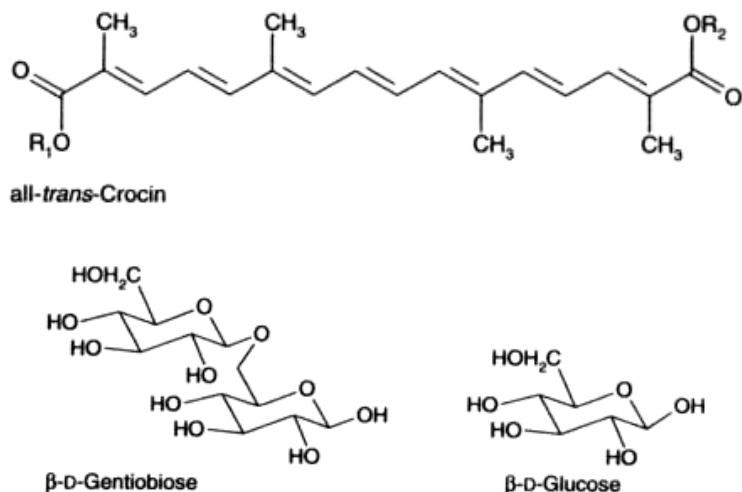
In kommenden Ausgaben des ÖAB werden, wie auch in der Europäische Pharmakopöe, die deutschen Namen der Monographien als erste Bezeichnung angeführt, weshalb die aktualisierte Monographie von „Flos Croci“ nun „Safran“ heißen wird.

Eine ausführliche Zusammenfassung über die Aktualisierung der Identitäts- und Reinheitsprüfung der ÖAB-Monographie „Flos Croci“ erfolgt in den Diplomarbeiten von Monika Heß (2010) und Stefan Brenner (2011).

Die Ergänzung der Monographie um eine Gehaltsbestimmung soll verhindern, dass Safran von minderer Qualität in den Handel gebracht wird.

4.1 Qualitätsbestimmende Inhaltsstoffe

Die Hauptinhaltsstoffgruppe von *Crocus sativus* (L.) sind die Crocine. Dabei handelt es sich um die β -D-Gentiobiose- bzw. β -D-Glucoseester der Polyendicarbonsäure Crocetin, die wahrscheinlich, wie andere Carotinoide, Spaltprodukte des C₄₀ – Phytoens aus dem Terpen-Biosyntheseweg sind (Blaschek et al., 1998). Das Absorptionsmaximum (λ_{\max}) dieser Carotinoid-ähnlichen Verbindungen liegt bei 440 nm, sofern alle ihre Doppelbindungen in *trans*-Stellung (Abbildung 1) vorliegen (Lechtenberg et al., 2008).



	R ₁	R ₂
Crocin 1	β -D- Gentiobiose	β -D- Gentiobiose
Crocin 2	β -D- Gentiobiose	β -D-Glucose
Crocin 3	β -D-Glucose	β -D- Glucose
Crocin 4	β -D- Gentiobiose	--- H
Crocin 5	β -D –Glucose	--- H
Crocetin	---H	--- H

Abbildung 1. *trans*-Crocin-Derivate aus Safran
„Hagers Handbuch Pharmazeutischer Praxis“ (Blaschek et al., 1998)-modifiziert

Besonders unter Licht- und Sauerstoffeinfluss erfolgt die Umlagerung dieser all-*trans*-Crocine in die 13-*cis*-Crocine (*Abbildung 2*), deren Absorptionsmaxima (λ_{max}) zwischen 325-330 nm liegen (Lechtenberg et al., 2008). Die Zuckerreste der *cis*-Crocine (R_1 und R_2 in *Abbildung 2*) entsprechen jenen der *trans*-Crocine (siehe *Abbildung 1*, S.13). In qualitativ hochwertigen, sorgfältig getrockneten und gelagerten Drogen ist der Anteil an *trans*-Crocinen hoch, der von 13-*cis*-Crocinen hingegen niedrig (siehe auch Kapitel 4.4.4, S. 26).

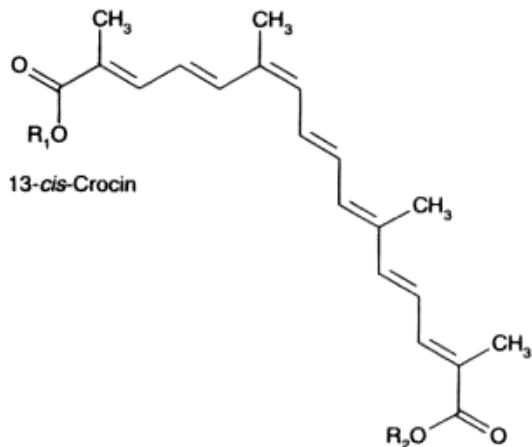


Abbildung 2. *cis*-Crocin-Derivate
„Hagers Handbuch pharmazeutischer Praxis“ (Blaschek et al., 1998)–modifiziert

Bei oraler Einnahme ist unter Betrachtung der chemischen Struktur anzunehmen, dass die Esterbindungen der Crocine im Gastrointestinaltrakt hydrolysiert werden. Die pharmakologisch aktive Verbindung sollte das Crocetin sein. Eine Studie an Ratten bestätigt diese Vermutung, da nach oraler Gabe von Crocin 1 nur eine, für pharmakologische Wirkungen ausreichende Plasmakonzentration, an Crocetin gemessen werden konnte (Xi et al., 2007).

Pharmakologisch belegte Wirksamkeit der Crocine:

Die aktuelle pharmakologische Studienlage zusammenfassend betrachtet, werden den Crocinen tumorhemmende, lipidsenkende und antioxidative Eigenschaften zugeschrieben (Hänsel und Sticher, 2010).

Hinweise auf blutdrucksenkende Wirkung der Crocine, als auch von Safranal, gibt eine an normotensiv und hypertensiv anästhesierten Ratten durchgeführte, in-vivo Studie. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) dieser Ratten konnte mit wässrigen Extrakten von Safran dosisabhängig gesenkt werden (Imenshahidi et al., 2010). Weiters sind Studien zu finden, die beispielsweise das anxiolytische Potential (Pitsikas et al., 2008) untersuchen, die Bindung an NMDA- und Sigma-1-Rezeptoren (Lechtenberg et al., 2008), die aphrodisierenden Effekte (Hosseinzadeh et al., 2008) und den protektiven Einfluss auf neurodegenerative Erkrankungen durch Crocine (Papandreou et al., 2006).

Ein weiterer Hauptinhaltsstoff des Safrans ist der Bitterstoff Picrocrocin (*Abbildung 3*). Die frische Droge enthält bis zu 6 Prozent des Monoterpenoglucosids, welches erst bei der Trocknung unter Glucose- und Wasserabspaltung zum Teil in Safranal übergeführt wird, dem Hauptbestandteil des ätherischen Öls. Diese Tatsache begründet die Geruchsarmut frischen Safrans. Das λ_{\max} von Picrocrocin liegt bei 249 nm (Lechtenberg et al., 2008).

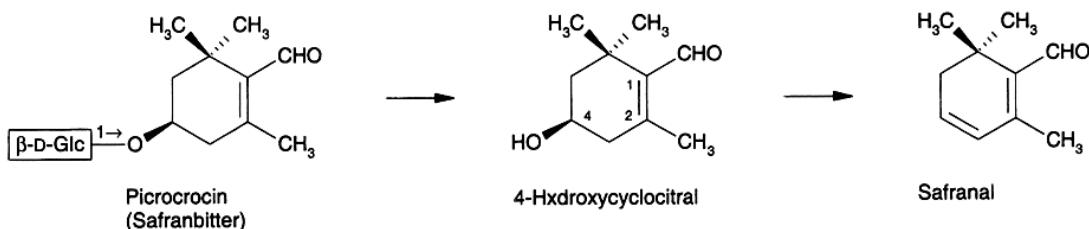


Abbildung 3. Entstehung von Safranal aus Picrocrocin
„Pharmakognosie-Phytopharmazie“ (Hänsel und Sticher, 2010)

Für Safranal konnte eine anxiolytische und hypnotische Wirksamkeit bestätigt werden (Hosseinzadeh und Noraei, 2009) und es reduziert gentoxische Effekte von Methansulfonat in verschiedenen Organen (Hosseinzadeh und Sadeghnia, 2007).

Beispiele für weitere im Safran enthaltene Inhaltsstoffgruppen sind klassische Carotinoide wie α - und β -Carotin und Lycopin. Zusätzlich wurden in Safran die β -Hydroxy-tetrahydrophenylpropan-Verbindungen Crocusatine (F-I), Flavonoide, fettes Öl und die Vitamine B₁ und B₂ gefunden (Hänsel und Sticher, 2010).

Neben pharmakologischen Studien existieren bereits experimentelle, klinische Studien, die sich mit der Wirksamkeit von Safranextrakten beschäftigen. So ist zum Beispiel die Wirksamkeit von Safranextrakten zur Behandlung von leichten bis mittelschweren Depressionen gleichzusetzen mit Imipramin, einem häufig eingesetzten, trizyklischen Antidepressivum (Akhondzadeh et al., 2005).

Die Masse an wissenschaftlichen Publikationen, die über die Wirkungen des Safrans in den letzten Jahren veröffentlicht wurden, bestätigt, dass Safran in Zukunft nicht nur weiterhin als traditionell verabreichte Arzneipflanze Bestand haben wird, sondern durchaus auch den Einzug in die Evidence Based Medicine (EBM) schaffen kann.

Diese Tatsache fordert die Möglichkeit einer eindeutigen Qualitätsbestimmung des Safrans durch Monographien und Prüfvorschriften am aktuellen Stand der Wissenschaft.

4.2 Obsolete Methoden der Qualitätsprüfung

Die Monographie „Flos Croci“ im ÖAB enthielt bisher keinen Punkt „Gehaltsbestimmung“. Die Qualität des Safrans wurde nur durch die „Prüfung auf Reinheit“ getestet. Diese besteht unter anderem aus der Prüfung des „Färbevermögens“, einer Grenzwertbestimmung auf den Crocinegehalt der Droge.

Dafür wurden „*0,10 g mittelfein gepulverte (V) Droge ... 2 Stunden lang unter gelegentlichem Schütteln mit 100 ml Wasser extrahiert. Es wird nitriert. 10 ml Filtrat, mit Wasser zu 100 ml verdünnt, dürfen nicht schwächer gefärbt sein als eine 0,05 prozentige Lösung (m/V) von Kaliumdichromat (R).*“ (ÖAB, Ausgabe 2010)

Diese Methodik ermöglicht eine grobe Abschätzung des Gehalts an färbenden Inhaltsstoffen einer Safran-Probe, hat aber einige Nachteile. Sie bietet Raum für individuelle Interpretation, ist wegen der langen Extraktionsphase nicht rasch durchzuführen und liefert keine quantitative Aussage über den Gehalt an Inhaltsstoffen bezogen auf die getrocknete Droge. Zudem können Verfälschungen mit starkem Färbevermögen oder zugesetzte Farbstoffe ein falsch-positives Ergebnis liefern.

4.3 Bedeutung einer Gehaltsbestimmung mittels HPLC

An Hand des bekannten Inhaltsstoffspektrums im Safran ergeben sich theoretisch mehrere Möglichkeiten für eine Gehaltsbestimmung in der Monographie:

- a) Quantifizierung des Crocin-Gehalts mittels HPLC
- b) Quantifizierung des Picrocrocin-Gehalts mittels HPLC
- c) Quantifizierung des Gehalts an ätherischem Öl mittels Destillationsapparatur nach dem Ph. Eur.
- d) Quantifizierung des Gehalts an Safranal im ätherischen Öl mittels Gaschromatographie nach Extraktion des ätherischen Öls mittels Destillationsapparatur nach dem Ph.Eur.

Vorteile bringen eindeutig die Möglichkeiten a) und b) mit sich, da wenig Probenmaterial für die Quantifizierung benötigt wird und die Durchführung der Prüfungen, nach einmaliger Etablierung, schneller absolviert ist, als bei Option c) und d). Die Extraktion des ätherischen Öls als Gehaltsbestimmung ist bei dem hohen Preis der Arzneidroge als Routineprüfung abzulehnen. Die Quantifizierung des Safranals mittels Gaschromatographie wäre zwar vom wissenschaftlichen Standpunkt aus zu überdenken, da einige der pharmakologischen Wirkungen anscheinend auf Safranal zurückgehen (siehe Kapitel 4.1, S. 13), ist aber aus den genannten ökonomischen Gründen für Safran in der Praxis nicht durchführbar. Somit ist eine Quantifizierung der Hauptinhaltsstoffe mittels HPLC die Methode der Wahl.

4.4 Ergebnisse

4.4.1 Die HPLC-Methode

Für die Aufnahme einer HPLC-Gehaltsbestimmung in das Arzneibuch muss beachtet werden, dass die vorgeschlagene Methode nicht nur den wissenschaftlichen Anforderungen entspricht, sondern auch, dass die Durchführung rasch, mit geringem Lösungsmittelverbrauch und möglichst ohne zu großen apparativem Aufwand oder Neuanschaffungen für die Prüflabors verbunden ist.

In der vorangegangenen Diplomarbeit von Monika Heß (2010) wurden verschiedene HPLC-Elutionsmethoden, die für die Vermessung von Safran-Extrakten bereits publiziert worden sind, auf ihre Eignung getestet. Hauptkriterium für die Auswahl war eine vollständige Auftrennung der Peaks von Picrocrocin und der Crocine 1-5 auf möglichst ubiquitär erhältlichem Säulenmaterial.

Die Analysen wurden auf einer BDS Hypersil C18-Säule (250 x 4,6; 5 μ) durchgeführt und die Chromatogramme bei der Wellenlänge 254 nm ausgewertet, da bei dieser Wellenlänge sowohl Crocine (λ_{max} 440 nm) als auch Picrocrocin (λ_{max} 249 nm) sichtbar sind. Nebenkriterien für die Auswahl waren die Durchführbarkeit bei Raumtemperatur, sodass auf den Einsatz eines Säulenofens und eines gekühlten Probensamplers verzichtet werden kann. Die durch Heß (2010) ausgewählte Methode wurde von Wang et al. im Jahr 2010 publiziert.

Es handelt sich um eine Gradientenelution mit 2 Lösungsmitteln:

Mobile Phase A: Wasser R, eingestellt mit Essigsäure 99 Prozent auf pH 2,8

Mobile Phase B: Methanol R

Die prozentuale Zusammensetzung der mobilen Phase im Verlauf der Methode ist wie folgt:

Zeit (min)	Mobile Phase A (% V/V)	Mobile Phase B(% V/V)
1 - 6	70 → 55	30 → 45
6 - 20	55 → 25	45 → 75
20 - 25	25 → 10	75 → 90
25 - 30	10	90

Tabelle 5. Lösungsmittelgradient der ausgewählten HPLC-Methode für die Safran-Monographie

4.4.2 Auswahl des externen Standards

Das Chinesische Arzneibuch (englische Ausgabe 2005) verwendet all-*trans*-Crocin 1 und all-*trans*-Crocin 2 als externe Standards für die HPLC-Quantifizierung. Berechnet wird nur der Gehalt von all-*trans*-Crocin 1 und all-*trans*-Crocin 2 in Safran, bezogen auf die getrocknete Droge.

Lechtenberg et al. (2008), die eine umfassende Untersuchung von Safran verschiedenster Herkunft bezüglich ihres Inhaltsstoffgehalts an Crocinen, Picrocrocin und Safranal durchgeführt haben, verwenden ausschließlich all-*trans*-Crocin 1 als externen Standard. Für die Ermittlung des Gesamtcrocingehaltes muss für die Crocine 2-5 ein Korrekturfaktor, bezogen auf das Molekulargewicht von Crocin 1, berechnet werden.

Im Handel verfügbare Reinsubstanzen, die als externe Standards geeignet wären, sind:

- a) all-*trans*-Crocin 1 (Gewinnung durch Isolierung aus *Crocus sativus* (L.))
- b) all-*trans*-Crocin 2 (Gewinnung durch Isolierung aus *Crocus sativus* (L.)) und
- c) Safranal (Gewinnung durch Partialsynthese aus Citral).

Für die Herstellung von Stammlösungen eignen sich die Feststoffe all-*trans*-Crocin 1 und all-*trans*-Crocin 2 besser als das bei Raumtemperatur flüssige Safranal, welches aber in der GC-Analytik als externer Standard verwendet werden kann.

Die Crocine wurden, wie im Kapitel 2.3 (S. 6) angegeben, bei zwei verschiedenen Herstellern bezogen und auf ihre Eignung als externer Standard überprüft. Crocine sollten auf Grund ihrer Zuckerreste, trotz des apolaren Grundkörpers (Crocetin) gut wasserlöslich sein. In der Praxis hat sich gezeigt, dass all-*trans*-Crocin 1 und all-*trans*-Crocin 2 in der hohen Konzentration von 5 mg/ml, die gewählt wurde um die Genauigkeit der Einwaage zu maximieren, nicht ausreichend in Wasser R löslich waren. Es entstand eine trübe Lösung.

Folglich wurde eine Stammlösung des jeweiligen all-*trans*-Crocins mit einer Konzentration von 5 mg/ml in DMSO hergestellt. Diese wurde mit Wasser R weiter verdünnt.

Ergebnisse der Vortestung:

Bei Chengdu Mansite Pharmaceutical Co. LTD wurde all-*trans*-Crocin 1 und all-*trans*-Crocin 2 bestellt (siehe Kapitel 2.3, S. 6).

Die all-*trans*-Crocin 1- und all-*trans*-Crocin 2-Stammlösungen (5 mg/ml) wurden mit Wasser R auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnt und mittels folgendem Pipettierschema kombiniert:

Crocin 1 (2 mg/ml)	Crocin 2 (2 mg/ml)
5 µl	95 µl
10 µl	90 µl
30 µl	70 µl
50 µl	50 µl
80 µl	20 µl
95 µl	5 µl

Tabelle 6. Pipettierprotokoll für die Kombinationslösung

Anschließend wurde diese Kombinationslösung nochmals 1:1 mit Wasser R verdünnt.

Somit ergeben sich folgende Endkonzentrationen, unter Berücksichtigung der tatsächlichen Einwaage für all-*trans*-Crocin 1 und all-*trans*-Crocin 2 in den Lösungen K 1 bis K 6 (*Tabelle 7* und *Tabelle 8*):

Crocin 1	mg/ml
K 1	0,052
K 2	0,104
K 3	0,312
K 4	0,520
K 5	0,832
K 6	0,988

Tabelle 7. Endkonzentration von Crocin 1
in den Kombinationslösungen

Crocin 2	mg/ml
K 1	0,950
K 2	0,900
K 3	0,700
K 4	0,500
K 5	0,200
K 6	0,050

Tabelle 8. Endkonzentration von Crocin 2
in den Kombinationslösungen

Jeweils 10 µl der Lösungen K 1 bis K 6 wurden eingespritzt.

Die Messung wurde an *Instrument 1* unter Verwendung der *Säule 1* durchgeführt.

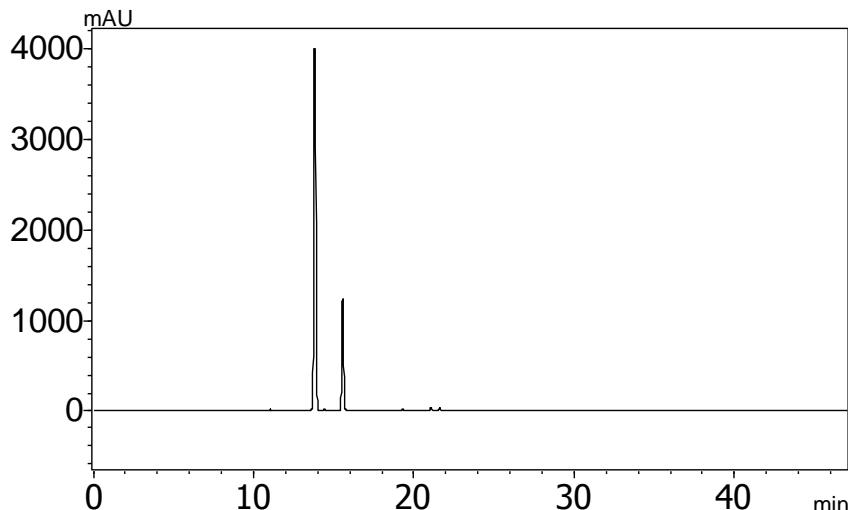


Abbildung 4. Chromatogramm von Lösung K5 bei 440 nm

Abbildung 4 zeigt das Chromatogramm der Lösung K 5 (0,832mg Crocin 1 + 0,200 mg Crocin 2/ml), detektiert bei 440 nm. Für all-trans-Crocin 1 ist ersichtlich, dass das Detektionsmaximum bei der Konzentration in K 5 schon erreicht ist.

In Tabelle 9 sind die Area Under the Curves (AUC) für Crocin 1 und Crocin 2 der Vortestung angegeben:

Messlösung	Crocin 1(mg/ml)	AUC (Crocin 1)	Crocin 2(mg/ml)	AUC (Crocin 2)
K 1	0,052	57443	0,950	1891864
K 2	0,104	5004313	0,900	34695128
K 3	0,312	11983276	0,700	6617483
K 4	0,520	18999244	0,500	5159585
K 5	0,832	29731335	0,200	4328689
K 6	0,988	29297656	0,050	2325277

Tabelle 9. Messergebnisse der Vortestung

Jeweils die zwei höchsten Konzentrationen der Crocine in den Messlösungen befinden sich über dem Detektionsmaximum des Detektors. An Hand dieser Vortestung lässt sich abschätzen, dass der lineare Bereich für die Detektion von *trans*-Crocin 1 bei einer Konzentration von 0,05 mg/ml beginnt und bei 0,80 mg/ml endet (graphische Darstellung-siehe Abbildung 5, S. 21). Bestätigt werden diese Ergebnisse durch die Angaben in der Publikation von Lechtenberg et al. (2008).

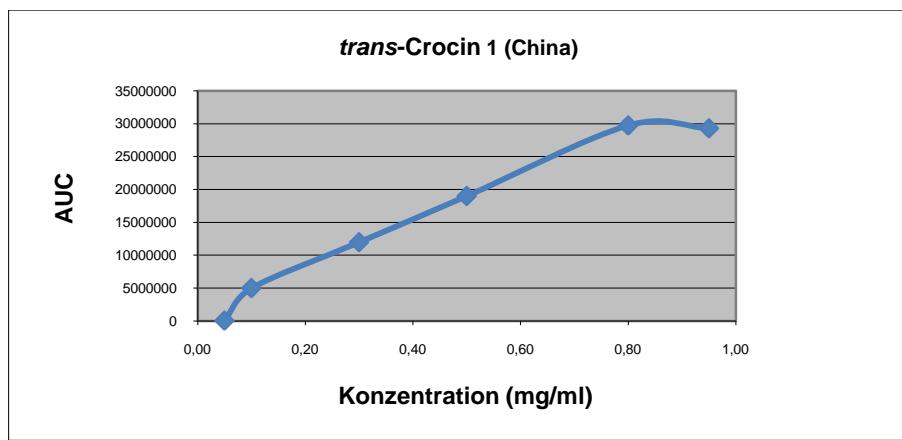


Abbildung 5. Kalibrationskurve Crocin 1

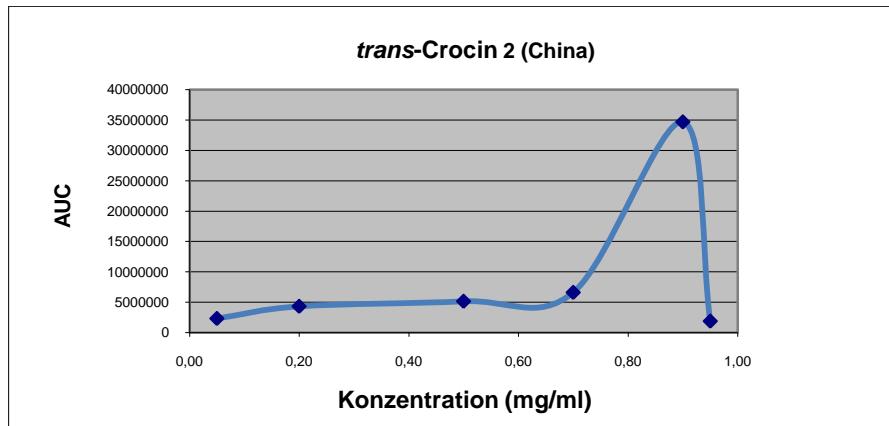


Abbildung 6. Kalibrationskurve Crocin 2

Für Crocin 2 zeigt die Kalibrationskurve (*Abbildung 6*) keinen linearen Bereich. Beim Leeren der im Autosampler befindlichen Proben wurde dann auch beobachtet, dass in den stärker konzentrierten Crocin 2-Lösungen die Reinsubstanz wieder ausgefallen ist.

Dies führt zu der subjektiven Annahme, dass all-trans-Crocin 2 eine höhere Unstabilität in Lösung als all-trans-Crocin 1 aufweist.

Folglich wurde beschlossen, ausschließlich all-trans-Crocin 1 als externen Standard für die Quantifizierung heranzuziehen.

Im Sortiment von Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich ist ein Produkt mit der Bezeichnung „Crocin“ vertreten. Es wurden ebenfalls Messlösungen (M 1-5) im Konzentrationsbereich von 0,05 mg/ml bis 1,00 mg/ml hergestellt und vermessen.

Wie in *Abbildung 7* ersichtlich handelt es sich bei diesem Produkt nicht um eine Reinsubstanz, weshalb eine Verwendung als externer Standard nicht möglich ist.

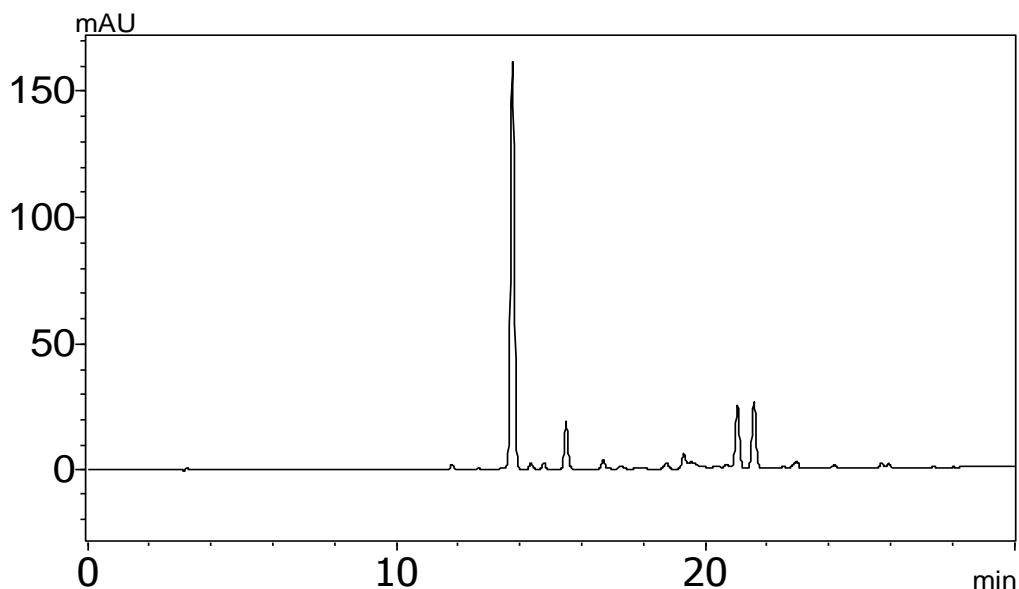


Abbildung 7. Chromatogramm der Lösung M 3 bei 440 nm

Da die Chromatogramme des Produkts und der getesteten Safran-Extrakte (siehe Kapitel 4.4.5.1, S. 28) einander stark ähneln, liegt die Annahme nahe, dass es sich bei dem als „Crocin“ erhältlichen Produkt um einen eventuell aufgereinigten Safran-Trockenextrakt handelt. Dennoch ist die Linearität für Crocin 1 in der erstellten Kalibrationskurve gegeben (siehe *Tabelle 10* und *Abbildung 8*, S.23).

Messlösung	mg/ml	AUC (Crocin 1)
M1	0,052	32895
M2	0,104	484761
M3	0,256	1387292
M4	0,520	2572650
M5	0,832	4430889

Tabelle 10. Messergebnisse für die Lösungen M 1 bis M 5

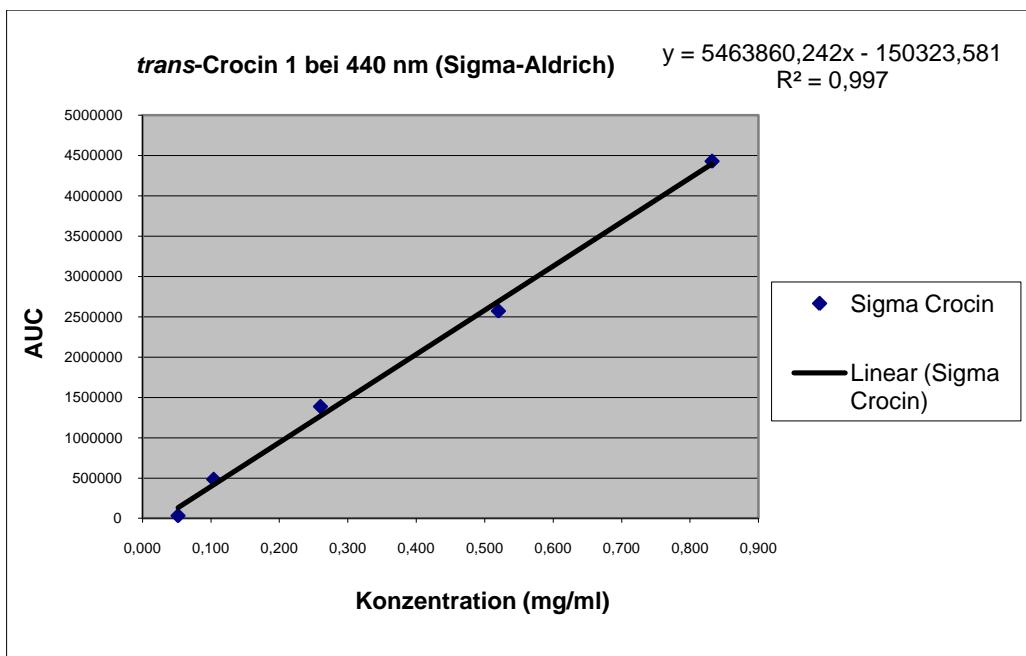


Abbildung 8. Kalibrationskurve des Crocin 1-Peaks gegen die theoretische Einwaage

Durch die Ergebnisse der Vortestungen wurde all-*trans*-Crocin 1 der Chengdu Mansite Pharmaceutical Co. LTD für die weitere Quantifizierungsarbeit herangezogen. Die Linearität des externen Standards wurde noch in zwei weiteren, voneinander unabhängigen Messungen (an 2 Tagen) bei der Wellenlänge 440 nm überprüft.

Die Messlösungen wurden unmittelbar vor der Vermessung hergestellt; die all *trans*-Crocin 1 Stammlösung (5 mg/ml) bzw. dessen Verdünnung (=Stammlösung 2 (2 mg/ml)) wurden bei -20°C gelagert.

Messung	Konzentration (mg/ml)	AUC (440 nm)
Tag 1	0,508	36448681
Tag 2	0,508	36815211
Tag 1	0,381	30132045
Tag 2	0,381	30382128
Tag 1	0,254	17345689
Tag 2	0,254	16185546
Tag 1	0,127	7013757
Tag 2	0,127	6145056
Tag 1	0,064	3204439
Tag 2	0,064	3093907
Tag 1	0,013	592800
Tag 2	0,013	594937

Tabelle 11. Messergebnisse der Kalibration mit Crocin 1 bei 440 nm

Die Ergebnisse aus *Tabelle 11* (S. 23) sind in *Abbildung 9* graphisch dargestellt.

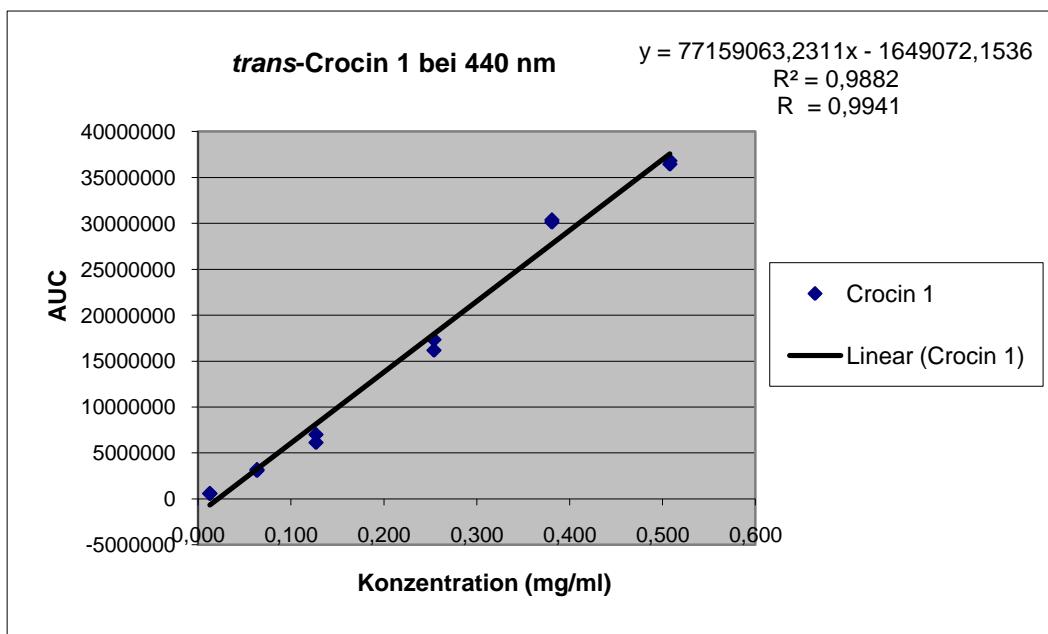


Abbildung 9. Kalibrationskurve von Crocin 1 bei 440 nm

Wie bereits erwähnt ist Picrocrocin ein weiterer Hauptinhaltsstoff des Safrans. Um die Kontrolle des Gehaltes an Picrocrocin, dessen Absorptionsmaximum (λ_{\max}) bei 249 nm liegt, in den Safran-Proben zu ermöglichen, wurde die Linearität des *trans*-Crocins 1 auch bei dieser Wellenlänge überprüft.

Messung	Konzentration (mg/ml)	AUC (249 nm)
Tag 1	0,050	232305
Tag 2	0,050	257796
Tag 1	0,101	435019
Tag 2	0,101	495825
Tag 1	0,303	1175308
Tag 2	0,300	1583602
Tag 1	0,505	2269159
Tag 2	0,505	2641397
Tag 1	0,808	4338149
Tag 2	0,808	4198207

Tabelle 12. Messergebnisse der Kalibration mit Crocin 1 bei 249 nm

Die Ergebnisse aus *Tabelle 12* sind in *Abbildung 10* (S. 25) graphisch dargestellt. Wie auch bei 440 nm verläuft die Detektion bei 249 nm linear zu den eingewogenen Konzentrationen an Crocin 1 in den Messlösungen.

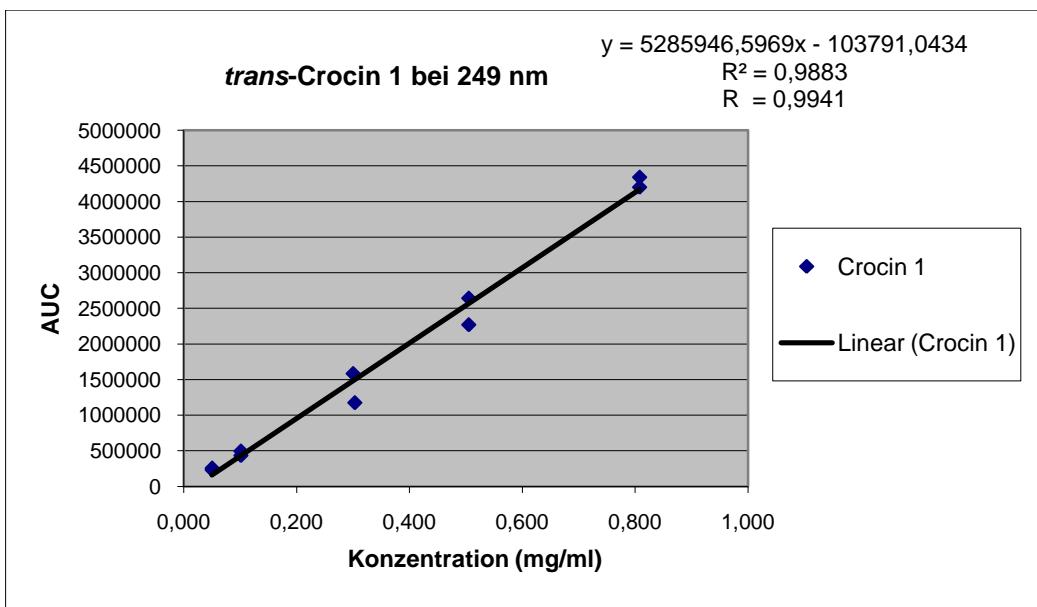


Abbildung 10. Kalibrationskurve von Crocin 1 bei 249 nm

Da das ermittelte Bestimmtheitsmaß der einzelnen Messungen zur aufgestellten Kalibrationsgerade für eine HPLC-Quantifizierung relativ niedrig ist, wurde der zeitliche Abbau des all-*trans*-Crocin 1 in Lösung verfolgt.

Den prozentualen Abbau, bezogen auf die Stunden in Lösung, verdeutlicht Abbildung 11.

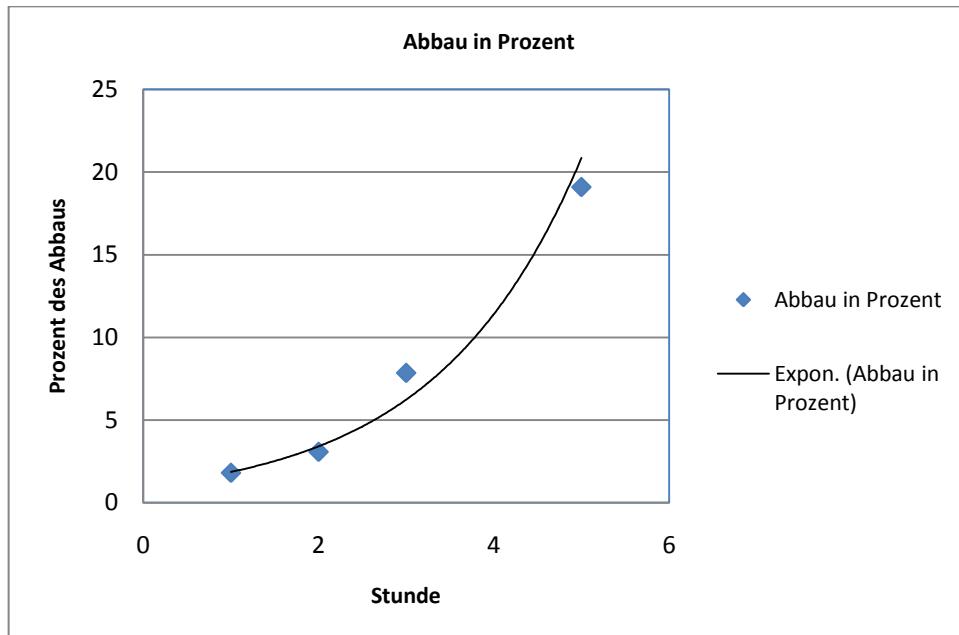


Abbildung 11. Zeitlicher Abbau des Crocins 1 in Lösung

4.4.3 Herstellung der Messlösungen

Auf Grund der Messergebnisse (über den Abbau von Crocin 1 und Crocin 2 in Lösung) in vorangegangenen Kapiteln, bedarf es bei der Herstellung der Stammlösung besonderer Vorsicht. Deshalb wird die Messlösung des externen Standards (= Referenzlösung), mit einer Konzentration von 0,300 mg/ml, durch Verdünnung der Stammlösungen mit Wasser R erst unmittelbar vor der Vermessung hergestellt. Die Stammlösungen des *trans*-Crocins 1 (5 mg/ml DMSO) werden bei – 20 °C gelagert und nur unter Lichtschutz verwendet.

Es muss von einer gewissen Instabilität für alle all-*trans*-Crocine in Lösung ausgegangen werden, weshalb auch bei der Herstellung der Messlösungen aus den Safran-Proben (=Probenlösung) nicht auf Lichtschutz und Eiskühlung verzichtet werden kann.

Für die Herstellung der Probenlösung wird 0,100 g Droge in einem kleinen Reagensglas mit einem Glasstab sorgfältig zerstoßen und in einen 10 ml fassenden Messkolben genau eingewogen. Dieser wird mit Ethanol 70 Prozent R aufgefüllt. Die Extraktion erfolgt für 20 Minuten unter Lichtausschluss und Eiskühlung im Ultraschallbad. 1 ml des Filtrats der Extraktionslösung wird in einen 5 ml Messkolben übergeführt, welcher wiederum mit Ethanol 70 Prozent R aufgefüllt wird. Vor der Vermessung wird die Lösung für 10 Minuten bei 14.6 rpm zentrifugiert.

4.4.4 Quantifizierung

Um den Gesamt-Crocingehalt im Safran ermitteln zu können, müsste die Detektion gleichzeitig mit zwei Wellenlängen (zirka 330 nm für die 13-*cis*-Crocine und 440 nm für die all *trans*-Crocine) erfolgen. Da allerdings nicht davon ausgegangen werden darf, dass jedes Labor, welches die Prüfung an Hand des ÖAB durchführt, einen Diodenarraydetektor zur Verfügung hat, werden, wie auch im Chinesischen Arzneibuch (englische Übersetzung 2005), ausschließlich die all-*trans*-Crocine in den Proben quantifiziert und deren Abbauprodukte, die 13-*cis*-Crocine vernachlässigt. Im weiteren Text wird nur mehr über Crocine geschrieben, wobei die all-*trans*-Crocine gemeint sind.

Die Crocine besitzen alle denselben Chromophor, die Dicarbonsäure Crocetin, und unterscheiden sich ausschließlich durch ihre Zuckerreste (siehe Kapitel 4.1, S.13). Deshalb können die Korrekturfaktoren für die Peakflächen der Crocine 2-5 einfach an Hand des Molekulargewichtes berechnet werden und müssen nicht experimentell durch Peakflächenvergleich mit einer äquivalenten Konzentration an externem Standard (=Crocin 1) und dem jeweiligen Crocin ermittelt werden.

Die Korrekturfaktoren werden an Hand des Molekulargewichtes der Crocine, bezogen auf das Molekulargewicht von Crocin 1, berechnet.

$$\frac{\text{Molekulargewicht Crocin x (2-5)}}{\text{Molekulargewicht Crocin 1}}$$

MW Crocin 1	MW Crocin 2	MW Crocin 3	MW Crocin 4	MW Crocin 5
976,96	814,82	652,68	652,68	490,54
Standard	Korr. Faktor 1	Korr. Faktor 2	Korr. Faktor 3	Korr. Faktor 4
	0,834	0,668	0,668	0,502

Tabelle 13. Korrekturfaktoren für die Crocine 2-5 an Hand des Molekulargewichts

Die Berechnung des Crocinegehalts der Safran-Proben wird mit der nachstehenden Formel berechnet:

$$\frac{g (\text{Standard}) \cdot [A_1 + A_2 \cdot 0,834 + (A_3+A4) \cdot 0,668 + A_5 \cdot 0,502] \cdot 100}{A_6 \cdot g (\text{Droge})}$$

A₁: Peakfläche Crocin 1 (Probe)

A₂: Peakfläche Crocin 2

A₃: Peakfläche Crocin 3

A₄: Peakfläche Crocin 4

A₅: Peakfläche Crocin 5

A₆: Peakfläche Crocin 1 (externer Standard)

0,834 = Korrekturfaktur für Crocin 2 bezogen auf Crocin 1

0,668 = Korrekturfaktur für Crocin 3 und Crocin 4 bezogen auf Crocin 1

0,502 = Korrekturfaktur für Crocin 5 bezogen auf Crocin 1

4.4.5 Messergebnisse

Die Beurteilung der Safranqualität erfolgt nach zwei Kriterien:

- A. Peakhöhenverhältnis (Picrocrocin/Crocin 1), ermittelt bei 249 nm
- B. Ermittlung des Gesamtgehaltes an Crocinen, ermittelt bei 440 nm

Die Messungen wurden am *Instrument 2* unter Verwendung der *Säule 1* durchgeführt (siehe S. 8).

4.4.5.1 Identische Drogen

Probe 1-3 (siehe Kapitel 2.1, S. 2) entsprechen bei der Prüfung auf Identität und Reinheit, wie aus der Diplomarbeit von Monika Heß (2010) zu entnehmen ist.

Die Chromatogramme dieser Proben (Probe 1-3, *Abbildung 12*, *Abbildung 13* und *Abbildung 14*, S. 29f) zeigen bei 249 nm einen Picrocrocin-Peak mit einer absoluten Retentionszeit von etwa 7,8 Minuten. Der Crocin 1-Peak ist, im Gegensatz zu den Crocinen 2-5, auch gut bei 249 nm detektierbar (absolute Retentionszeit bei zirka 13,7 Minuten).

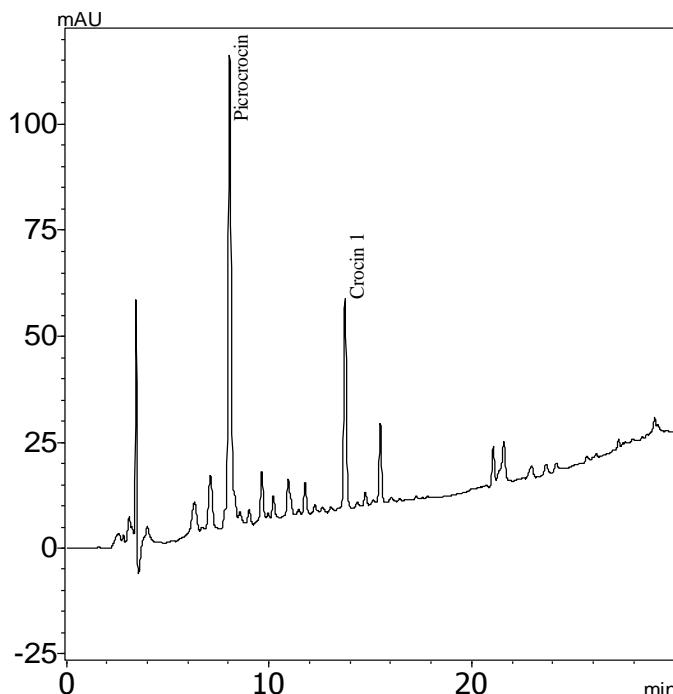


Abbildung 12. Probe 1 bei 249 nm

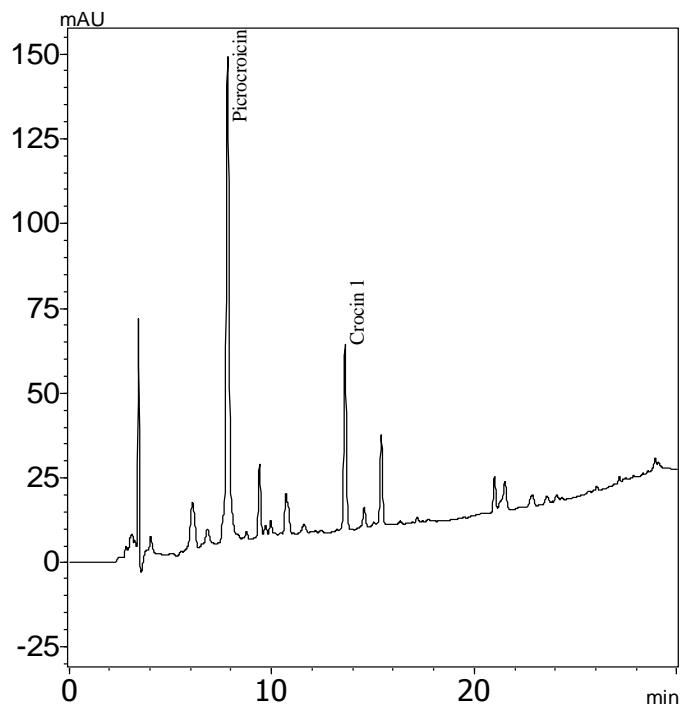


Abbildung 13. Probe 2 bei 249 nm

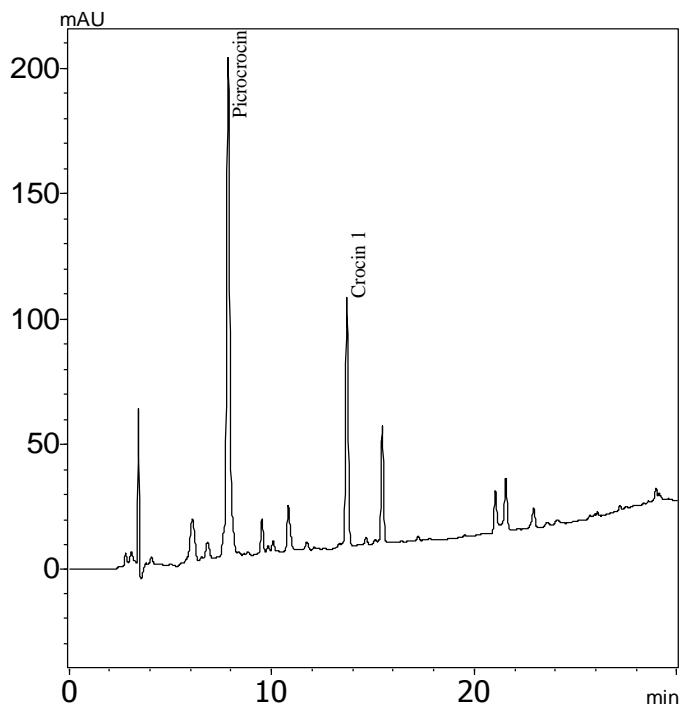


Abbildung 14. Probe 3 bei 249 nm

Die Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt und folgende Ergebnisse wurden bei 249 nm ermittelt (siehe *Tabelle 14*, S. 30):

Probe/Messung	Peakhöhe Picrocrocin	Peakhöhe Crocin 1	Peakhöhenverhältnis
1/1	116879	53140	2,199
1/2	119139	52348	2,276
2/1	145321	55939	2,598
2/2	155720	62290	2,500
3/1	203989	102262	1,995
3/2	214554	95305	2,251

Tabelle 14. Peakhöhenverhältnis Picrocrocin/Crocin 1 bei 249 nm

Das Peakhöhenverhältnis ist der Quotient aus der Peakhöhe von Picrocrocin und der Peakhöhe von Crocin 1.

Bei den identen Proben übersteigt das Peakhöhenverhältnis den Wert 3 nicht.

Die Gehaltsbestimmung der identen Proben wurde ebenso in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Die Berechnung des Gesamtcrocingehalts erfolgt nach der in Kapitel 4.4.4 (S. 26) angegebenen Formel.

Bei der Wellenlänge 440 nm sind in den Chromatogrammen fast ausschließlich die Peaks der Crocine 1-5 zu sehen (siehe Abbildung 15, Abbildung 16 (S. 32), Abbildung 17 (S.33)).

Ergebnis Probe 1:

ext.Standard	Konzentration (g/ml)	AUC bei 440 nm
Messung 1	0,000381	29375953
Messung 2	0,000381	29383040
Mittelwert		29379497

Tabelle 15. Messergebnisse des externen Standards bei 440 nm

Einwaage (g) 0,09365	Konzentration in der Untersuchungslösung (g/ml) 0,001873					% Gesamt-crocin
Probe 1	AUC (Crocin 1)	AUC (Crocin 2)	AUC (Crocin 3)	AUC (Crocin 4)	AUC (Crocin 5)	
Messung 1	4462659	1567584	639415	476080	217636	4,587
Messung 2	4470981	1570994	641227	476684	218661	4,595
Mittelwert	4466820	1569289	640321	476382	218149	4,591

Tabelle 16. Messergebnisse der Probe 1 bei 440 nm

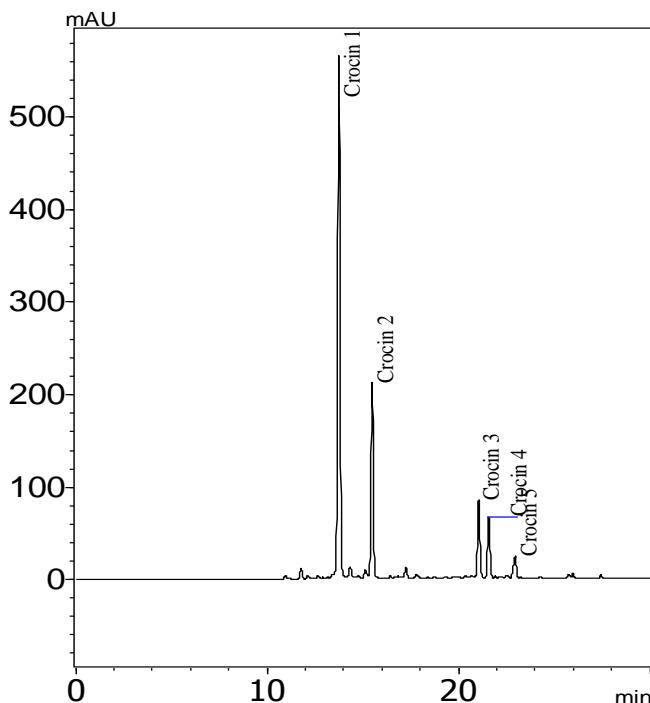


Abbildung 15. Chromatogramm der Probe 1 bei 440 nm

Das Chromatogramm (Abbildung 15) zeigt die Crocine 1-5 in der Probe 1 bei 440 nm. Der Crocinegehalt, bezogen auf die getrocknete Droge, liegt bei 4,59 Prozent (siehe Tabelle 16, S. 30).

Ergebnis Probe 2:

ext. St.	Konzentration (g/ml)	AUC bei 440 nm
Messung 1	0,000303	19595252
Messung 2	0,000303	19459593
Mittelwert		19527423

Tabelle 17. Messergebnisse des externen Standards bei 440 nm

Einwaage (g)		Konzentration in der Untersuchungslösung (g/ml)					% Gesamt-crocin
	0,09766	0,0019532					
Probe 2	AUC (Crocin 1)	AUC (Crocin 2)	AUC (Crocin 3)	AUC (Crocin 4)	AUC (Crocin 5)		
Messung 1	5810013	3022490	849275	550556	349202	7,474	
Messung 2	5762642	3056563	856564	556076	350442	7,519	
Mittelwert	5786328	3039527	852920	553316	349822	7,496	

Tabelle 18. Messergebnisse der Probe 2 bei 440 nm

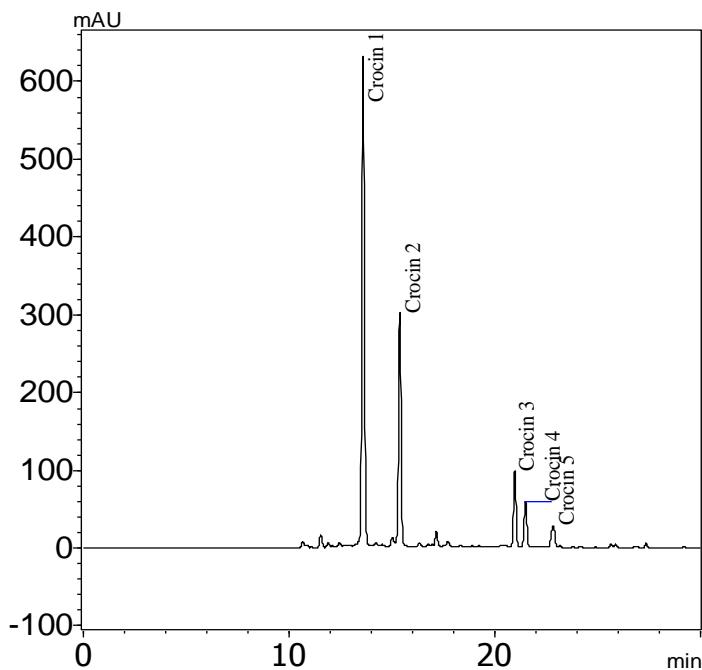


Abbildung 16. Chromatogramm der Probe 2 bei 440 nm

In Abbildung 16 sind die Crocine 1-5 der Probe 2 bei 440 nm zu sehen. Im Vergleich zu Probe 1 liegt der ermittelte Gesamtcrocingehalt deutlich höher, obwohl das vom Lieferanten angegebene Ablaufdatum zur Zeit der Messung schon erreicht gewesen ist. Dieses Ergebnis weist auf die mindere Qualität der Probe 1 hin.

Ergebnis Probe 3:

ext.Standard	Konzentration (g/ml)	AUC bei 440 nm
Messung 1	0,000303	19498527
Messung 2	0,000303	19459593
Mittelwert		19479060

Tabelle 19. Messergebnisse des externen Standards bei 440 nm

Einwaage (g) 0,10022		Konzentration in der Untersuchungslösung (g/ml) 0,0020044					% Gesamt- crocin
Probe 3		AUC (Crocin 1)	AUC (Crocin 2)	AUC (Crocin 3)	AUC (Crocin 4)	AUC (Crocin 5)	
Messung 1	10064974	4849373	1242494	1598055	747239	12,701	
Messung 2	10055672	4840864	1245354	1600024	748693	12,716	
Mittelwert	10060323	4845119	1243924	1599040	747966	12,708	

Tabelle 20. Messergebnisse der Probe 3 bei 440 nm

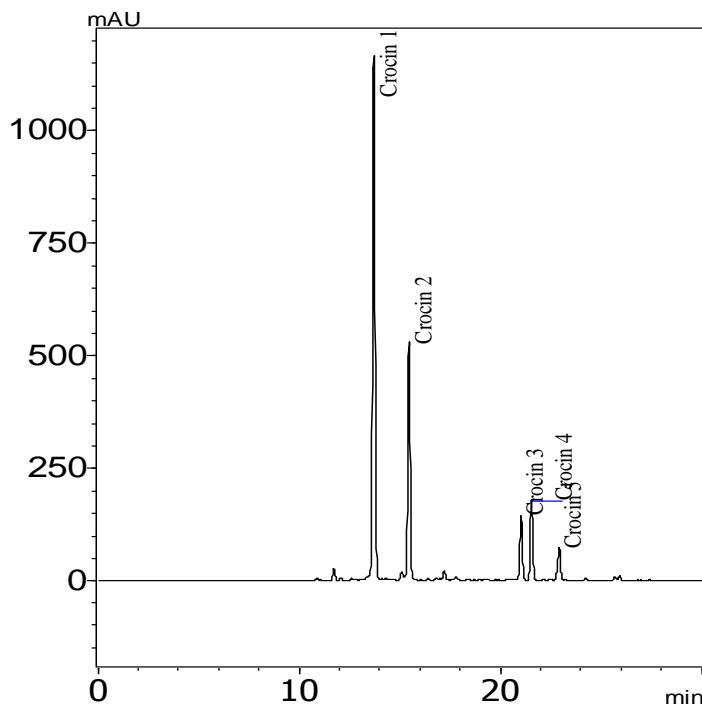


Abbildung 17. Chromatogramm der Probe 3 bei 440 nm

Probe 3 enthält mit 12,71 Prozent den höchsten Gesamtcrocingehalt der zur Verfügung stehenden identen Drogen. Auch bei dieser Probe ist das angegebene Ablaufdatum zur Zeit der Vermessung fast erreicht, weshalb Probe 3 die beste Qualität der zur Verfügung stehenden Drogen aufweist.

Zusammenfassend betrachtet reicht das Spektrum des Gesamtcrocingehalts in den identen Safran-Proben von 4,6 bis 12,7 Prozent. Wegen der Labilität der Crocine kann angenommen werden, dass nicht nur die Herkunft der Drogen Einfluss auf den Crocingehalt hat, sondern auch die sorgfältige Trocknung und Lagerung seitens der Lieferanten. Vor allem Probe 1 weist, für das vom Lieferanten angegebene Ablaufdatum und im Vergleich zu den anderen identen Drogen, einen sehr niedrigen Crocingehalt auf.

4.4.5.2 Verfälschte Drogen

Probe 4 war in der Identitätsprüfung entsprechend, allerdings überschritt bei der Reinheitsprüfung Sulfatasche der Wert den durch das ÖAB festgelegten Grenzwert (Heß, 2010), was auf einen Zusatz von Beschwerungsmitteln hinweist.

Unter Betrachtung des Peakhöhenverhältnisses bei 249 nm kann, wie in *Abbildung 18* ersichtlich, kein Unterschied zu den Chromatogrammen identer Proben festgestellt werden.

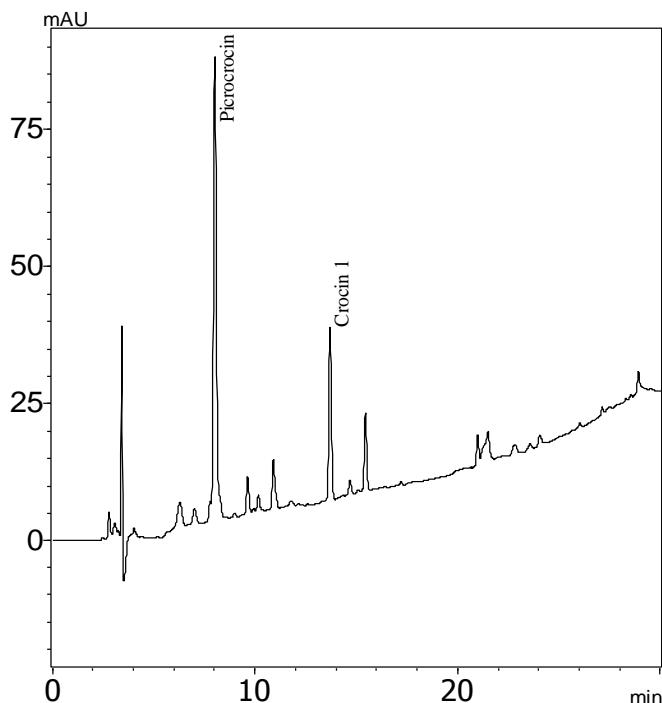


Abbildung 18. Chromatogramm der Probe 4 bei 249 nm

Probe/Messungsnummer	Peakhöhe Picrocrocin	Peakhöhe Crocin 1	Peakhöhenverhältnis
4/1	85681	31772	2,697
4/2	85915	31824	2,700

Tabelle 21. Peakhöhenverhältnis Picrocrocin/Crocin 1 bei 249 nm

Das Peakhöhenverhältnis (Picrocrocin/Crocin 1) ist nicht signifikant höher als das Peakhöhenverhältnis identer Proben.

Bei der Quantifizierung der Crocine bei 440 nm zeigt sich allerdings, dass ein eindeutig niedrigerer Inhaltsstoffgehalt an Crocinen in der Droge enthalten ist (siehe *Abbildung 19* und *Tabelle 23*, S. 35).

Ergebnis Probe 4:

ext. Standard	Konzentration (g/ml)	AUC bei 440 nm
Messung 1	0,000303	18683188
Messung 2	0,000303	18284780
Mittelwert		18483984

Tabelle 22. Messergebnisse des externen Standards bei 440 nm

Einwaage (g) 0,10131		Konzentration in der Untersuchungslösung (g/ml) 0,0020262				% Gesamt-crocin
Probe 4	AUC (Crocin 1)	AUC (Crocin 2)	AUC (Crocin 3)	AUC (Crocin 4)	AUC (Crocin 5)	
Messung 1	3125977	1325611	437867	225135	142252	3,799
Messung 2	3129197	1325622	438329	225281	142604	3,884
Mittelwert	3127587	1325617	438098	225208	142428	3,842

Tabelle 23. Messergebnisse der Probe 4 bei 440 nm

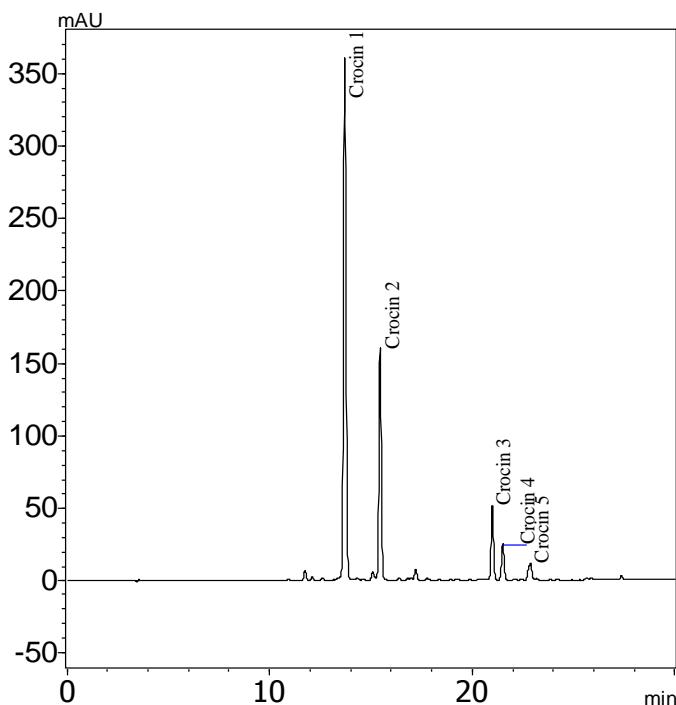


Abbildung 19. Chromatogramm der Probe 4 bei 440 nm

Mit einem Gesamtcrocingehalt von 3,84 Prozent, bezogen auf die Einwaage der getrockneten Droge, liegt der Gehalt der Probe 4 deutlich unter dem Wert der Probe 1, die bei den identen Drogen die minderste Qualität aufweist. Probe 4 wurde wahrscheinlich mit einem Beschwerungsmittel verfälscht, da sowohl die Sulfatasche nicht entspricht, als auch eine geringe Konzentration an Crocinen vorliegt.

4.4.5.3 Gefälschte Drogen

Proben 5-8 wurden in Geschäften für TCM-Drogen in China als Safran erworben. Schon bei der Identitätsprüfung konnte keine dieser Proben als Safran identifiziert werden (Heß, 2010).

Aus Interesse am Inhaltsstoffmuster der als Safran bezeichneten Proben wurde die für Safran entwickelte HPLC-Prüfmethode auch an diesen Proben in einer Einfachbestimmung durchgeführt.

Bei 249 nm kann in Probe 5 und Probe 6 Picrocrocin und Crocin 1 detektiert werden (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21, S.37). Sie enthalten auch geringste Mengen der anderen Crocine (siehe Abbildung 24, S.39, und Abbildung 25, S. 40).

Die Quantifizierung des Gesamtcrocingehalts (Tabelle 26, S. 39, und Tabelle 27, S.39) ergibt aber jeweils Gehalte unter einem Prozent.

Proben 7 und 8 haben ein gänzlich anderes Inhaltsstoffmuster als identer Safran. In den Chromatogrammen bei 249 nm (Abbildung 22, S.37; Abbildung 23, S.38) und 440 nm sind keine für eine Analyse verwendbaren Peaks ersichtlich.

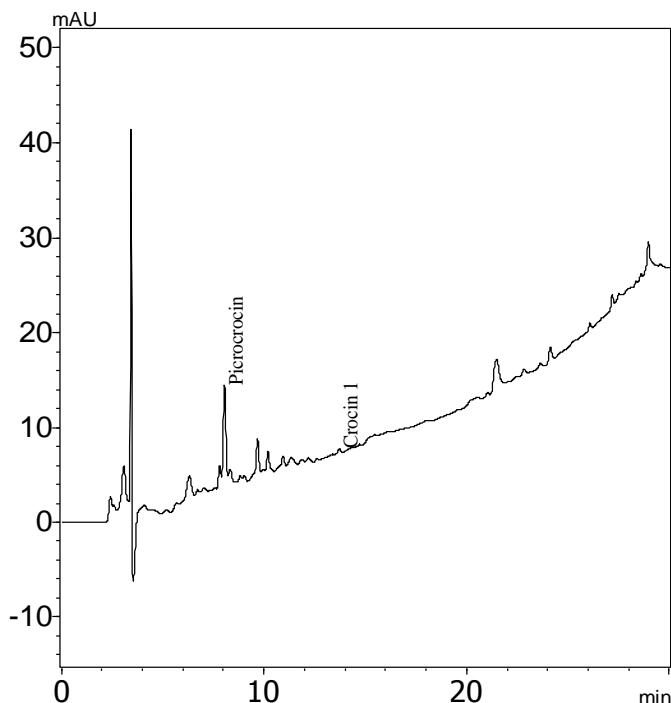


Abbildung 20. Chromatogramm der Probe 5 bei 249 nm

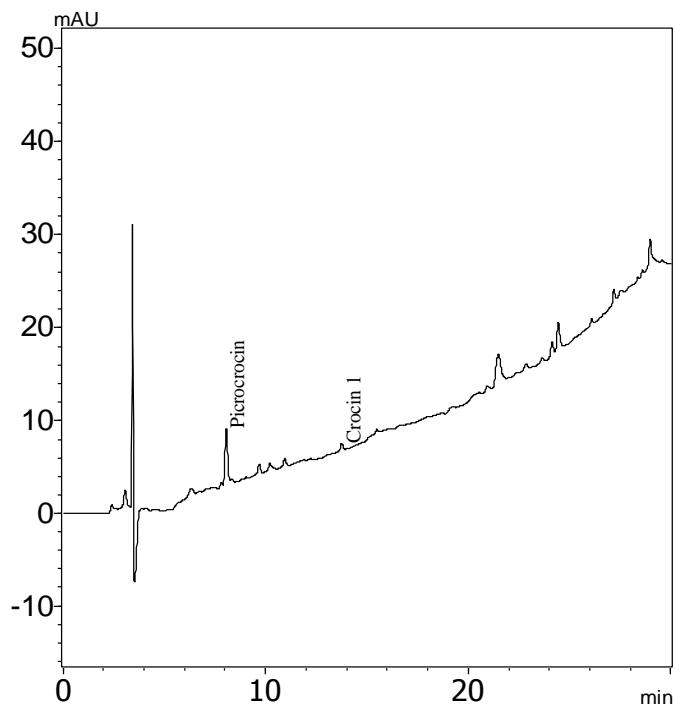


Abbildung 21. Chromatogramm der Probe 6 bei 249 nm

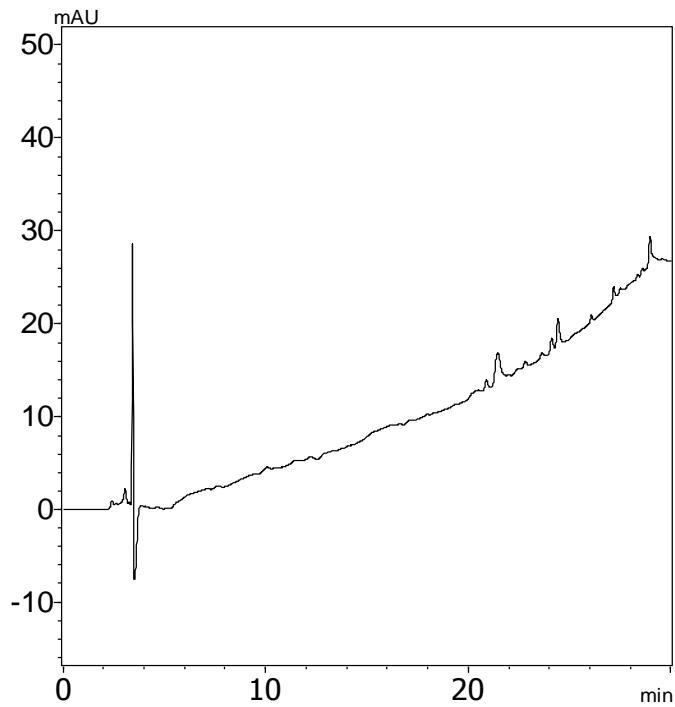


Abbildung 22. Chromatogramm der Probe 7 bei 249 nm

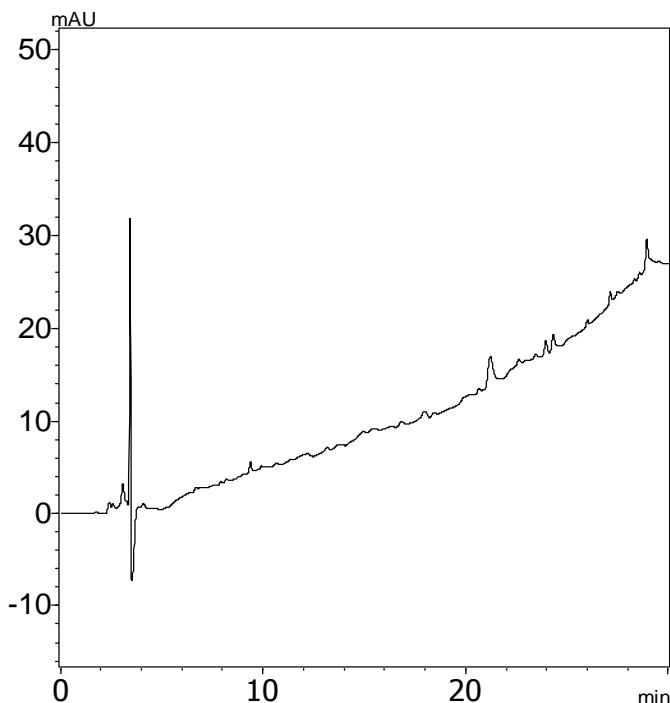


Abbildung 23. Chromatogramm der Probe 8 bei 249 nm

Probe/Messungsnummer	Peakhöhe Picrocrocin	Peakhöhe Crocin 1	Peakhöhenverhältnis
5/1	15300	1873	8,169
6/1	6692	792	8,449
7/1	k.A.m.	k.A.m.	k.A.m.
8/1	k.A.m.	k.A.m.	k.A.m.

Tabelle 24. Peakhöhenverhältnis Picrocrocin/Crocin 1 bei 249 nm
(k.A. M. = keine Angaben möglich)

Die gefälschten Safran Proben, sofern eine Analyse möglich ist, haben ein Peakhöhenverhältnis (Picrocrocin/Crocin 1) von über 8.

Die Quantifizierung der Crocine bei 440 nm der Proben 5 und 6 ergibt folgende Prozentgehalte:

Ergebnis Probe 5:

ext. Standard	Konzentration (g/ml)	AUC bei 440 nm
Messung 1	0,000381	29375953
Messung 2	0,000381	29383040
Mittelwert		29379497

Tabelle 25. Messergebnisse externer Standard bei 440 nm

Einwaage 0,09961		Konzentration in der Untersuchungslösung (g/ml) 0,0019922					% Gesamt-crocin
Probe 5	AUC (Crocin 1)	AUC (Crocin 2)	AUC (Crocin 3)	AUC (Crocin 4)	AUC (Crocin 5)		
Messung	42200	22692	22187	6076	7439	0,055	

Tabelle 26. Messergebnisse Probe 5 bei 440 nm

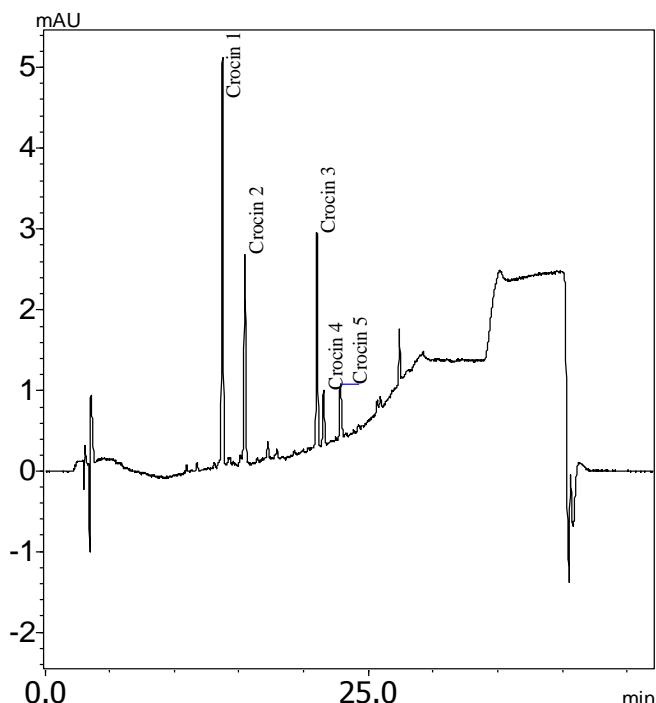


Abbildung 24. Chromatogramm der Probe 5 bei 440 nm

Ergebnis Probe 6:

ext. Standard	Konzentration (g/ml)	AUC bei 440 nm
Messung 1	0,000381	29375953
Messung 2	0,000381	29383040
Mittelwert		29379497

Tabelle 27. Messergebnisse externer Standard bei 440 nm

Einwaage 0,10703		Konzentration der Untersuchungslösung (g/ml) 0,0021406					% Gesamt-crocin
Probe 6	AUC (Crocin 1)	AUC (Crocin 2)	AUC (Crocin 3)	AUC (Crocin 4)	AUC (Crocin 5)		
Messung	69072	30925	12128	10311	6776	0,069	

Tabelle 28. Messergebnisse Probe 6 bei 440 nm

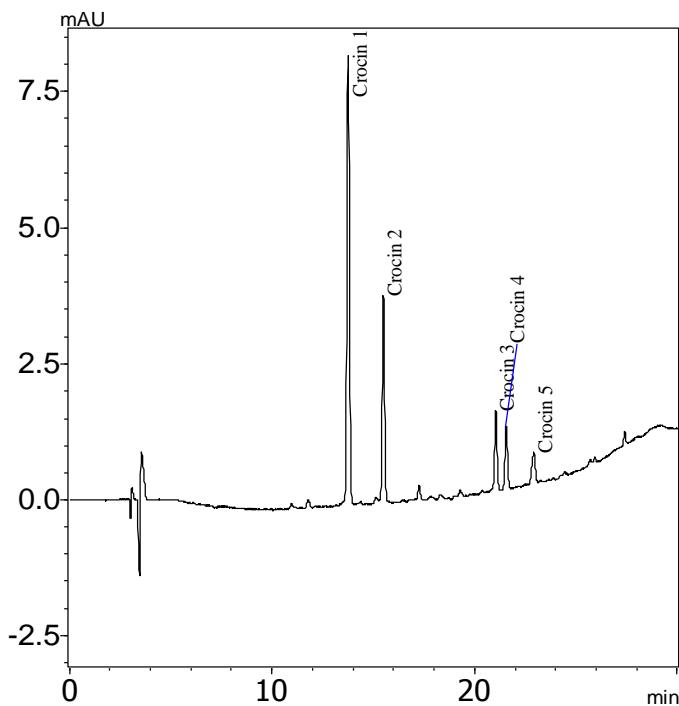


Abbildung 25. Chromatogramm der Probe 6 bei 440 nm

Beide Proben enthalten so wenig Crocine, dass das Detektionsminimum fast erreicht wird. Die erhaltenen Quantifizierungsergebnisse stellen daher in diesen beiden Fällen nur eine grobe Einschätzung des Crocinegehalts dar.

4.4.6 Reproduzierbarkeit

Bei der Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde mit frisch hergestellten, nicht bei -20 °C gelagerten Stammlösungen gearbeitet. Die daraus hergestellten Messlösungen wurden sofort vermessen. Ebenso wurde mit den Untersuchungslösungen verfahren.

Es wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen dieselbe Probe (Probe 1) vermessen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse der Quantifizierung glichen sich zu 95,2 Prozent.

4.4.7 Diskussion

Die in dieser Arbeit getestete HPLC-Methode zur Analyse von Safran trennt die UV/VIS detektierbaren Hauptinhaltsstoffe des Safrans (Picrocrocin und die Crocine 1-5) in ausreichendem Maße innerhalb von 30 Minuten auf.

Sie ermöglicht somit die Identifizierung von Safran-Proben und die Quantifizierung des Gehalts an all-*trans*-Crocinen im Safran.

Als problematisch muss die Beschaffung des externen Standards betrachtet werden. Dieser kann in reiner Form nur aus China, zwar kostengünstig, aber mit einer Wartezeit von bis zu 6 Monaten importiert werden.

Weiters ist die Stabilität von Crocinen in Lösung sehr gering, deshalb wird in der Monographie auf die Notwendigkeit der Arbeit mit frischen Messlösungen hingewiesen. Aus wissenschaftlicher Sicht könnte die Genauigkeit der Quantifizierung der labilen all-*trans*-Crocine durch kürzere Analysendauer, wie zum Beispiel durch Verwendung von monolithischen HPLC-Säulen und UHPLC sicherlich noch erhöht werden. Die kürzere Analysendauer würde auch einen geringeren Lösungsmittelverbrauch mit sich bringen. Allerdings sind diese Methoden nicht in Arzneibüchern etabliert und können somit nicht in Betracht gezogen werden.

Dennoch kann mit der vorgestellten HPLC-Quantifizierung der Crocine die Qualität des Safrans verschiedenster Herkunft reproduzierbar bestimmt und miteinander verglichen werden.

Mit der Ergänzung der Monographie um die Gehaltsbestimmung mittels HPLC ist die Überarbeitung der Monographie „Flos Croci“ abgeschlossen. Die überarbeitete Monographie „Safran“ entspricht in allen Punkten den Richtlinien der EDQM für die Ausarbeitung pflanzlicher Arzneibuchmonographien.

4.4.8 Überarbeiteter Monographievorschlag

ÖAB xxxx/xxx

Safran

Croci stigma

Flos Croci

Definition

Safran besteht aus den getrockneten, meistens durch ein kurzes Griffelstück zusammengehaltenen Narben von *Crocus sativus* L.

Gehalt: mindestens 5,00 Prozent Gesamtcrocingehalt, bezogen auf die getrocknete Droge

Prüfung auf Identität

- A. Die ziegelroten Narben sind in trockenem Zustand 20 bis 40 mm, in nassem Zustand 35 bis 50 mm lang. Die auf einer Seite aufgespaltenen Röhren erweitern sich nach oben. Der obere Rand ist offen und feingezackt. Das die 3 Narben zusammenhaltende Griffelstück ist blassgelb und höchstens 5 mm lang.
- B. Die Epidermiszellen sind von gestreckter Form und weisen oft im Zentrum oft eine kurze Papille auf; in Wasser lassen sie einen gelben Farbstoff austreten. Der obere Rand der Narben besitzt fingerartige, bis 150 µm lange Papillen. Zwischen den Papillen finden sich einzelne kugelige Pollenkörper mit fein getüpfelter Exine. Die Leitbündel enthalten schmale Gefäße mit spiraligen Verdickungen.
- C. Die Droge wird pulverisiert (355) (2.9.12). Das Pulver ist ziegelrot.
Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat-Lösung *R* verwendet wird. Das Pulver zeigt folgende Merkmale: Bruchstücke der Narben mit Epidermis in Aufsicht: langgestreckte Epidermiszellen mit wallförmigen Papillen im Zentrum, sichtbar als halbkreisförmige Gebilde; selten Bruchstücke des Narbenrands mit kleineren Epidermiszellen und fingerförmigen Papillen;
Bruchstücke der Narben im Querschnitt: Epidermiszellen mit wallförmigen Papillen. Weiters sind zu sehen: große, feingetüpfelte Pollenkörper, abgebrochene fingerförmige Papillen, spiralförmig verdickte Gefäße.

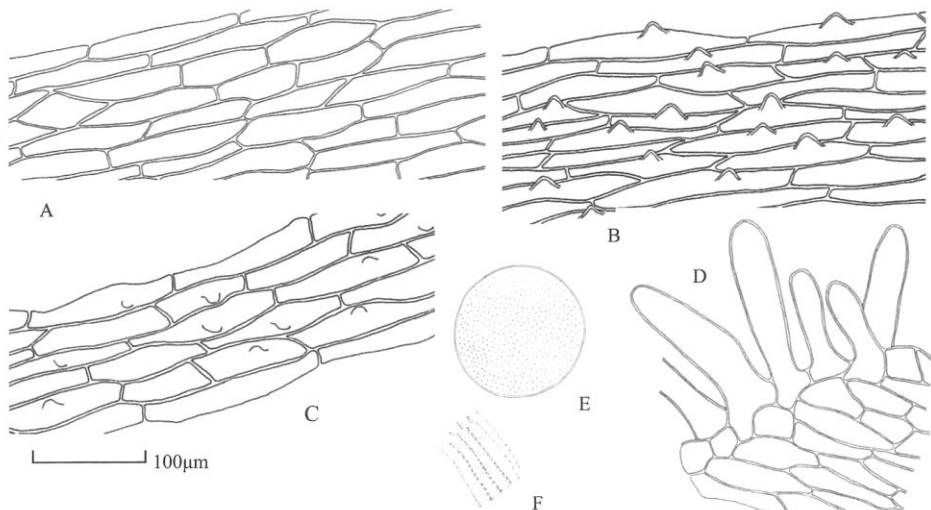


Abbildung 1:

- A: Längliche Epidermiszellen
- B: Epidermiszellen mit wallförmigen Papillen; Seitenansicht
- C: Epidermiszellen mit wallförmigen Papillen; Aufsicht
- D: Narbenrand mit fingerförmigen Papillen
- E: Getüpfeltes Pollenkorn
- F: Spiralig verdickte Gefäßbündel

D. Dünnenschichtchromatographie (2.2.27)

Untersuchungslösung: 10 mg Droge werden in einem kleinen Reagensglas (60 mm x 7 mm) mit Hilfe eines Glasstabes sorgfältig zerstoßen und mit einem Tropfen Wasser benetzt. Nach 2 bis 3 Minuten wird 1 ml Methanol R hinzugefügt, 20 Minuten lang unter Lichtausschluss stehen gelassen und anschließend die Lösung filtriert.

Referenzlösung: 5 mg Shikimisäure R werden in 5 ml Methanol R gelöst. Getrennt werden 5 mg Saccharose R in 5 ml Wasser R gelöst. Die beiden Lösungen werden vereinigt.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (5-40 µm) [oder DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (2-10 µm)]

Fließmittel: Ethylacetat R; Isopropanol R; Wasser R ; Ameisensäure R (65/25/10/1; V/V/V/V)

Auftragen: 10 µl Untersuchungslösung; bandförmig (15 mm) [oder 2,5 µl; bandförmig (7,5 mm)] und 10 µl Referenzlösung; bandförmig (15mm) [oder 2,5 µl; bandförmig (7,5 mm)]

Laufstrecke: 10 cm [oder 7 cm]

Trocknen: an der Luft

Ergebnis (bei Tageslicht): Das Chromatogramm darf keine schwache rot gefärbte Bande mit einem Rf – Wert von 0,29 zeigen. (siehe Prüfung auf Reinheit)

Detektion: Die Platte wird mit Anisaldehyd-Reagenz R besprüht und 5-10 Minuten lang bei 105 °C erhitzt bis zur deutlichen Farbentwicklung. Die Auswertung erfolgt im Tageslicht.

Ergebnis: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen von Referenzlösung und Untersuchungslösung ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich.

Oberer Plattenrand	
Referenzlösung	Untersuchungslösung
eine dunkelrosa Zone: Shikimisäure	eine violette Zone
	eine schwach blaue Zone
	eine blauviolette Zone
eine graublaue Zone: Saccharose	eine dunkelblaue Zone

Prüfung auf Reinheit

Trocknungsverlust (2.2.32): höchstens 10,0 Prozent, mit 0,200 g Droge durch 2h langes Trocknen im Trockenschrank bei 100 bis 105 °C bestimmt.

Sulfatasche (2.4.14): höchstens 8,0 Prozent, mit dem Rückstand der vorhergehenden Prüfung bestimmt.

Prüfung auf Verfälschung mit Färberdistelblüten:

Makroskopische/mikroskopische Prüfung

Die Verfälschung besteht aus den orangefarbenen Röhrenblüten von *Carthamus tinctorius L.* Die Corolla weist gewellte Epidermiszellen auf, die Staubblätter ungewöhnlich netzartig getüpfelte, fasrige Zellen. Die Pollen sind um die Hälfte kleiner als Pollen von *Crocus sativus L.*, triangulär, rauwandig und an den Austrittsstellen mit drei mehr oder weniger großen, blasigen Auswüchsen versehen. Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop mit Chloralhydratlösung R unter Verwendung der pulverisierten Droge (355). Dabei sind bei einer Verfälschung mit *Carthamus tinctorius L.* Bruchstücke der Epidermiszellen und Staubblätter sowie Pollen von diesem im Pulver zu finden.

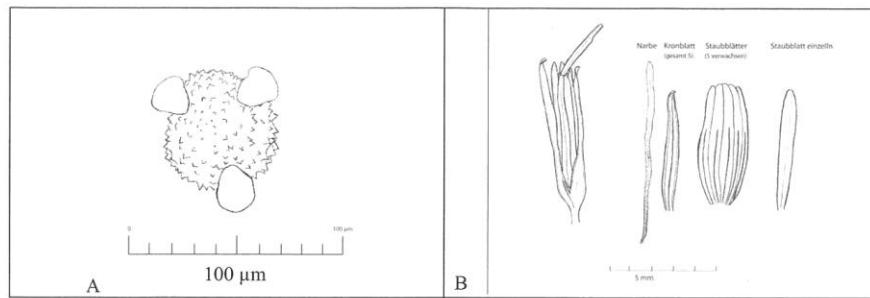


Abbildung 2:

A: Pollenkorn von *Carthamus tinctorius*
B: Übersicht der Röhrenblüte von *Carthamus tinctorius*

Dünnschichtchromatographie.

Das Chromatogramm der Prüfung auf Identität wird bei Tageslicht betrachtet.

Ergebnis: Im Chromatogramm der Untersuchungslösung tritt bei Verfälschung mit Färberdistelblüten eine hellrote Zone, wie in der nachfolgenden Abbildung dargestellt, auf.

Shikimisäure: Fluoreszenzlösung bei 254 nm	eine hellrote Zone
Saccharose: Fluoreszenzlösung bei 254 nm	
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Gehaltsbestimmung:

Flüssigchromatographie (2.2.29): Die Lösungen sind unmittelbar vor der Analyse herzustellen.

Referenzlösung: 5,00 mg Crocin 1 CRS werden in 1 ml DMSO gelöst und mit Wasser auf eine Konzentration von 0,300 mg/ml verdünnt.

Untersuchungslösung: 0,100 g Droge werden in einem kleinen Reagensglas (60 mm x 7 mm) mit Hilfe eines Glasstabes sorgfältig zerstoßen und in einem 10 ml Messkolben genau eingewogen. Dieser wird mit Ethanol 70 Prozent R aufgefüllt. Die Extraktion erfolgt unter Lichtausschluss und Eiskühlung 20 Minuten im Ultraschallbad. 1,00 ml des Filtrats werden in einen 5 ml Messkolben übergeführt und mit Ethanol 70 Prozent R aufgefüllt.

Säule:

- Größe: $l = 0,25 \text{ m}$, $\varnothing = 4,6 \text{ mm}$
- Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R ($5 \mu\text{m}$)

Mobile Phase:

Mobile Phase A: Wasser R , eingestellt auf pH 2,8 mit Essigsäure 99 Prozent R
Mobile Phase B: Methanol R

Zeit (min)	Mobile Phase A (% V/V)	Mobile Phase B (% V/V)
1 – 6	70 → 55	30 → 45
6 – 20	55 → 25	45 → 75
20 – 25	25 → 10	75 → 90
25 – 30	10	90

Durchflussrate: $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Detektion: Spektrometer bei 440 nm

Einspritzen: $10 \mu\text{l}$

Relative Retentionszeiten zum externen Standard (Crocin I):
Crocin 2: 1,13; Crocin 3: 1,53; Crocin 4: 1,57; Crocin 5: 1,67.

Der Prozentgehalt an Gesamtcrocinen wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{g(\text{Standard}) \cdot [A_1 + A_2 \cdot 0,834 + (A_3+A_4) \cdot 0,668 + A_5 \cdot 0,502] \cdot 100}{A_6 \cdot g(\text{Droge})}$$

A_1 : Peakfläche Crocin 1 (Probe)

A_2 : Peakfläche Crocin 2

A_3 : Peakfläche Crocin 3

A_4 : Peakfläche Crocin 4

A_5 : Peakfläche Crocin 5

A_6 : Peakfläche Crocin 1 (externer Standard)

0,834 = Korrekturfaktur für Crocin 2 bezogen auf Crocin 1

0,668 = Korrekturfaktur für Crocin 3 und Crocin 4 bezogen auf Crocin 1

0,502 = Korrekturfaktur für Crocin 5 bezogen auf Crocin 1

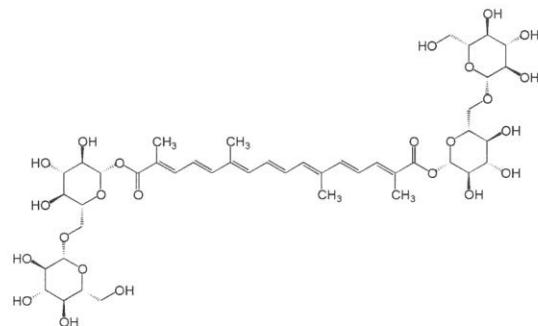
Lagerung

Vor Licht geschützt, in dicht schließenden Gefäßen.

ANHANG

Reagentien

Crocin 1



$C_{44}H_{64}O_{24} M_r = 976,98$
CAS No. 42553-65-1

erhältlich bei Chengdu Mansite Pharmaceutical Co. LTD, Chengdu, China
www.scmust.com

Diese Monographieversion wurde auf der Homepage der ÖAB-Expertenkommission veröffentlicht. Die Begutachtungsfrist dauert bis 30. November 2010.

Sofern es keinen Einspruch gibt, wird diese Safran-Monographie im ÖAB 2012 erscheinen.

5 *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH

5.1 Botanik und Verbreitung



Abbildung 26. *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH

Peucedanum ostruthium (L.) KOCH ist eine ausdauernde Pflanze der Familie der Apiaceae, die heute in fast allen Gebirgen Europas zu finden ist. Hegi (1921) berichtet auch über eine Verbreitung in Madeira, Korsika, Island, Großbritannien und Nordamerika.

Als ursprüngliche Heimat der Pflanze gelten die nördlichen Kalkalpen Europas. Die beliebte Anwendung der Meisterwurz in der Volksmedizin und folglich der Anbau in Hausgärten der Alpenländer begünstigten die Verbreitung (Willfort, 1979).

Die Meisterwurz bevorzugt feuchte, kalkreiche und von kurzer Vegetationszeit geprägte Standorte mit mineralreichem, gut durchlüftetem Erdreich.

Die unterirdischen Teile der Pflanze bestehen aus einem bis mehreren, durch unterirdische Ausläufer verbundenen Wurzelstöcken, wobei die Ausläufer ebenfalls Blattbüschel austreiben können. Der kaum verzweigte Stengel wird 30 bis 100 cm hoch, ist hohl, gerillt, stielrund und, ausgenommen der Region knapp unterhalb des Blütenstands, kahl.

Der Blütenstand ist eine flache, bis zu 50-strahlige Dolde mit zahlreichen Einzelblüten, die weiß bis rötlich gefärbte Kronblätter und verkümmerte Kelchblätter besitzen. Die Blütezeit ist, wie bei vielen anderen Gebirgspflanzen, erst im Sommer, Anfang Juli bis Ende August. Die unteren Laubblätter sind doppelt dreizählig, obere Laubblätter öfters nur noch einfach dreizählig. Sie sind kahl oder unterseits entlang der Nerven und am Rand behaart und entspringen einer großen, aufgeblasenen Blattscheide (Hegi, 1906).

Der Blattrand ist doppelt gesägt. An Hand der Gestalt der Blattsegmente und der Behaarung der Laubblätter unterscheidet man die Subspecies *ostruthium* (= var. *vulgare*) und die

Subspecies *angustifolium* (=var. *angustifolium*). Genauer wird diese Unterscheidung in der Diplomarbeit von Marc Bruck (1986) behandelt.

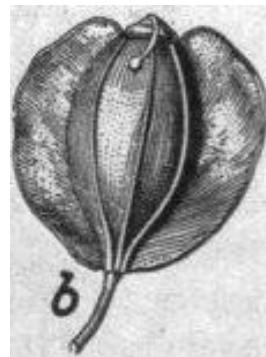


Abbildung 27. Frucht von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH aus „Illustrierte Flora von Mitteleuropa“ (Hegi G.) – modifiziert

Die rundliche Frucht von *Peucedanum ostruthium* ist 4-5 mm lang und besitzt breite Flügel, die eine Verbreitung durch Wind ermöglichen.

Die offizielle deutsche Bezeichnung von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH in Österreich und Deutschland ist „Meisterwurz“, wodurch man schon aus dem Namen auf eine große Bedeutung in der Anwendung schließen darf.

Tatsächlich ist die Meisterwurz bei der Erfassung der traditionell im Alpenraum angewandten Arzneipflanzen durch die VOLKS MED-Datenbank mit zahlreichen Nennungen vertreten. Als Gebirgspflanze ist sie vor allem in Südtirol, gefolgt von Vorarlberg und Salzburg als Arzneipflanze bekannt (siehe Abbildung 28).

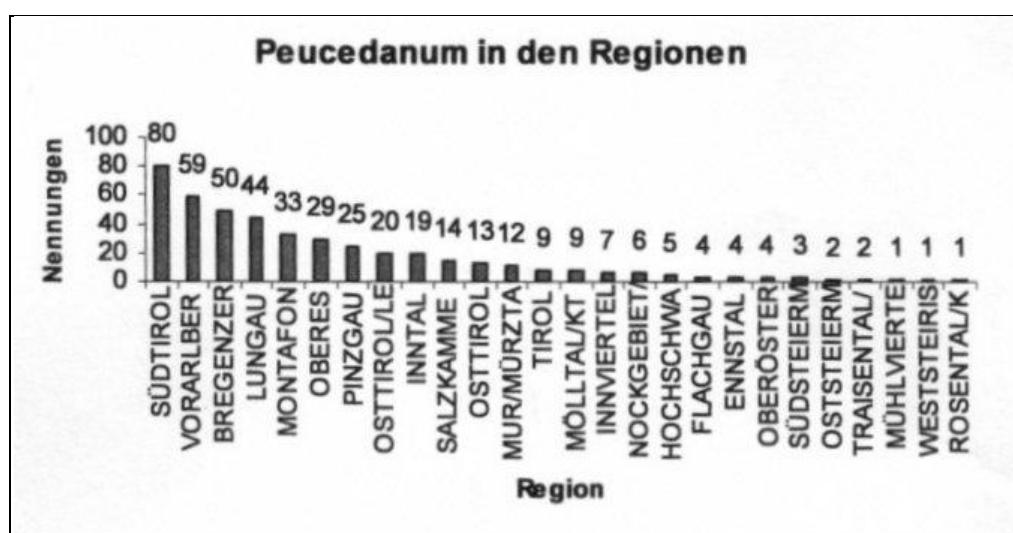


Abbildung 28. Anzahl der Nennungen von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH in der VOLKS MED-Datenbank (Gerlach, 2008)

Arzneilich angewandte Pflanzenteile sind die Wurzel und ferner das Kraut. Der Erntezeitpunkt der Wurzel ist üblicherweise Frühling, vor dem Austrieb, oder Spätherbst. Geerntet werden in der Regel zwei- bis dreijährige Pflanzen.

Verwechslungen sind selten und betreffen hauptsächlich Pflanzen, deren unterirdische Organe zur Erntezeit ein ähnliches Erscheinungsbild aufweisen: beispielsweise *Aconitum*-Arten, *Veratrum album* (L.), *Polygonum bistorta* (L.), *Astrantia major* (L.) und *Peucedanum officinale* (L.) (Tschirch, 1917).

5.2 Traditionelle Anwendung

Peucedanum ostruthium (L.) KOCH wird in der zugänglichen Literatur zumeist als eine typisch deutsche Arzneipflanze bezeichnet, wobei man darauf schließen muss, dass, auf Grund des Hauptverbreitungsgebietes der Meisterwurz, der deutschsprachige Gebirgsraum gemeint ist. Durch die weite Verbreitung und die hauptsächlich volksmedizinische Verwendung sind allerdings zahlreiche Synonyme für die Bezeichnung von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH im deutschsprachigen Raum bekannt. Aus Tschirch (1917) und Willfort (1979) lassen sich die folgenden, weiteren Bezeichnungen für die Meisterwurz zusammenfassen:

Kaiserwurz, Wohlstand, Ostriz, Haischwurz, Durstwurz, Krumputzwurzel, Magisterwurz, Magistranz, Ostranwurzel, Ostranzen, Ostruzwurz, Rauschwurz, Sirenenwurz, Staubwurz Strenzen, Stubwurz, Tropfenwurz, „Wurz aller Wurzen“.

In der Schweiz wird die Meisterwurz auch Strenze, Astrenz, Gärisch, Gerischwurz, Autricha, Abkraut, Beizakraut, wilde schwarze Gerste und wild oder römisch Kol genannt.

Volksmedizinisch bekannt ist die Meisterwurz auch in England (masterwood), Frankreich (benjoin français), im ehemaligen Böhmen (vsčdobr), in Kroatien (pukavica) und in Russland (carskij korenj).

Die Etymologie des Gattungsnamens *Peucedanum* wird aus dem Griechischen abgeleitet: [πεύχη (= peúke) = Fichte und δανός (= danós) = trocken, saftlos, niedrig] und geht auf DIOSKURIDES zurück, der wahrscheinlich *Peucedanum officinale* (L.) als Heilmittel verwendete. Dessen Laubblätter ähneln Fichtennadeln, weshalb er die Pflanze wahrscheinlich „kleine Fichte“ benannte. Eine andere Erklärung des Namensursprungs ist, dass das aus *Peucedanum officinale* (L.) gewonnene Harz, welches ebenfalls in der Antike medizinischen Einsatz fand, mit Fichtenharz verglichen wurde (Madaus, 1976).

Zur Entstehung des Artennamens gehen die Meinungen in der Literatur auseinander.

Zwei potentielle Erklärungen erscheinen, laut Tschirch (1917), plausibel:

Einerseits könnte das griechische Wort für Sperling [σπουργίτης (=spourgítis)] der Ursprung des Artennamens sein, da die Form der Blätter von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH an einen fliegenden Vogel erinnern. Andererseits könnte der Artenname auch aus der latein-

ischen Sprache stammen. Von *os* = Mund und *terere* = reiben, da die Meisterwurz einen scharf-bitteren Geschmack hat und eine starke Salvitation bei der Verkostung auslöst.

Genauso vielfältig wie die Namensgebungen für die Meisterwurz sind die überlieferten Anwendungsgebiete.

Erstmals „erwähnt schon im 10. Jahrhundert der französische Arzt Macer Floridus eine Pflanze „struthion, ostrutium“ gegen Gelbsucht und andere Leberkrankheiten, Steinbeschwerden, Blutspeien, Aussatz usw., jedoch kann diese auch auf eine andere Pflanze gedeutet werden.“ schrieb Madaus (1976).

Im 12. Jahrhundert wird die Meisterwurz von Hildegard von Bingen unter dem heute noch in der Schweiz gebräuchlichen Namen Astrenz angewandt.(Tschirch, 1917).

Ab dem 16. Jahrhundert ist die Meisterwurz in vielen Kräuterbüchern zu finden. So widmet zum Beispiel Leonhart Fuchs in seinem Werk „The new herbal of 1543“ der Meisterwurz ein Kapitel (Cap. CCXCIII). Darin geht er näher auf den „Namen“ der Meisterwurz ein, die er „*Laserpitium germanicum*“ nennt. Weiters behandelt er die „Gestalt“, die „*Statt irer wachlung*“ und die „Zeit“ (Erntezeit) der Meisterwurz. Außerdem enthält das Werk eine für die damalige Zeit sehr genaue Abbildung der Pflanze.

Ebenfalls aus dem 16. Jahrhundert wird Hieronymus Bock von Willfort (1979) über die Anwendung der Meisterwurz folgendermaßen zitiert: „...würt sie fürs rindviehe gepflanzet/dem gibt man sie gepülvert mit saltz“.

Paracelsus soll die Meisterwurz bei Meteorismus, als Infektionsprophylaxe und gegen Spinnengifte eingesetzt haben, sowie als Mittel gegen Tuberkulose und Würmer (Madaus, 1976). Weiters soll Paracelsus gesagt haben „*So einer für und für Durst leidt, so die Zung alleweg leer ist, soll man Ostrutio in Wein legen*“ (Flamm, Kroeber und Seel, 1940).

Nach der Einführung der Meisterwurz in die Therapiepraktiken der mittelalterlichen Gelehrten und deren Lobeshymnen über die Wirkung, erfreute sich die Meisterwurz immer größerer Beliebtheit in der Volksmedizin. Die überlieferten, potentiellen Anwendungsgebiete der Meisterwurz sind nachstehend aufgelistet. Einige davon konnten schon in pharmakologischen Studien bestätigt werden (siehe Kapitel 5.4, S. 57).

Zur innerlichen Anwendung werden ausschließlich die unterirdischen Organe der Meisterwurz verwendet. Diese gelten als wirksam:

- gegen Magenleiden (Hegi, 1906; Madaus, 1976)
- gegen Durchfall und Windkolik (Flamm, Kroeber und Seel, 1940)
- bei Uteruskrämpfen und Dysmenorrhöe (Flamm, Kroeber und Seel, 1940)

- gegen Schnupfen, Bronchialkatarrh und Asthma bronchiale, vor allem bei zähem Schleim und Stauungen als Expektorans (Hegi, 1906; Madaus, 1976)
- gegen Fieber, auch gegen Malaria (Madaus, 1976) und pestartige, ansteckende Krankheiten (Hegi, 1906)
- gegen Harn- und Nierensteine und auch bei Gicht, vermutlich auf Grund von diuretischer Wirkung (Madaus, 1976)
- gegen alle möglichen Gifte und gegen Infektionen durch Hundebiss (Hegi, 1906)
- zur Beruhigung von Delirium tremens , welches durch Alkoholexzess bzw. beim Alkoholentzug des Alkoholkranken auftritt, und auch zur Beruhigung epileptischer Anfälle (Hegi, 1906; Madaus, 1976)
- gegen entzündliche Erkrankungen wie Rheuma, Hüftgelenksentzündung, Ischias und Drüsenentzündungen (Madaus, 1976)
- bei Arteriosklerose und zur Vorbeugung der Apoplexie (Madaus, 1976)
- bei Milztumoren (Madaus, 1976) und gegen „unreine Geschwüre“ (Flamm, Kroeber und Seel, 1940)
- bei Diabetes mellitus (Madaus, 1976)
- und gegen Heufieber (Madaus, 1976).

Die Zubereitungsart der Arzneidroge zur inneren Anwendung hängt von der Indikationsstellung ab. Eine kleine Rezeptsammlung bietet Madaus (1976) in seinem Buch an. Er rät zur Zubereitung eines Mazerats aus der Wurzeldroge für die Behandlung von Bronchitis und bei der Anwendung als Stomachikum.

Außerdem empfiehlt er die Zugabe von Meisterwurz in klassische Abführtees, in denen sie kolikartigen Beschwerden entgegenwirken soll.

Dr. Hugo Schulz (1919) empfiehlt ein Dekokt der Wurzel im Verhältnis 3 : 16 mit Wasser bei Delirium tremens.

Für alle anderen Indikationsstellungen zur innerlichen Anwendung der Meisterwurz wird die klassische Teezubereitung empfohlen unter Verwendung von $\frac{1}{2}$ (Madaus, 1976) bis 1 (Willfort, 1979) Teelöffel Wurzeldroge auf eine Teetasse. Von diesem Tee sollte, laut Willfort, maximal ein bis zwei, höchstens drei Tassen pro Tag getrunken werden.

Das „Lehrbuch der biologischen Heilmittel“ von Madaus (1976) ist die einzige, verfügbare Literaturquelle, in der von der homöopathischen Anwendung der Meisterwurz berichtet

wird. Zu seiner Zeit war, eine Verreibung der frischen Wurzel, eingestellt auf 50 % Pflanzen- substanz, in Verwendung, von der bis zu drei Mal täglich ein halber Teelöffel eingenommen werden sollte. Diese Zubereitung, „Teep“, wurde bei Magen- und Hautleiden verabreicht. Die aktuelle homöopathische Anwendung umfasst die heute üblichen homöopathischen Darreichungsformen wie beispielsweise Globuli und Tropfen mit denselben Indikations- stellungen wie die des „Teeps“.

Zur äußerlichen Anwendung der Meisterwurz gibt es von Madaus (1976) folgende Überliefe- rung:

- „*äußerlich soll sie Geschwülste zerteilen und faules Fleisch verzehren*“,

wobei hier Wurzel und Blatt zur Anwendung kommen. Er gibt in seinem Buch ein Rezept für eine Meisterwurzsalbe an, die bei Blutvergiftung mehrmals täglich auf die betroffene Wunde aufgetragen werden sollte. Zur Herstellung dieser Salbe sei pulverisierte Wurzel- und Blatt- droge mit ausreichend Olivenöl zu vermengen, dass eine Salbe entstehe.

Aus Tschirchs „Handbuch der Pharmakognosie“ (1917) kann man entnehmen, dass eine Mo- nographie für die Meisterwurz bis 1882 Bestandteil der Pharmkopoea germanica II und bis 1893 der Pharmkopoea helvetica III gewesen ist.

Des Weiteren war die Meisterwurz gemeinsam mit Angelikawurzel und Liebstöckelwurzel in der Rezeptur des Spiritus carminativus Sylvii vertreten.

Ab dem 20. Jahrhundert ist die Meisterwurz in der Allopathie mehr und mehr in Vergessen- heit geraten. Ausschließlich das Deutsche Arzneibuch aus 1941 enthält im 6. Ergänzung- band eine Meisterwurz-Monographie, welche aber in folgende Ausgaben nicht übernommen wurde.

Volksmedizinisch besonders bekannt ist der unter Verwendung der Wurzel hergestellte, Meisterwurzschnaps oder Meisterwurzbranntwein. Meisterwurzschnaps wird durch einlegen der Wurzel in Schnaps gewonnen (Willfort, 1979), während der Meisterwurzbranntwein durch Destillation hergestellt wird (Flamm, Kroeber und Seel, 1940). Beide werden innerlich bei Verdauungsbeschwerden und äußerlich zur Wunddesinfektion verwendet.

„*Bei Magenvergiftung durch verdorbene oder vergiftete Speisen (Schwämme !) [Annahme: gemeint ist Schimmelpilz] soll man Meisterwurz in Wein aufkochen und alle Viertelstunde 2 Esslöffel voll einnehmen*“ schreibt Willfort (1979). In Kölbl's Kräuterfibel (1993) findet man den Einsatz gegen Lebensmittelvergiftungen ebenfalls, wobei hier noch angemerkt ist, dass man Weißwein verwenden soll.

Weiters ist überliefert, dass auf schlecht heilende Wunden frische Blätter von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH aufgelegt werden sollen (Willfort, 1979).

Auch Tiere werden in der Volksmedizin mit Meisterwurz-Zubereitungen behandelt. Gegen Blutvergiftung und eitrige Wunden des Tieres soll der Meisterwurz-Tee äußerlich an- gewandt werden. Dieser soll auch erfolgreich gegen Maul- und Klauenseuche eingesetzt worden sein. Dafür wurde er einerseits äußerlich, an den betroffenen Stellen, angewandt, andererseits auch gleichzeitig dem Futter beigemengt (Willfort, 1979).

Im Brauchtum der Alpenländer ist die Meisterwurz stark vertreten.

Es ist zum Beispiel üblich, den Wurzelstock über der Haustür oder dem Stalleingang zu positionieren, was Schutz gegen Krankheiten bringen soll. Ebenso wird in den Raunächten der Wohnraum und die Stallungen mit der getrockneten Meisterwurz ausgeräuchert (Willfort, 1979).

Aus Meisterwurzstücken gefertigte Ketten sollen bei Zahnschmerzen getragen worden sein, sowie Kleinkindern das Zähne erleichtern (Madaus, 1976).

Diese aus verschiedenen Büchern zusammengetragenen Anwendungsgebiete der Meisterwurz, die bis jetzt genannt worden sind, decken sich weitgehend mit den Umfrageergebnissen, die im Zuge der Erstellung der VOLKS MED-Datenbank durchgeführt wurden. Vor allem die magenstärkende Wirkung und die Anwendung als Räuchermittel sind bis heute auch mündlich überliefert.

So fasst Gerlach in ihrer Dissertation (2008) zusammen: „*Meisterwurz wird sehr häufig als Räuchermittel mit desinfizierender Wirkung verwendet (39 Nennungen). Juniperus hat zum Räuchern zum Beispiel als zweitgenannte Droge nur 22, gefolgt von Acorus mit 14. Die Hauptanwendungsgebiete sind aber Magen und Darmtrakt.*“

Die folgende Abbildung 29 ist aus der Dissertation Gerlachs entnommen und zeigt die derzeitige volksmedizinische Anwendung der Meisterwurz laut den Umfrageergebnissen der VOLKS MED-Datenbank.

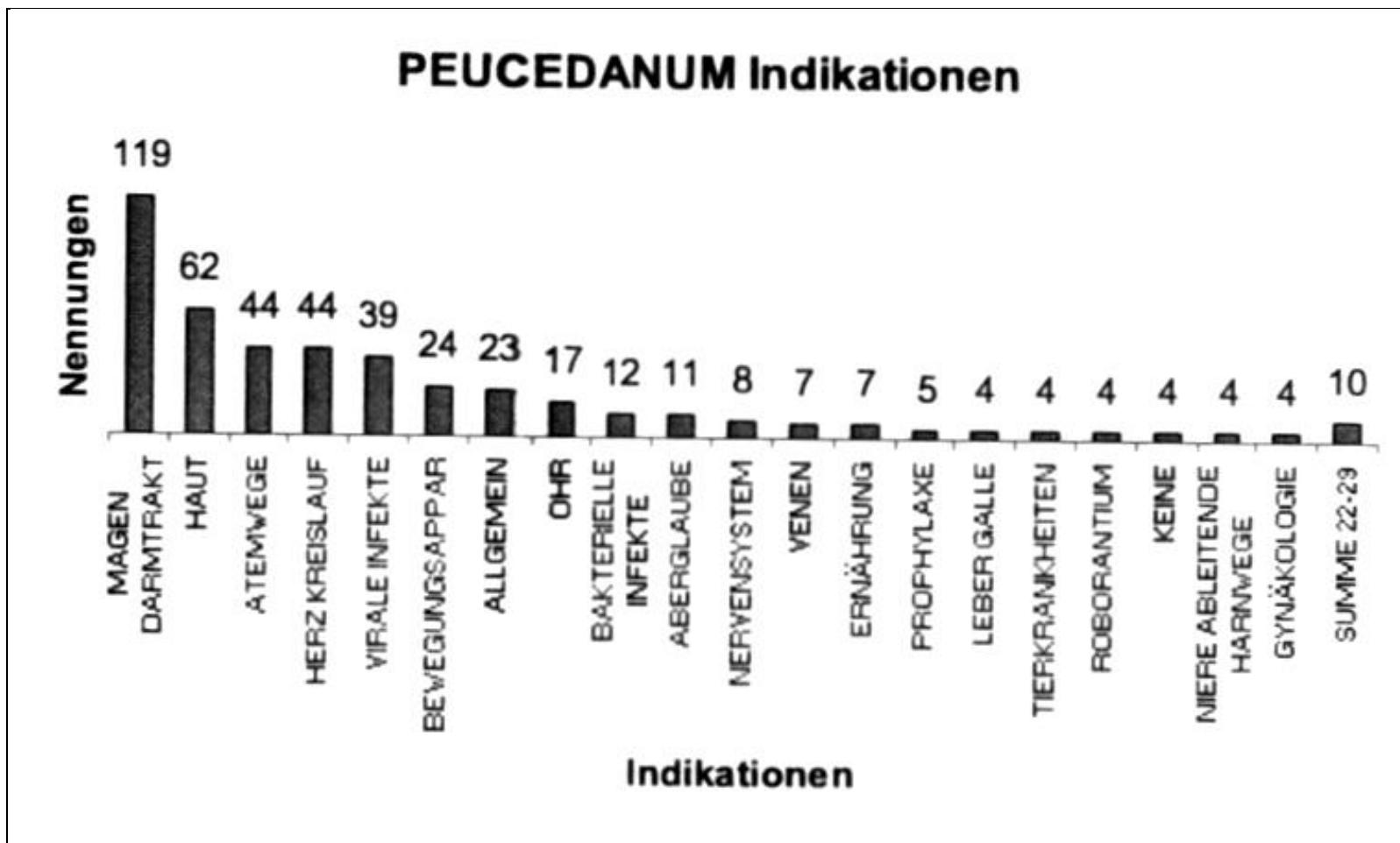
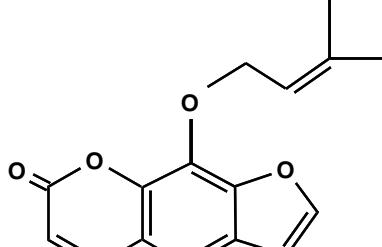
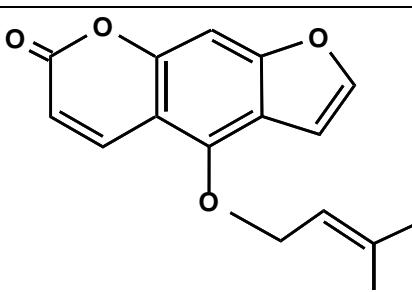
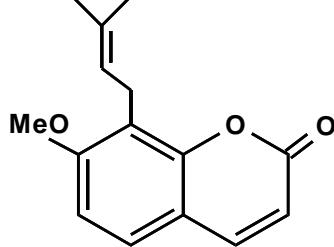
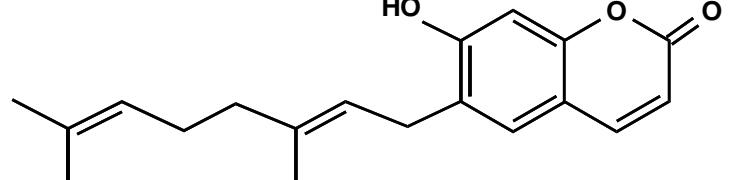
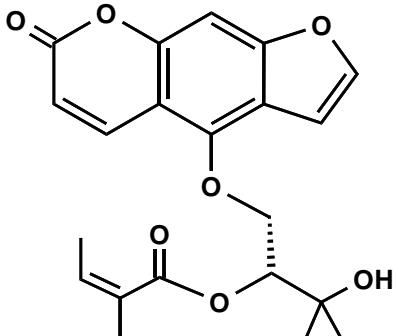


Abbildung 29. Hauptanwendungsgebiete der „Meisterwurz“ laut den Nennungen in der Volkmed-Datenbank (Gerlach, 2008)

5.3 Inhaltsstoffe der Wurzel

Cumarine und Furanocumarine:

Imperatorin	
Isoimperatorin	
Osthol	
Ostruthin	
Ostruthol	

Oxypeucedanin (Hydrat)	
Peucenin	

Tabelle 29. Cumarinartige Inhaltsstoffe von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH

Ätherisches Öl:

Laut Literaturangaben (Cisowski et al., 2001) enthält die Wurzeldroge bis zu 1,25 % ätherisches Öl. Die in dieser Arbeit getesteten Wurzeldrogen hatten einen Höchstgehalt von 0,70 % ätherischem Öl. (siehe Kapitel 5.5.6.2, S. 85)

Die einzige Studie zu den Inhaltsstoffen des ätherischen Öls wurde an der Warschauer Medizinuniversität (Cisowski et al., 2001) durchgeführt. Es konnten 29 Inhaltsstoffe mittels GC-MS identifiziert werden, darunter als Hauptinhaltsstoffe Sabinen und 4-Terpineol.

Phtalide (laut Gijbels et al., 1984)

- Cnidilid
- Z-Ligustilid
- Senkyunolid

Flavonoide (laut Gerlach, 2008)

5.4 Pharmakologisch belegte Wirksamkeit

Pharmakologische Studien über die Meisterwurz sind zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht sehr zahlreich.

Den Furanocumarinen Imperatorin und Isoimperatorin konnte eine insektizide Wirkung nachgewiesen werden. Die relativen Wachstumsraten der Larven von *Spodoptera littoralis* wurden durch die Zugabe dieser Furanocumarine in das Nährmedium reduziert, ebenso der relative Nährmedienkonsum der Larven.

Die Zugabe der Cumarine Ostruthin und Osthol ins Nährmedium der Larven hatte keine Auswirkungen auf das Wachstum (Hadacek et al., 1994).

1998 konnte von Hiermann und Schantl eine entzündungshemmende Wirkung des oral eingenommenen 10 prozentigen ethanolischen Extraktes der Wurzeldroge festgestellt werden. Dieser wurde im Tierversuch an Ratten getestet. Die durch Carrageen ausgelösten Pfotenödeme der Ratten gingen um 50 Prozent zurück. In Folge wurde als bioaktive Komponente das 6-(3-Carboxybut-2-enyl)-7-hydroxycoumarin identifiziert, welche, wie auch der gesamte Extrakt, in weiteren biologischen Testsystemen (perfundierte Hasenohr, subkutane Injektion in fieberinduzierte Ratten) antiphlogistische und antipyretische Wirkungen zeigte. Eine im Jahr 2003 veröffentlichte Untersuchung von Schinkovitz et al. ergab, dass der Dichlormethan-Auszug der Wurzeln von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH antimykobakterielle Aktivität, vergleichbar mit Isoniazid und Etambutol, aufweist. Getestet wurde am *Mycobakterium fortuitum*. Schließlich konnte Ostruthin als wirksame Komponente isoliert werden.

Weiters wurde 2005 von Urbain et al. veröffentlicht, dass die Cumarine Ostruthin, Imperatorin, Ostruthol und das Chromon-Derivat Peucenin, isoliert aus Dichlormethan-Auszügen von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH, die Acetylcholinesterase-1 hemmen.

5.5 Ergebnisse

Ziel dieser Diplomarbeit ist Untersuchungen an Handelsdrogen durchzuführen, deren Ergebnisse für die Erstellung der Arzneibuchmonographie von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH herangezogen werden.

Die Untersuchungen werden an Hand den EDQM-Stilvorgaben zur Erstellung von Monographien durchgeführt. Weitere Leitlinien zur Erstellung der ÖAB-Monographie sind die Monographien der Apiaceen „Angelikawurzel“ und „Liebstöckelwurzel“ des Europäischen Arzneibuches Ausgabe 6.

5.5.1 Makroskopische Merkmale der unterirdischen Teile

Die unterirdischen Teile von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH, die traditionell als Arzneidroge verwendet werden, sind in Abbildung 30 (S. 59) zeichnerisch dargestellt.

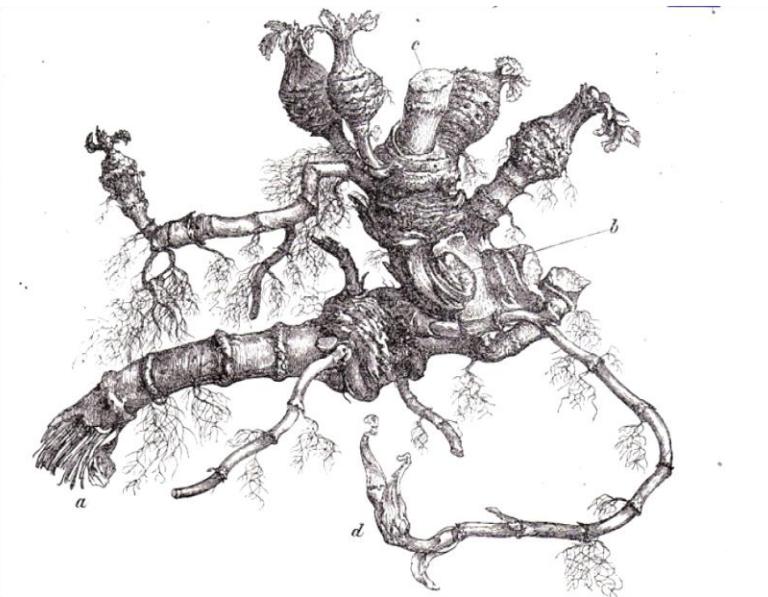


Abbildung 30. Unterirdische Teile von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH
aus „Handbuch der Pharmakognosie“ (Tschirch, 1917)

Laut Tschirch (1917) bestehen die unterirdischen Teile meist aus einem Zentralwurzelstock und mehreren Nebenwurzelstöcken. Beide haben Speichersprossregionen und Wandersprossregionen, die durch die Abstände zwischen den Internodien unterschieden werden. Die Internodien der Speichersprosse liegen eng beieinander, während sie in Wandersprossregionen in größerem Abstand zueinander vorkommen.

An Hand der Proben aus Wildsammlungen (Probe KHWPO5 und Probe KHWPO6) konnte der in Abbildung 30 dargestellte morphologische Aufbau der unterirdischen Teile nachvollzogen werden.

Beispielsweise ist auf Abbildung 31 ein Speicherrhizomstück aus der Wildsammlung KHWPO5 zu sehen, dem an den Internodien Wurzeln entspringen. Oberseits verjüngt sich das dicke Speicherrhizom zumeist sprossartig. Diese verholzten Teile bilden beim Durchtritt der Oberfläche eine Blattscheide aus.

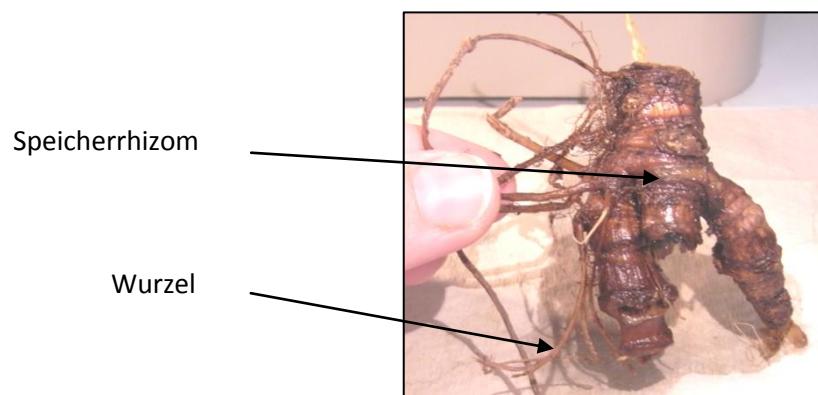


Abbildung 31. Speicherrhizomstück von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH

Abbildung 32 zeigt ein Wanderrhizomstück, mit gut erkennbarer Längsrunzelung an Rhizom und Wurzeln. Die dickeren Wurzeln, die vom Rhizom ausgehen, verzweigen zu dünneren Wurzeln, teilweise entspringen dem Wanderrhizom selbst dünne haarähnliche Wurzeln.

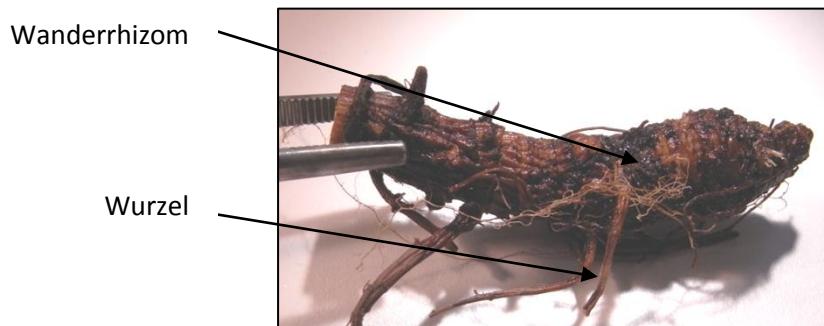


Abbildung 32. Wanderrhizomstück von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH

Die Übergänge zwischen Speicher- und Wanderrhizom sind fließend, weshalb eine eindeutige Zuordnung schon bei Ganzdrogen nur bedingt möglich ist.

Im Monographie-Entwurf für die Meisterwurz wird die Unterscheidungsmöglichkeit von Speicher- und Wanderrhizom in der Identitätsprüfung A erwähnt. In Schnittdrogen ist die Unterscheidung kaum möglich. Es ist nur festzustellen, dass makroskopisch heterogen aussehende Teile, denselben anatomischen Aufbau, nämlich den eines Rhizoms, im Mikroskop aufweisen.

Im Querschnitt der Ganzdroge (*Abbildung 33*) ist ein dunkler Korkring zu erkennen, mit hellem Grundgewebe, dessen Mark fehlen oder dunkler gefärbt sein kann. Der Holzkörper ist von fasriger Struktur.



Abbildung 33. Querschnitt durch ein Wanderrhizomstück von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH

Der komplizierte Aufbau der unterirdischen Teile von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH spiegelt sich in der Heterogenität der geschnittenen Handelsdrogen wieder. Hinzu kommt ein fasriger, zum Teil auch staubiger Bruch der getrockneten Droge, sodass, wahrscheinlich abhängig vom Werkzeug der Drogenlieferanten, der Zerkleinerungsgrad der gelieferten

Handelsdrogen stark schwankt.

Trotz des oft hohen Zerkleinerungsgrades der Schnittdrogen findet man folgende Bruchstücke in allen Handelsdrogen (siehe Abbildung 34).

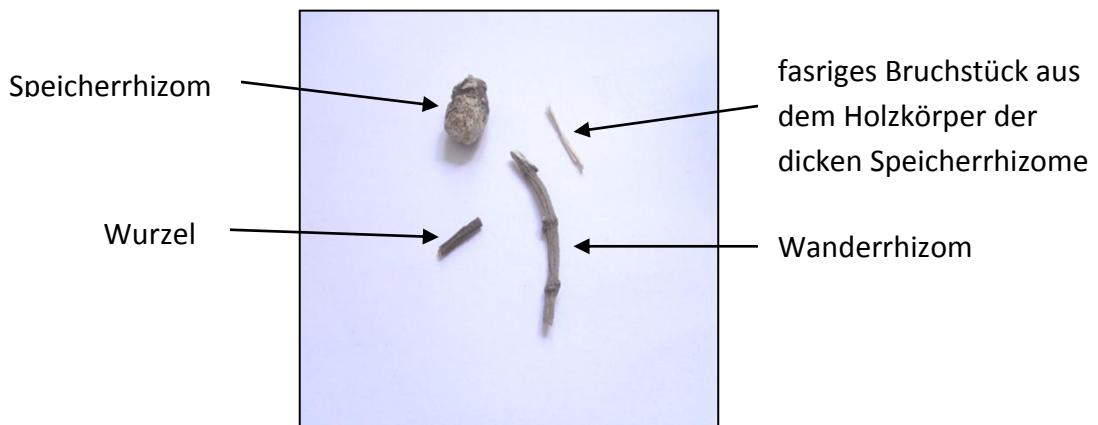


Abbildung 34. Typische Bestandteile der handelsüblichen Schnittdrogen von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH

5.5.2 Mikroskopie der unterirdischen Teile

Arzneibuchmonographien von Wurzeldrogen enthalten im Punkt B der Identitätsprüfung die Beschreibung des mikroskopischen Bildes im Querschnitt.

Die Identitätsprüfung C ist die mikroskopische Beschreibung der typischen Merkmale in der pulverisierten Droge. In neuen und überarbeiteten Monographien müssen diese Pulvermerkmale zeichnerisch dargestellt werden.

5.5.2.1 Querschnitt

Abbildung 35 und Abbildung 36 zeigen Querschnitte durch Rhizom und Wurzel von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH.



Abbildung 35. Rhizom-20-fache Vergrößerung

Abbildung 36. Wurzel-40-fache Vergrößerung

Die Korkschicht (siehe Abbildung 35, Abbildung 36, S. 61) ist dünn und dunkelbraun bis schwarz. Sowohl bei Rhizom als auch bei der Wurzel sind im sekundär verdickten Zustand die radiären Gefäßbündel durch breite Markstrahlen getrennt. Im Xylem der Gefäßbündel wechseln weitlumige Tracchen und englumige, in Gruppen beisammen stehende, Libriformfasern einander ab (Abbildung 37).

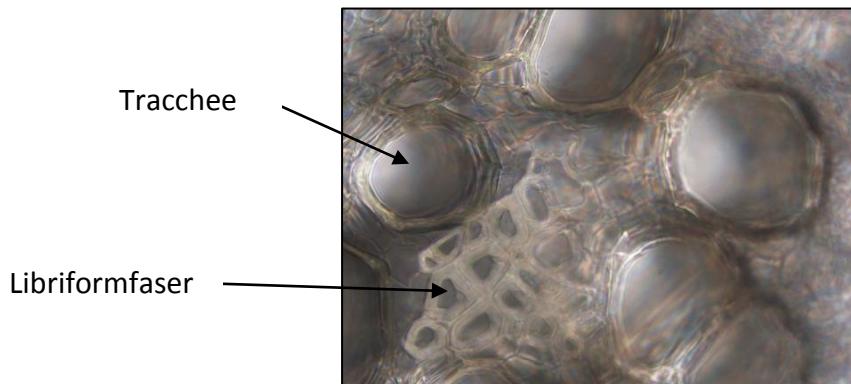


Abbildung 37. Tracchen und Libriformfasern
in 400-facher Vergrößerung

5.5.2.1.1 Charakteristische Merkmale

In Meisterwurz-Querschnitten ist ein Keratenchym vor allem im Anschluss an den Phloemteil der Gefäßbündel zu sehen. Es besteht aus Zellen mit hellen, unregelmäßig verdickten Zellwänden. Großflächig tritt es im Rhizom und auch in primären Wurzeln auf.

Abbildung 38 zeigt einen Keratenchym-Ausschnitt mit angrenzenden Zellen eines Markstrahls in 100-facher Vergrößerung.

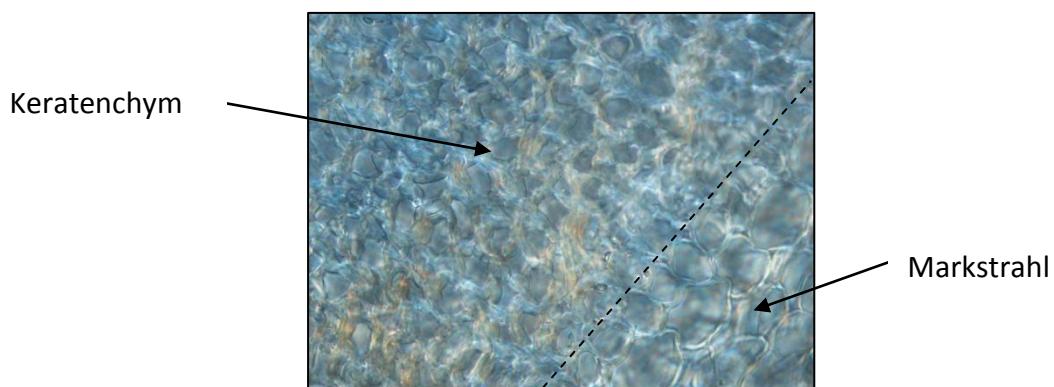


Abbildung 38. Ausschnitt eines Keratenchyms
von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH in
100-facher Vergrößerung

Das spezifischste Merkmal des mikroskopischen Bildes im Querschnitt der Meisterwurz sind die schizogenen Sekretbehälter (siehe Abbildung 35, Abbildung 36, S. 61).

Diese kommen im Rhizom in der primären Rinde, im sekundären Phloem und im Mark vor. In der Wurzel sind sie ebenfalls in der Rinde zu finden. Verglichen mit Sekretbehältern anderer Apiaceen-Wurzeln haben sie einen beachtlichen Durchmesser, sodass sie teilweise mit freiem Auge, allenfalls aber mit der Lupe erkennbar sind. Sie sind mit gelbem, dickflüssigem Sekret mit starkem Geruch gefüllt. In Schnittdrogen liegen die Sekretgänge häufig auch leer vor.

Stichprobenartige Messungen (Anzahl der Messungen n=23) des Durchmessers der Sekretgänge in der primären Rinde des Rhizom ergeben einen Median von 265,3 µm.

Für die Sekretgangdurchmesser der sekundären Rinde des Rhizom liegt der Median bei 52,8 µm (n=13). Der Median für die Messungen im Mark (n=19) ist 74,6 µm.

(siehe Abbildung 39)

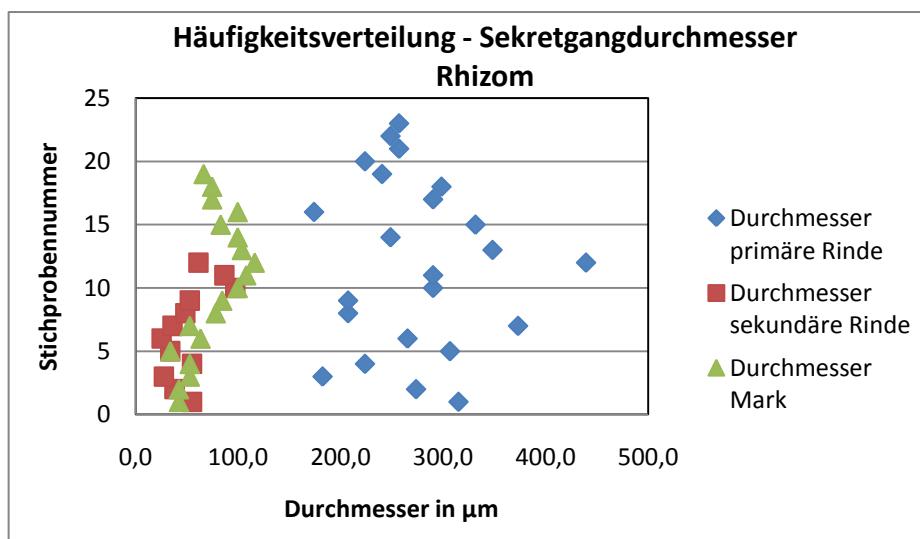


Abbildung 39. Häufigkeitsverteilung der Sekretgänge im Rhizom von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH

Durch die geringe Stichprobengröße sind die Messungen zwar nicht repräsentativ, bestätigen aber die Angaben aus der Literatur zu den Größenverhältnissen der Sekretgänge im Rhizom (Berger, 1949; Tschirch, 1917).

In der Wurzel ist der Median des Durchmessers der Sekretgänge 73,9 µm (n=12). Die Zuordnung zu primärer und sekundärer Rinde wurde hier unterlassen, da die primäre Rinde der Wurzel häufig abgestoßen wird.

Da keine weiteren spezifischen Merkmale für die Unterscheidung von Apiaceen-Wurzeln im Querschnitt zur Verfügung stehen, ist auch der Tracheendurchmesser als Unterscheidungsmöglichkeit in Betracht zu ziehen. Dafür wurden die Durchmesser von Tracheen in Wurzel und Rhizom gemessen. Der Median der Messungen zur Wurzel ist 21,1 µm und zum Rhizom 18,5 µm.

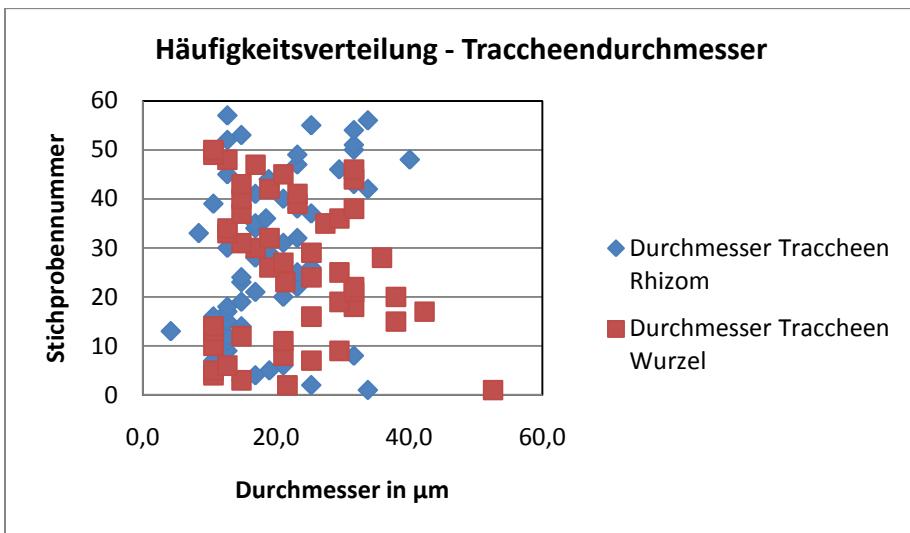


Abbildung 40. Häufigkeitsverteilung der Traccheendurchmesser von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH

Abbildung 40 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Traccheendurchmesser in Rhizom und Wurzel. An Hand der Durchmesser der Traccheen kann folglich die Unterscheidung zwischen Rhizom und Wurzel nicht getroffen werden. Die Relevanz in Bezug auf die Unterscheidung von anderen Apiaceen mittels Traccheendurchmessers müsste noch genauer untersucht werden.

5.5.2.1.2 Vergleich mit anderen Apiaceen

Die mikroskopische Unterscheidung der Meisterwurz von anderen Apiaceen ist unter Verwendung des Querschnitts durch die Größe und die Verteilung der Sekretgänge möglich. Beispielsweise bestehen die unterirdischen Teile von *Aegopodium podagraria* (L.) wie die Meisterwurz aus Rhizom und Wurzel. Die Sekretgänge im Rhizom sind allerdings im Vergleich zur Meisterwurz von geringerer Größe. Außerdem befindet sich ein Kollenchymring im Anschluss an die dünne Korkschicht (Abbildung 41, S. 65).

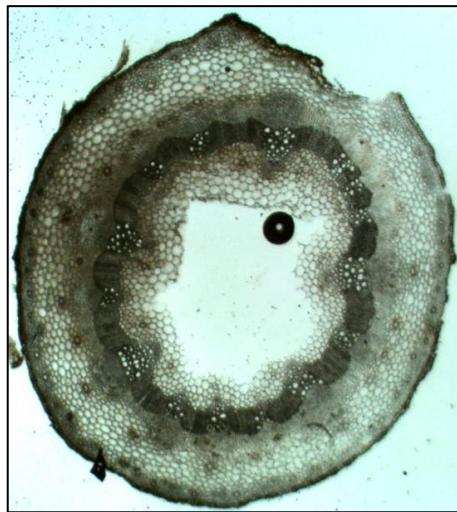


Abbildung 41. Rhizomquerschnitt von *Aegopodium podagraria* (L.)
20-fache Vergrößerung

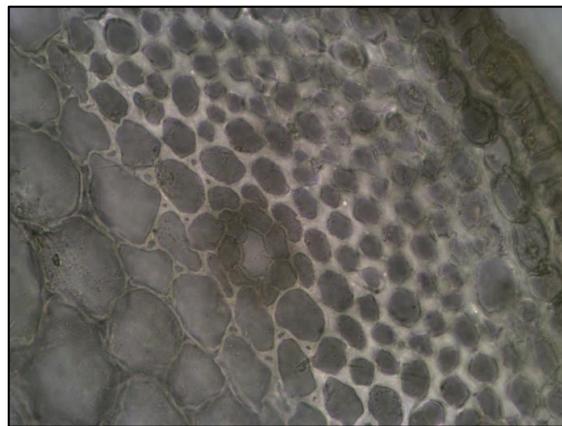


Abbildung 42. Rhizomquerschnitt von *Aegopodium podagraria* (L.)
Kollenchymring mit Sekretgang
400-fache Vergrößerung

Nur die Unterscheidung kleinster Wurzeln von *Peucedanum ostruthium* (L.) (Abbildung 43) und *Aegopodium podagraria* (L.) (Abbildung 44) ist an Hand des Querschnittes nicht möglich.



Abbildung 43. *Aegopodium podagraria* (L.)

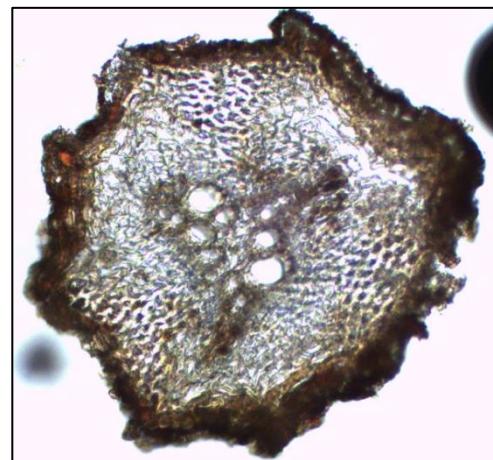


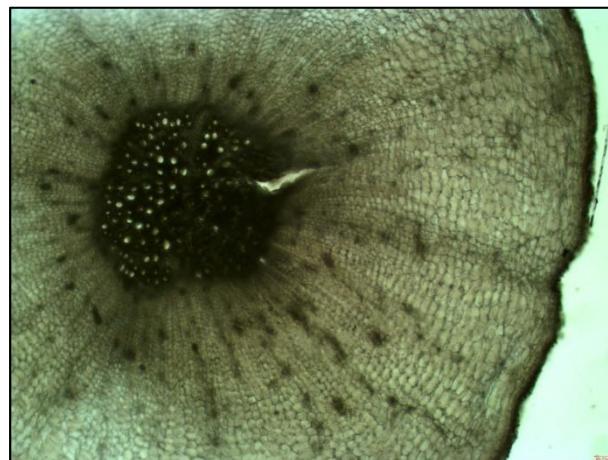
Abbildung 44. *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH

Die unterirdischen Teile von *Chaerophyllum aromaticum* (L.) bestehen nur aus Wurzeln. Auch hier sind die Sekretgänge deutlich kleiner als bei der Meisterwurz.



**Abbildung 45. Wurzelquerschnitt von *Chaerophyllum aromaticum* (L.)
20-fache Vergrößerung**

Die Bibernellwurzel, die auch ins ÖAB neu aufgenommen wird, weist ebenso Sekretgänge mit deutlich kleinerem Durchmesser auf.



**Abbildung 46. Wurzelquerschnitt Pimpinellae Radix
20-fache Vergrößerung**

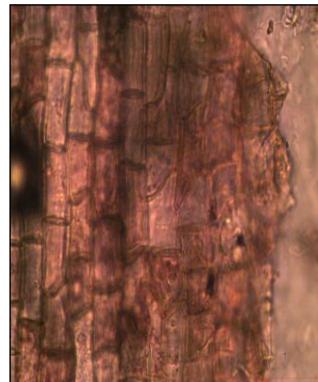
5.5.2.2 *Pulver*

Die Mikroskopie des Pulvers ergänzt die mikroskopische Identitätsprüfung. Das Pulver aus den unterirdischen Teilen der Meisterwurz hat eine gelbbraune Farbe und riecht stark aromatisch.

5.5.2.2.1 *Merkmale*

Unter Verwendung von Chloralhydrat *R* sind in den Pulverpräparaten nur unspezifische Merkmale zu finden. Dazu zählen:

- Korkfragmente



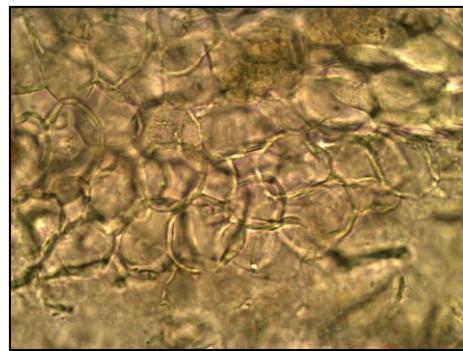
**Abbildung 47. Korkfragmente aus gepulverter Probe KHWPO 1
400-fache Vergrößerung**

- Parenchymzellen im Längsschnitt



**Abbildung 48. Parenchymzellen im Längsschnitt aus gepulverter Probe KHWPO 1
400-fache Vergrößerung**

- Parenchymzellen im Querschnitt



**Abbildung 49. Parenchymzellen im Querschnitt aus gepulverter Probe KHWPO3
400-fache Vergrößerung**

- getüpfelte Libriformfaser-Bruchstücke



**Abbildung 50. Libriformfaser aus gepulverter Probe KHWPO1
100-fache Vergrößerung**

- Bruchstücke von Traccheen



**Abbildung 51. Traccheenbruchstück aus gepulverter Probe KHWPO1
400-fache Vergrößerung**

5.5.2.2.2 Vergleich mit anderen Apiaceen

Die vorhandenen Vergleichsdrogen weisen gepulvert dieselben Merkmale wie das Meisterwurzpulver auf, was eine Erkennung von ver- oder gefälschtem Meisterwurzpulver in Chloralhydrat R-Präparaten unmöglich macht.

In Wasserpräparaten oder unter Verwendung einer 50-prozentigen Lösung (V/V) von Glycerol R können die Stärkekörner als weiteres Unterscheidungsmerkmal für die Wurzeldrogen dienen.

Alle unterirdischen Teile der Meisterwurz enthalten Stärkekörner. Sie liegen vor allem in den Parenchymzellen des Marks und der Rinde dicht aneinander gedrängt vor. Somit sind diese auch im Pulver frei und teilweise noch in Parenchymzellen zu finden. Ein Merkmal der Stärkekörner der Meisterwurz ist das nur schwach sichtbare Auslöschungskreuz bei Betrachtung unter polarisiertem Licht (siehe Abbildung 52). Gelegentlich beobachtet man auch Stärkekörner mit ovaler Form.

Im Rhizom wurden Stärkekorndurchmesser von 2,1 µm bis 14,7 µm gemessen und in der Wurzel von 4,2 µm bis 12,7 µm. Der Median aller Stärkekornmessungen der Meisterwurz liegt bei 5,3 µm (n = 61), während dieser Wert für *Aegopodium podagraria* (L.) bei 8,4 µm (n = 56) und für *Chaerophyllum aromaticum* bei 7,4 µm (n = 20) liegt.

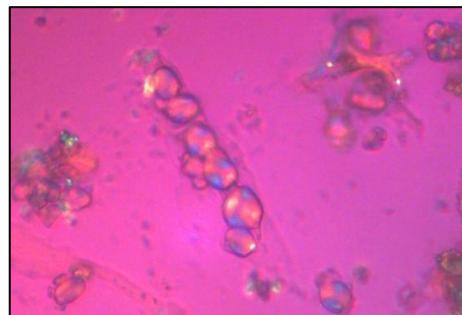


Abbildung 52. Stärkekörner von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH
400-fache Vergrößerung

Die Stärkekörner der zum Vergleich vorhandenen Apiaceen haben eine ähnliche Beschaffenheit wie die Stärkekörner der Meisterwurz.

Im Pulver von *Chaerophyllum aromaticum* (L.) liegen sie zumeist in Haufen vor (Abbildung 53, S. 70) und weisen teilweise ein asymmetrisches Bildungszentrum auf.

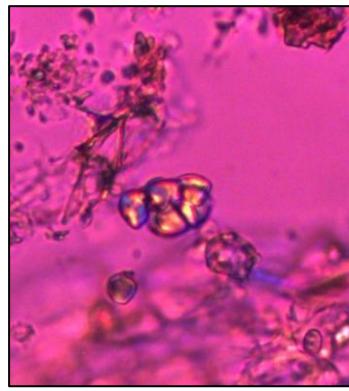


Abbildung 53. Stärkekörner von *Chaerophyllum aromaticum* (L.)
400-fache Vergrößerung

Die Stärkekörner von *Aegopodium podagraria* (L.) sind im Pulver nicht von Stärkekörnern der Meisterwurz zu unterscheiden. Sie sind ebenfalls rund, mit zentralem Bildungszentrum und liegen zumeist einzeln vor (Abbildung 54).



Abbildung 54. Stärkekörner von *Aegopodium podagraria* (L.)
600-fache Vergrößerung

5.5.3 Dünnschichtchromatographie

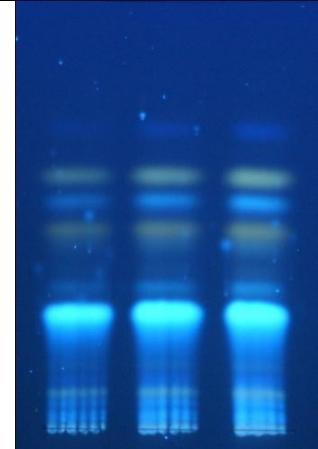
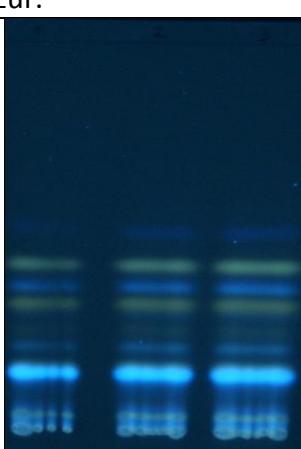
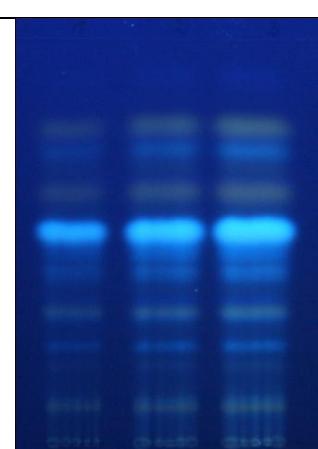
Identitätsprüfung D ist laut EDQM Stilvorgaben für pflanzliche Monographien die Dünnschichtchromatographie.

Die Hauptinhaltsstoffe von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH sind Cumarine, weshalb das Inhaltsstoffmuster an Cumarinen für die nasschemische Identitätsprüfung herangezogen wurde. Unter UV-Licht bei 366 nm weisen sie eine Eigenfluoreszenz auf, sodass der Einsatz von Sprühreagentien nicht erforderlich ist.

5.5.3.1 Vergleich verschiedener Fließmittelsysteme

Um die optimale Auftrennung des Cumarin-Inhaltsstoffmusters zu erlangen, wurden verschiedene Fließmittelsysteme für Cumarine getestet.

Dafür wurden 1 mg eines Dichlormethan (DCM)-Extrakts, der mittels Accelerated Solvent Extractor (ASE) (3 Extraktionszyklen mit DCM) aus den unterirdischen Teilen der Meisterwurz gewonnen wurde, in 1 ml DCM gelöst und davon 5µl (Bande 1), 10µl (Bande 2) und 15µl (Bande 3) auf *Platte 1* aufgetragen und mit den folgenden Fließmittelsystemen über eine Laufstrecke von 8 cm getestet.

Fließmittelsystem 1	Fließmittelsystem 2
Dichlormethan/Toluol (V/V) (25/25)	Toluol/Ethylacetat (V/V) (85/15)
Quelle: Ph.Eur. 6, Liebstöckelwurzel	Quelle: Diss. A. Herde, Univ. Hamburg, 2005
	
1 2 3	1 2 3
Fließmittelsystem 3	Fließmittelsystem 4
Toluol/Ethylacetat/Essigsäure R (V/V) (90/10/1)	Toluol/Diethylether (V/V) (25/25) ausgeschüttelt mit Essigsäure R 10%
Quelle: Monographievorschlag Angelikawurzel für Ph.Eur.	Quelle: Prüfvorschrift Schleiderer 241
	
1 2 3	1 2 3

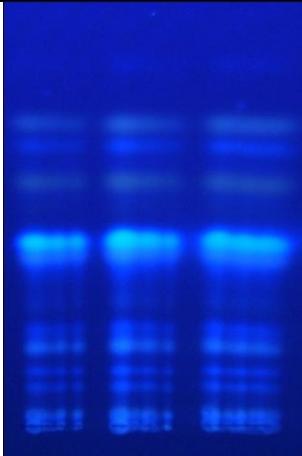
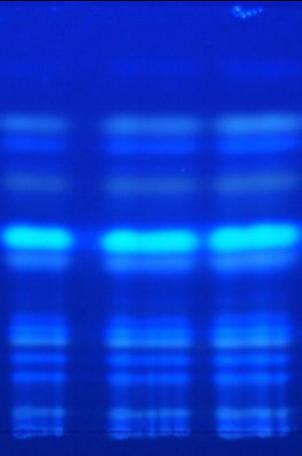
Weiterentwicklung 1	Weiterentwicklung 2
Toluol/Ethylacetat/Essigsäure R (V/V) (80/20/1)	Toluol/Ethylacetat/Essigsäure R (V/V) (75/25/3)
	

Tabelle 30. Vergleich von DC-Fließmittelsystemen für die Extrakte von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH

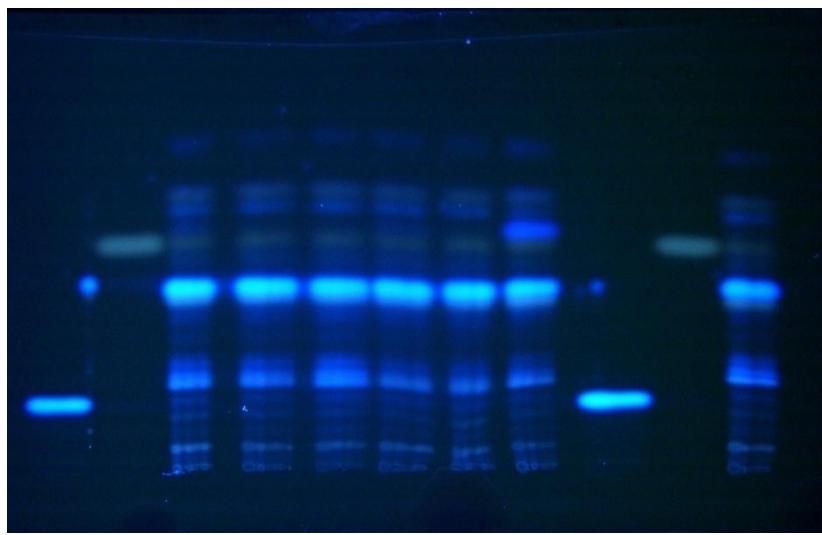
Fließmittelsystem 4 (S. 72) war das einzige System, welches ohne Veränderung der Fließmittelzusammensetzung über eine ausreichende Auftrennung der einzelnen Banden verfügte. Es ist das einzige System, bei welchem die mobile Phase ausgeschüttelt werden muss. Um auch ein DC-System mit einfacherer Handhabung vorstellen zu können, wurde das Fließmittelsystem 3, bei dem die Bandenschärfe hoch ausgeprägt ist, und bei dem bei der Herstellung auf das Ausschütteln im Scheidetrichter verzichtet werden kann, modifiziert. Durch Polaritätserhöhung der mobilen Phase konnte die Auftrennung der Banden verbessert werden. Somit wurde die „Weiterentwicklung 2“ des Fließmittelsystems 3 für die weiteren DC-Analysen herangezogen.

In Arzneibuchmonographien wird das dünnssichtchromatographische Bild mit Hilfe von 2 Referenzsubstanzen beschrieben und keine Retentionsfaktor (*Rf*)-Werte mehr angegeben. Eine Substanz der Referenzlösung soll hierfür im ersten Drittel der Laufstrecke detektiert werden können, die andere Substanz im letzten Drittel, damit ausreichende Möglichkeiten zur Beschreibung der Banden der Untersuchungslösung vorhanden sind.

Als Referenzsubstanzen wurden für die Monographie Meisterwurz Imperatorin (Imp) und Scopoletin (Sco) herangezogen.

Imperatorin wurde in einer Konzentration von 2 mg in 5 ml Methanol *R* verwendet und Scopoletin in einer Konzentration von 1 mg in 5 ml Methanol *R*.

Abbildung 55 (S. 73) zeigt die Proben KHWPO 1-7 und die Referenzsubstanzen unter Verwendung des ausgewählten Fließmittelsystems („Weiterentwicklung 2“) mit einer Laufstrecke von 10 cm.



Sco Imp 1 2 3 4 5 6 Sco Imp 7
Abbildung 55. Vergleich der DCM-Extrakte aus den Proben KHWPO1 bis KHWPO7
mit dem Fließmittelsystem Weiterentwicklung 2

Alle Proben enthalten ein homogenes Inhaltsstoffmuster an Cumarienen. Allein in Probe 6 tritt eine Bande (mit einem gering höheren Rf-Wert als Imperatorin) mit stärkerer Intensität auf als in den anderen Proben.

5.5.4 Extraktionsmethoden

Die bisherigen nasschemischen Analysen zum Inhaltsstoffspektrum der Cumarine in der Meisterwurz wurden mit ASE-Extrakten durchgeführt, da diese die maximale Extraktion des Drogenmaterials erlauben. Da diese Extraktionsmethode keine Methode der in Österreich gültigen Pharmakopöen ist, musste eine alternative Extraktionsmethode gefunden werden. Gleichzeitig wurden die Auswirkungen des Einsatzes verschiedener Lösungsmittel (Methanol (MeOH), Dichlormethan (DCM)) auf das extrahierte Inhaltsstoffmuster getestet. Bewertet wurden das Droge-Extrakt-Verhältnis und das dünnenschichtchromatographische Bild.

Extraktionsmethoden:

Extraktionsmethode	Durchführung
I	Accelerated Solvent Extractor Programmdaten: es wird jede Einwaage (EW) 3 x mit durchschnittlich 20 ml Extraktionsmittel extrahiert. Die tatsächliche Menge an verwendetem Extraktionsmittel bestimmt das Gerät (abhängig von der Zellfüllmenge).
II	Extraktion mittels Ultraschallbad bei Raumtemperatur: 3 x mit 20 ml Extraktionsmittel für 5 Minuten.
III	Extraktion im Wasserbad bei 40°C unter Rückflusskühlung: 3 x mit je 20 ml Extraktionsmittel für 5 Minuten.
IV	Extraktion am Wasserbad bei 40°C: 3 x mit je 20 ml Methanol für 5 Minuten.
V	Extraktion am siedenden Wasserbad, sodass die Probe 30s lang selbst siedet, jeweils 3 x mit 20 ml Methanol.
VI	Extraktion mittels Ultraschallbad bei 40°C: 2 x mit 20 ml Extraktionsmittel für 15 Minuten.
VII	Extraktion am Wasserbad bei 40°C unter Rückflusskühlung. 2 x mit 20 ml Extraktionslösung für 15 Minuten.

Tabelle 31. Aufzählung der angewandten Extraktionsmethoden

Extrakt-nummer	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
Extraktions-mittel	DCM	MeOH	DCM	MeOH	DCM	MeOH	MeOH	MeOH	DCM	DCM
Extraktions-methode	I	I	II	II	III	III	IV	V	VI	VII

Tabelle 32. Kombinationsschema für angewandte Extraktionsart und Lösungsmittel

Ergebnisse:

Extrakt	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
EW (g)	1,0792	1,0997	1,0173	1,0881	1,0046	1,0086	1,0139	1,0162	1,0603	1,1240
AW (g)	0,1083	0,3655	0,0533	0,2858	0,0689	0,2841	0,2560	0,3672	0,0694	0,0847
DEV	9,96	3,00	19,09	3,81	14,58	3,55	3,96	2,77	15,29	13,27

Tabelle 33. Ergebnisse der Extraktionen unter Berechnung des Drogen-Extrakt-Verhältnisses (DEV)

In der DC-Analyse zeigen alle hergestellten Extrakte, unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel, dasselbe Bandenmuster. Somit ist jede dieser Extraktionsmethoden für die DC-Identitätsprüfung geeignet.

Mehrfachextraktionen erhöhen das DEV nur geringfügig, sodass diese für die DC-Analyse

nicht nötig sind.

An Hand der Droege-Extrakt-Verhältnisse ist festzustellen, dass die Extraktion am siedenden Wasserbad mit Methanol als Extraktionsmittel quantitativ die höchste Ausbeute liefert. Das entwickelte Extraktionsverfahren und das entwickelte DC-Fließmittelsystem wurden auch noch an anderen cumarinhaltigen Arzneidrogen getestet, um die Selektivität des Cumarinmusters der Meisterwurz für die Identitätsprüfung zu gewährleisten.

Dabei wurde festgestellt, dass die cumarinartigen Inhaltsstoffe in der Meisterwurz in weit höherer Konzentration vorhanden sein müssen, als in anderen cumarinhältigen Drogen, da diese beim angewandten Extraktionsverfahren kein oder nur ein äußerst schwaches Bandenmuster gezeigt haben. Erst nach dem Einengen der jeweiligen Untersuchungslösung konnte festgestellt werden, dass keine der Vergleichsdrogen (siehe Kapitel 2.1, S. 2) dasselbe

Cumarinmuster aufweist.

5.5.5 Prüfung auf Reinheit

Die Reinheitsprüfung pflanzlicher Drogen umfasst stets mehrere Prüfungen, deren Durchführung abhängig ist vom als Arzneidroge verwendeten Pflanzenteil.

Bei jeder pflanzlichen Droge wird der prozentuale Anteil fremder Bestandteile, die nicht der Definition entsprechen, nach Aussortierung dieser, gravimetrisch bestimmt.

Ebenso wird bei jeder pflanzlichen Droge der Trocknungsverlust ermittelt.

Der Trocknungsverlust ist eine gravimetrische Methode zur Bestimmung des Wassergehalts. Hohe Trocknungsverluste sind Anzeichen für unzureichende Trocknungsverfahren der Arzneidrogen. Dies begünstigt enzymatische Reaktionen und Schädlingsbefall bei der Lagerung. Die Durchführung erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift des Ph.Eur. 6 (2.2.32) unter Verwendung des Trockenschanks. Nach exakter Einwaage der pulverisierten Droge (355) wird bei 100 – 105 °C für 2 Stunden getrocknet. Die Differenz der Auswaage nach dem Trocknen zur Einwaage vor dem Trocknen wird prozentuell, bezogen auf die Einwaage vor dem Trocknen, als Trocknungsverlust angegeben.

Bei Wurzeldrogen wird im Europäischen Arzneibuch üblicherweise auch der Aschewert und der säureunlösliche Aschewert bestimmt.

Die Asche wird bestimmt um anorganische Zellbestandteile (z.B. Calciumpektinat, Oxalate), Verunreinigungen (z.B. Erde) und Verfälschungen (z.B. CaCO₃) in pflanzlichen Materialien gravimetrisch zu quantifizieren. Dafür wird in einem auf Gewichtskonstanz gebrannten Tiegel eine Einwaage von 1,000 g Pflanzenmaterial im Muffelofen bei 600° C verascht.

Die Angabe des Aschewerts erfolgt in Prozent, bezogen auf die Einwaage in den Tiegel.

Da bei der Prüfung nicht zwischen in der Pflanze vorkommenden mineralischen Bestandteilen und Verunreinigungen unterschieden werden kann, wird bei Wurzeldrogen auch der Wert an säureunlöslicher Asche bestimmt. Säureunlösliche Asche besteht vorwiegend aus Silikat-Salzen, da diese nicht in Salzsäure R löslich sind. Für die Bestimmung wird die gewon-

nene „normale“ Asche im Tiegel mit verdünnter Salzsäure R versetzt und für 10 Minuten erhitzt. Anschließend erfolgt die Filtration durch einen aschefreien Filter, wobei man diesen dann solange mit Wasser R wäscht bis das Waschwasser einen neutralen pH-Wert aufweist. Nach dem Trocknen des Filters wird dieser im Muffelofen bei 600° C verascht. Der verbleibende Rückstand ist die säureunlösliche Asche und wird in Prozent, bezogen auf die Einwaage an Drogenmaterial, angegeben.

5.5.5.1 Ergebnisse - fremde Bestandteile

Für die Ermittlung des Anteils an fremden Bestandteilen in den Handelsdrogen, wurden unter der Lupe eine genaue Einwaage von zirka 50,0 g Arzneidroge auf fremde Bestandteile, z.B. Verunreinigungen wie Steine und Erdklumpen, oberirdische Teile der Meisterwurz und Teile anderer Stammpflanzen untersucht. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 34* aufgelistet.

Probe	Prozent fremde Bestandteile
KHWPO1	1,00
KHWPO2	1,50
KHWPO3	1,75
KHWPO4	0,43
KHWPO7	0,98
KHWPO8	0,55

**Tabelle 34. Ermittelte Ergebnisse der Prüfung
Fremde Bestandteile (laut Ph. Eur. 6) der Handelsdrogen**

Der Anteil an fremden Bestandteilen in den Handelsdrogen ist sehr gering. Begründet könnte dieser Umstand durch die beachtliche Größe der 2-3-jährigen unterirdischen Teile der Meisterwurz werden. Das geerntete Drogenmaterial ist somit im Vergleich zu anderen Arzneidrogen leicht zu reinigen und für erfahrene Sammler auch gut von unterirdischen Teilen anderer Stammpflanzen zu unterscheiden.

5.5.5.2 Ergebnisse - Trocknungsverlust

Probe	Messung 1	Messung 2	Mittelwert
KHWPO 1	5,88	5,67	5,76
KHWPO 2	5,63	5,54	5,59
KHWPO 3	7,96	8,11	8,04
KHWPO 4	7,53	7,48	7,51
KHWPO 7	6,66	6,51	6,59
KHWPO 8	6,93	6,89	6,91

Tabelle 35. Ermittelte Ergebnisse der Prüfung *Trocknungsverlust* (laut Ph. Eur. 6) der Handelsdrogen

Alle Handelsdrogen weisen einen Trocknungsverlust von unter 10,0 Prozent auf (*Tabelle 35*). 10,0 Prozent Trocknungsverlust wird laut Ph.Eur.6 in der Monographie Angelikawurzel toleriert, und 8 Prozent in der Monographie Liebstöckelwurzel. Auf Grund der ermittelten Ergebnisse wird für die ÖAB-Monographie „Meisterwurz“ ein maximaler Trocknungsverlust von 10,0 Prozent vorgeschlagen.

5.5.5.3 Ergebnisse - Asche

Asche	Messung 1	Messung 2	Mittelwert
KHWPO 1	3,71	3,67	3,69
KHWPO 2	3,89	3,85	3,87
KHWPO 3	4,66	4,63	4,65
KHWPO 4	3,70	3,66	3,68
KHWPO 7	4,84	4,82	4,83
KHWPO 8	3,40	3,44	3,42

Tabelle 36. Ermittelte Ergebnisse der Prüfung *Asche* (laut Ph. Eur. 6) der Handelsdrogen

Der Vorschlag für die ÖAB-Monographie „Meisterwurz“ ist, dass der Aschewert der Arzneidroge maximal 5,0 Prozent betragen darf. Im Ph.Eur. 6 werden Apiaceenwurzeln mit einem Aschewert von 8,0 – 10,0 Prozent noch als der Arzneibuchqualität entsprechend eingestuft. Die getesteten Meisterwurz-Handelsdrogen liegen alle weit unter diesen Werten (siehe *Tabelle 36*).

5.5.5.4 Ergebnisse - Säureunlösliche Asche

säure-unlös. Asche	Messung 1	Messung 2	Mittelwert
KHWPO 1	0,04	0,05	0,05
KHWPO 2	0,03	0,04	0,04
KHWPO 3	0,23	0,18	0,21
KHWPO 4	0,08	0,06	0,07
KHWPO 7	0,24	0,26	0,25
KHWPO 8	0,08	0,12	0,10

Tabelle 37. Ermittelte Ergebnisse der Prüfung säureunlösliche Asche (laut Ph. Eur. 6) der Handelsdrogen

Die niedrigen Messergebnisse bei der säureunlöslichen Asche weisen, wie schon bei der Prüfung auf fremde Bestandteile (Kapitel 5.5.5.1, S. 76), auf einen gut gereinigten Zustand der Handelsdrogen hin. In den Monographien Angelikawurzel und Liebstöckelwurzel im Ph.Eur. 6 wird ein Wert für die säureunlösliche Asche von 2,0 Prozent toleriert. Für die ÖAB-Monographie „Meisterwurz“ wird, auf Grund der ermittelten Ergebnisse (siehe *Tabelle 37*), ein Prozentwert von maximal 1,0 für die säureunlösliche Asche aus der Arzneidroge Meisterwurz vorgeschlagen.

5.5.6 Gehaltsbestimmung

Die letzte Prüfung in einer Arzneibuchmonographie ist die Quantifizierung eines einzelnen Inhaltsstoffes oder einer Inhaltsstoffgruppe der Arzneidroge, die bekanntermaßen für die Wirkung der Arzneidroge verantwortlich ist bzw. sind.

Ist die Quantifizierung eines wirksamen Inhaltsstoffes oder einer wirksamen Inhaltsstoffgruppe nicht möglich, wird üblicherweise eine andere, sogenannte, Leitsubstanz, die in der Droge enthalten ist, quantifiziert, die einen Aufschluss über den Inhaltsstoffgehalt geben soll.

Quantitativ bestimmen lassen sich die in der Arzneidroge Meisterwurz enthaltenen cumarinartigen Inhaltsstoffe mittels HPLC und das enthaltene ätherische Öl mittels Destillationsapparatur. Im Rahmen der Monographie - Ausarbeitung wurden beide Möglichkeiten in Be tracht gezogen.

5.5.6.1 High Performance Liquid Chromatography

Ziel der HPLC-Arbeit war die Findung einer optimalen Elutionsmethode für die Auftrennung der cumarinartigen Inhaltsstoffe der Meisterwurz und deren Quantifizierung.

Eine von Ganzen et al., 1997 publizierte Elutionsmethode für Cumarine wurde getestet. Zur Austestung diente ein DCM-ASE-Extrakt der Probe KHWPO1, der zur Trockene gebracht, und von dem 1 mg in 1 ml Acetonitril (MeCN) gelöst wurde.

Mobile Phase A: Wasser p.a. + 0,01 % konzentrierte Essigsäure

Mobile Phase B: MeCN p.a. + 0,01 % konzentrierte Essigsäure

Die Durchführung der Gradientenelution erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung der *Säule 2* mit 10 µl Injektionsvolumen am *Instrument 3*. Als Säulendurchflussrate war in der Publikation 1 ml/min festgelegt. Die Detektionswellenlänge lag bei 254 nm.

Zeit (min)	Mobile Phase A (% V/V)	Mobile Phase B(% V/V)
1 - 3	85 → 80	15 → 20
5 - 15	80 → 70	20 → 30
15 – 18	70 → 55	30 → 45
18 - 25	55 → 50	45 → 50
25 - 35	50 → 30	50 → 70
35 - 38	30 → 15	70 → 85
38 - 43	15 → 5	85 → 95

Tabelle 38. Lösungsmittelgradient der Methode von Ganzen et al. (1997)

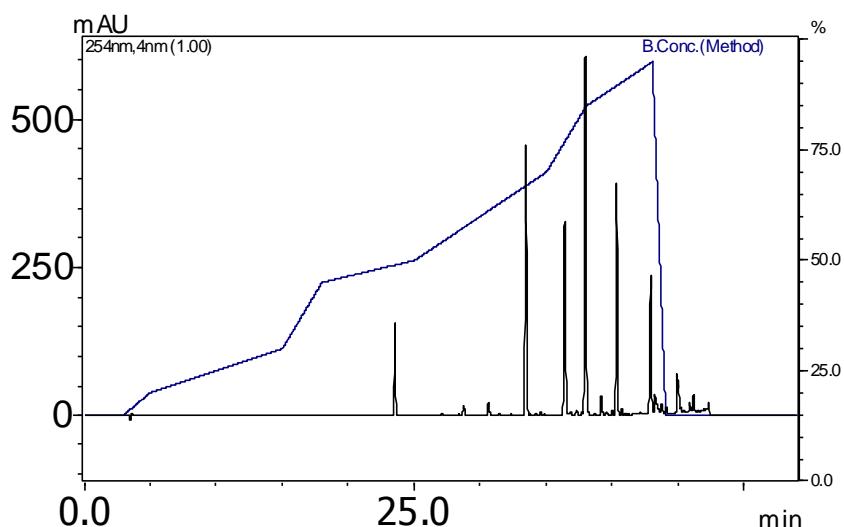


Abbildung 56. Chromatogramm der Probe KHWPO1 bei 254 nm

Wie in Abbildung 56 ersichtlich, werden die Cumarine mit dieser Methode zwar aufgetrennt, doch insgesamt erst sehr spät von der Säule eluiert.

Um die Cumarine schneller von der Säule zu lösen, wurde die Anfangszusammensetzung der mobilen Phase verändert. Der Anteil an Acetonitril der Anfangszusammensetzung der mobilen Phase wurde zuerst auf 30 Prozent erhöht (*Abbildung 57*), schließlich auf 45 Prozent (*Abbildung 58*).

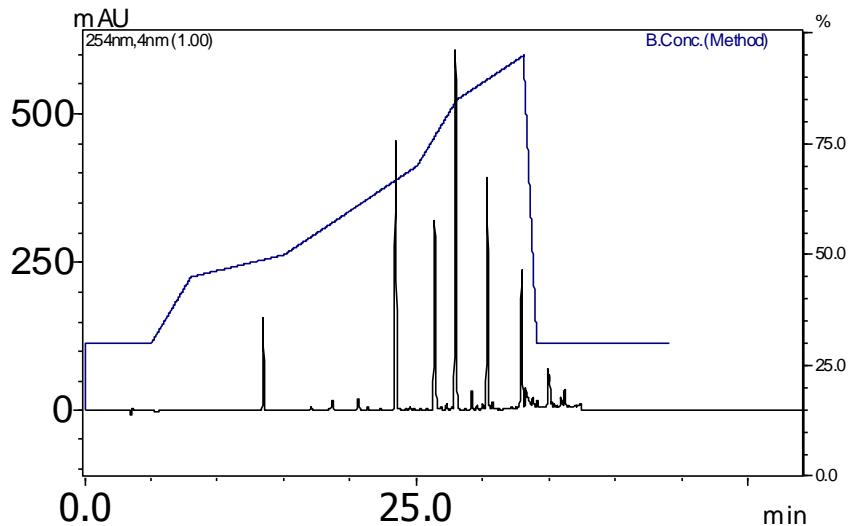


Abbildung 57. Chromatogramm der Probe KHWPO1 bei 254 nm mit einer Anfangskonzentration von 30 % Acetonitril

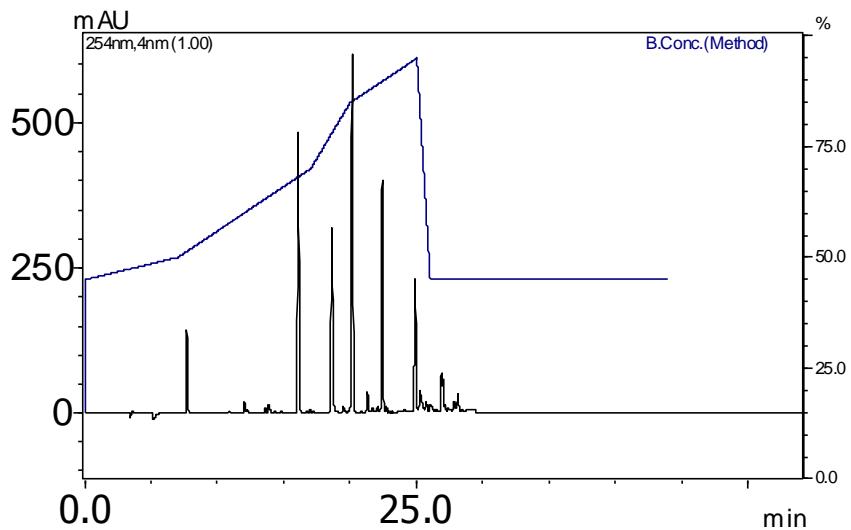


Abbildung 58. Chromatogramm der Probe KHWPO1 bei 254 nm mit einer Anfangskonzentration von 45 % Acetonitril

Zwar wurde eine raschere Elution von der Säule erreicht, doch die Auftrennung der einzelnen Peaks musste noch optimiert werden. Zu diesem Zweck wurde in dieser nun 26 Minuten lang dauernden Methode (*Abbildung 58*) die Geschwindigkeit des Gradientenlaufes verändert. Die Erhöhung des Anteils von 50 Prozent Acetonitril p.a. auf einen Anteil von 70 Prozent Acetonitril p.a. in der mobilen Phase wurde in Folge nicht mehr in 10 Minuten sondern

in 20 Minuten durchgeführt. Dadurch wurde eine gute Auftrennung der Peaks erreicht (*Abbildung 59, Tabelle 39*).

Zeit (min)	Mobile Phase A (% V/V)	Mobile Phase B(% V/V)
1 - 7	55 → 50	45 → 50
7 - 27	50 → 30	50 → 70
27 - 30	30 → 25	70 → 85
30 - 35	25 → 15	85 → 95

Tabelle 39. Lösungsmittelgradient der verkürzten Methode

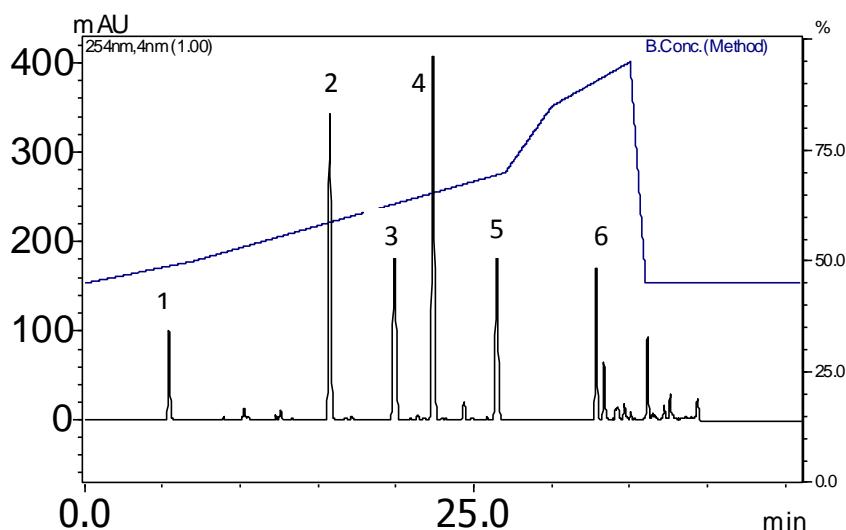


Abbildung 59. Chromatogramm der Probe KHWPO1 bei 254 nm unter Verwendung der verkürzten Methode

Peak 1	Oxypeucedanin – Hydrat
Peak 2	Oxypeucedanin
Peak 3	Peucenin+Ostruthol
Peak 4	Imperatorin
Peak 5	Isoimperatorin
Peak 6	Ostruthin

Die ursprünglich publizierte Methode konnte um 7 Minuten verkürzt werden.

Um die Abfolge der Elution der einzelnen Cumarine zu ermitteln, wurde die Probe KHWPO1 unter Verwendung der Säule 2 und der entwickelten Elutionsmethode mittels LC-MS (*Instrument 4*) vermessen.

Dabei wurde festgestellt, dass der 3. Peak des Chromatogramms (*Abbildung 59*) eine Co-Elution von Peucenin und Ostruthol darstellt.

Die Tatsache der Co-Elution und der doch relativ langen Laufzeit der Gradientenelution (35 Minuten) sprechen gegen eine Verwendung der Methode in einer Arzneibuchmonographie zur Quantifizierung der Inhaltsstoffe.

Da im Rahmen der Dissertation von Mag. Sylvia Vogl (in Vorbereitung, 2011) ebenfalls die Quantifizierung der Cumarine in *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH angestrebt wurde, entstand die Möglichkeit der Testung einer neu entwickelten HPLC – Methode. Es handelt sich um eine Gradientenelution mit einer Säulendurchflussrate von nur 0,5 ml/min.

Mobile Phase A: Wasser p.a. + 0,01 % konzentrierte Essigsäure

Mobile Phase B: MeCN p.a. + 0,01 % konzentrierte Essigsäure

Zeit (min)	Mobile Phase A (% V/V)	Mobile Phase B(% V/V)
1 - 6	75 → 63	25 → 37
6 - 14	63 → 55	37 → 45
14 - 24	55 → 35	45 → 65
24 - 25	35 → 5	65 → 95
25 - 30	5	95

Tabelle 40. Lösungsmittelgradient der HPLC-Methode nach Vogl (Dissertation in Vorbereitung, 2011)

Das Optimum der Säulenofentemperatur ist 38 °C, das der Autosamplertemperatur bei 15 °C.

Durchgeführt wurde die Testung am *Instrument 3* mit der *Säule 3* (siehe Kapitel 3.4, S. 8). Detektiert wurde mittels Diodenarraydetektor zwischen den Wellenlängen 190-400 nm. Die nachstehenden Chromatogramme werden bei 310 nm betrachtet.

Es wurden Dichlormethanextrakte der Proben KHWPO 1 bis KHWPO 7 mittels ASE hergestellt, zur Trockene gebracht und davon 1 mg in 1 ml Acetonitril gelöst und vermesssen.

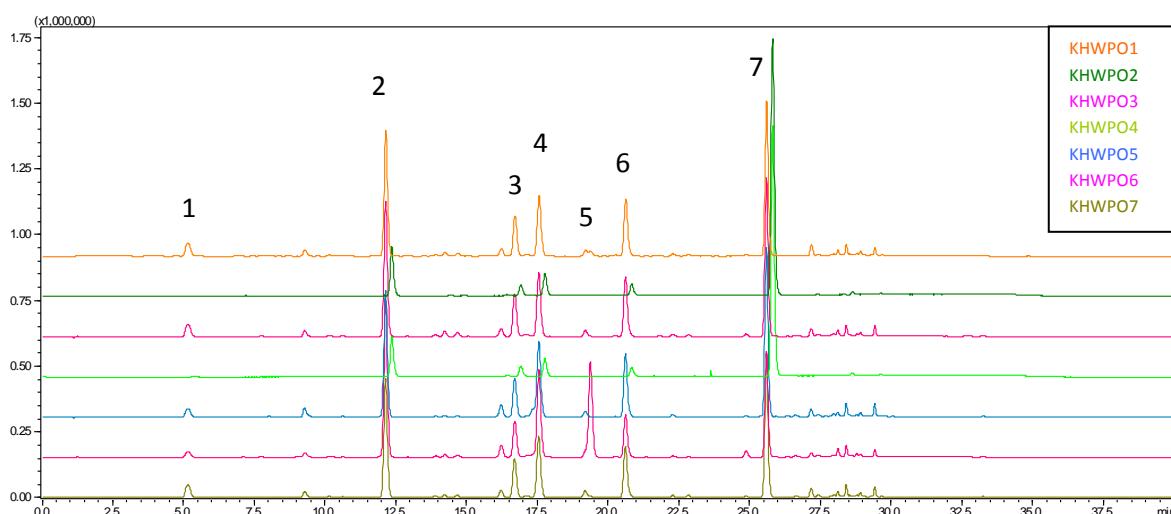


Abbildung 60. Chromatogramme der Proben KHWPO1 bis KHWPO7 bei 310 nm unter Verwendung der Elutionsmethode nach Vogl (Dissertation in Vorbereitung, 2011)

- Peak 1: Oxypeucedanin – Hydrat
- Peak 2: Oxypeucedanin
- Peak 3: Ostruthol
- Peak 4: Imperatorin
- Peak 5: Osthol
- Peak 6: Isoimperatorin
- Peak 7: Ostruthin

Alle Proben weisen dasselbe Inhaltsstoffmuster an Cumarienen auf. Verglichen mit den anderen Proben ist in Probe KHWPO 6 Osthol (Peak 5, *Abbildung 60*, S. 82) in größeren Mengen enthalten. Weiters wurden selbst angefertigte Meisterwurz-Schnäpse mit dieser Methode vermessen. Sie wurden nach Filtration und Zentrifugation direkt eingespritzt (*Instrument 3, Säule 3*) und ergaben folgende Chromatogramme (*Abbildung 61*), detektiert bei 310 nm.

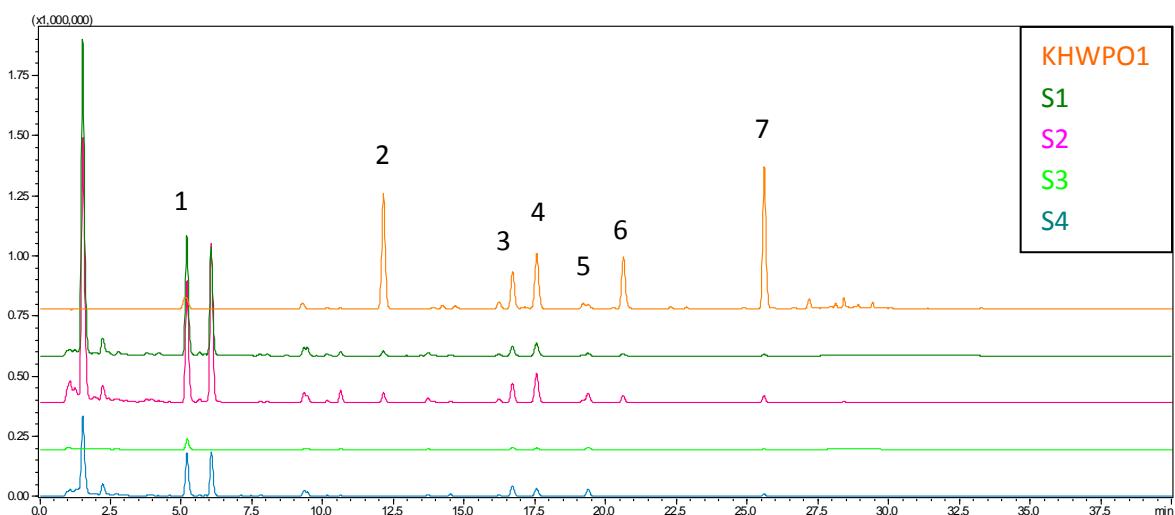


Abbildung 61. Chromatogramme der Proben KHWPO1 und S1 bis S4 bei 310 nm unter Verwendung der Elutionsmethode nach Vogl

Die mit Dichlormethan aus den unterirdischen Teilen extrahierbaren Cumariene (*Abbildung 61*, KHWPO 1) gehen auch in den ethanolischen Extrakt (*Abbildung 61*, S 1-4) über. Weiters können bei 310 nm auch polarere, noch nicht identifizierte Inhaltsstoffe der Meisterwurz detektiert werden, die im Schnaps enthalten sind.

Ebenfalls wurden wässrige Extrakte, Tees, mit dieser HPLC-Methode auf *Instrument 4* unter Verwendung der *Säule 3* getestet (*Abbildung 62*, S. 84).

Es wurden 3 g der Arzneidroge KHWPO1 mit 100 ml, mit zum Siedepunkt erhitzten Wasser für 10 Minuten (TEE 1) extrahiert. TEE 2 wurde gleichermaßen hergestellt, allerdings wurde nur 1 g Arzneidroge KHWPO1 und 20 ml Wasser verwendet.

Die Tees wurden als erstes direkt vermessen und anschließend mit einer äquivalenten Menge Dichlormethan ausgeschüttelt (TG 1, TG 2). Die Dichlormethanphase wurde zur Trockene

gebracht und in Acetonitril (1mg/ml) aufgenommen.

Wie zu erwarten, sind im wässrigen Extrakt vor allem polarere Inhaltsstoffe der Meisterwurz detektierbar, die das chromatographische Bild der ersten 5 Minuten dominieren

(Abbildung 62, TEE1 und TEE 2). Nach dem Ausschütteln mit Dichlormethan können diese entfernt werden, sodass wiederum ausschließlich die Cumarine der Meisterwurz im Chromatogramm (Abbildung 62, TG1 und TG2) zu sehen sind.

Bei primär wässriger Extraktion gehen hauptsächlich Oxypeucedanin-Hydrat (Peak 1, Abbildung 62) und Oxypeucedanin (Peak 2, Abbildung 62), die hydrophilsten Cumarine in der Meisterwurz, in den Extrakt über.

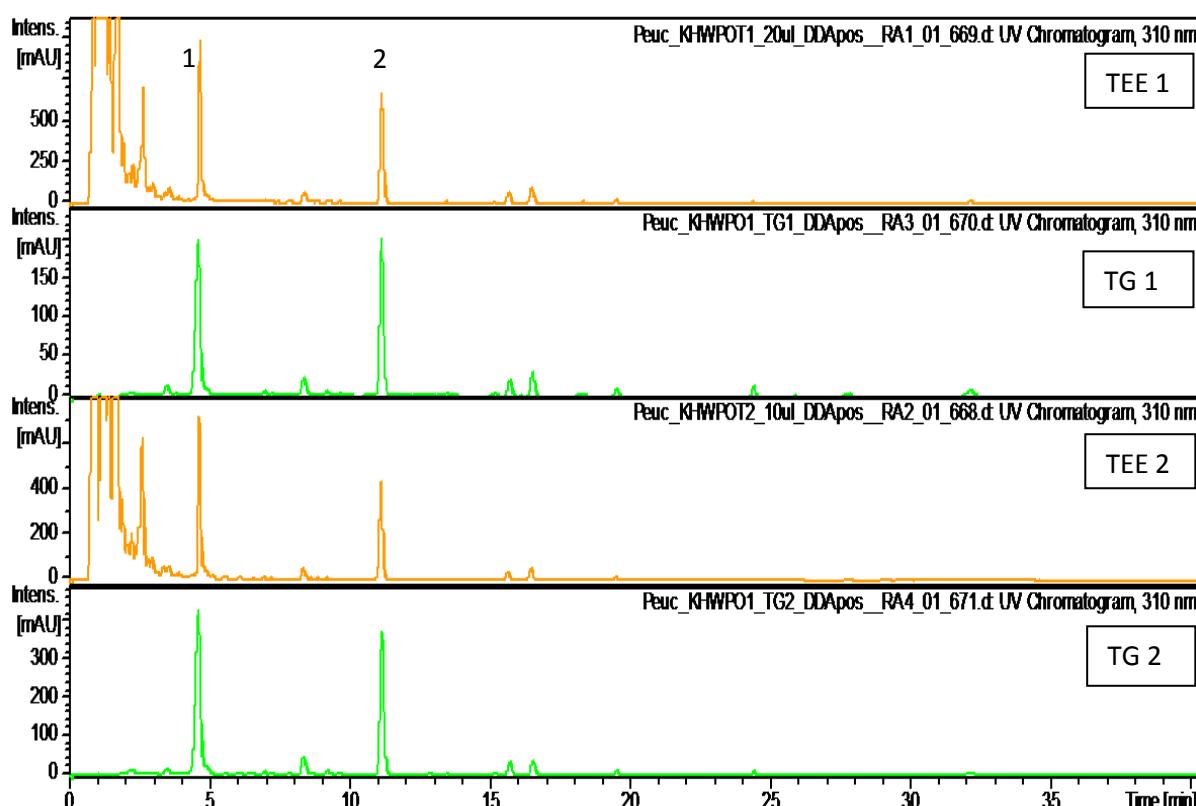


Abbildung 62. Chromatogramme der wässrigen Extrakte (TEE1 und TEE2) der Probe KHWPO1 und deren DCM-Ausschüttelungen (TG1 und TG2) bei 310 nm

Die Quantifizierung der Cumarine in den unterirdischen Teilen der Meisterwurz ist unter Einsatz von Imperatorin als externen Standard geplant.

Allerdings wurde während meiner Arbeit an der Monographie Meisterwurz von der Expertengruppe der Arzneibuchkommission beschlossen, die Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls in die Monographie „Meisterwurz“ aufzunehmen, sodass auf Grund des begrenzten Zeitrahmens, die Quantifizierung der Cumarine ausschließlich im Rahmen der Dissertation von Sylvia Vogl (in Vorbereitung, 2011) durchgeführt wird.

5.5.6.2 Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls in Schnittdrogen

Ein besonderer Vorteil der Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls in Drogen ist, dass der Gehalt Aufschluss über die Frische und die Lagerung der Arzneidroge gibt, was bei den sehr lagerungsstabilen Cumarinen der Droge nicht der Fall ist.

Die Meisterwurz enthält für eine Wurzeldroge sehr viel ätherisches Öl.

Literaturangaben über den Gehalt an ätherischem Öl erstrecken sich von 0,2 (Tschirch, 1917) bis 1,25 (Cisowski, 2001) Prozent in der Arzneidroge.

5.5.6.2.1 Destillationsmethoden

Um die optimale Extraktion des ätherischen Öls zu finden, wurden 3 Variationen der allgemeinen Destillationsvorschrift des Ph. Eur. 6 durchgeführt.

Dabei wird anstelle eines 1-l-Kolbens, ein 2-l-Kolben verwendet, um trotz des Aufschäumens der Droge im Kolben beim Erhitzen, die Destillationsgeschwindigkeit von 3 ml pro Minute zu erreichen.

Methode I	Methode II	Methode III
50,0 g Droge mit 500 ml gesättigter NaCl- Lösung für 3h destilliert unter Vorlage von 0,30 ml Xylol	40,0 g Droge mit 500 ml Wasser für 4h destilliert unter Vorlage von 0,50 ml Xylol	40,0 g Droge mit 500 ml gesättigter NaCl-Lösung für 4 h destilliert unter Vorlage von 0,50 ml Xylol
0,44 %	0,48 %	0,45 %

Tabelle 41. Destillationsmethoden des ätherischen Öls und die damit erreichten Ausbeuten an ätherischem Öl

Die verschiedenen Methoden (*Tabelle 41*) wurden an derselben Probe (KHWPO1) verglichen. Die höchste Extraktionsrate wird mit Methode II erreicht, welche Bestandteil der Monographie „Angelikawurzel“ und „Liebstöckelwurzel“ des Ph.Eur.6 ist.

In Folge wurden alle Gehaltsbestimmungen der übrigen Proben mit Methode II ausgeführt.

5.5.6.2.2 Messergebnisse

Probe	Messung 1	Messung 2	Mittelwert
KHWPO 1	0,48	0,46	0,47
KHWPO 2	0,36	0,36	0,36
KHWPO 3	0,66	0,67	0,67
KHWPO 4	0,46	0,47	0,47
KHWPO 7	0,47	0,48	0,48
KHWPO 8	0,70	0,70	0,70
KHWPO5 (Wild-sammlung, selbst geschnitten)	0,70	0,65	0,67

Tabelle 42. Messergebnisse der Gehaltsbestimmung des äthersichen Öls
Angaben in Prozent, bezogen auf die Einwaage an Droge

Alle Proben, ausgenommen KHWPO 2, enthalten mehr als 0,40% ätherisches Öl (*Tabelle 42*). Deshalb wird im Monographie-Vorschlag „Meisterwurz“ ein Mindestgehalt von 0,40 % ätherischem Öl gefordert. Als Lagerungshinweis gilt die Aufbewahrung in dicht schließenden Gefäßen und vor Sonnenlicht geschützt. Deutlich erkennbar ist die starke Verflüchtigung des ätherischen Öls beim Vergleich der Probe KHWPO 1 und KHWPO 8, die beide vom selben Lieferanten stammen, deren Erntezeitpunkt aber ein Jahr auseinanderliegt.

Zu den Inhaltsstoffen des ätherischen Öls von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH gibt es bis dato nur eine Studie mit in Polen geernteten Pflanzen (Cisowski, 2001).

Etwaige Unterschiede in der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe des ätherischen Öls von in Österreich oder in Südtirol geernteten Pflanzen sind nicht bekannt.

5.5.7 Diskussion

Die Apiaceae *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH ist in Österreich eine traditionell verwendete Arzneipflanze. Deshalb wird die Wirksamkeit der traditionellen Anwendung heute vermehrt durch pharmakologische Untersuchungen zu beweisen versucht.

Die makroskopischen Merkmale der Pflanze sind für erfahrene Sammler sehr charakteristisch, genauso wie der typische Geruch der Meisterwurz.

Das mikroskopische Bild des Querschnittes durch Rhizom und Wurzel sind für die Identifikation der Schnittdroge heranzuziehen, da, im Gegensatz zu anderen Apiaceaenwurzeln, sehr charakteristische Sekretbehälter, mit außergewöhnlicher Größe, vorhanden sind.

Die Mikroskopie der gepulverten Arzneidroge stellt nur eine Hilfestellung bei der Identifikation dar, da andere Wurzeldrogen der Familie der Apiaceaen im gepulverten Zustand ähnliche Merkmale aufweisen.

Zur chemischen Überprüfung der Identität eignet sich die rasch durchführbare Dünnsschichtchromatographie. Die in der Meisterwurz enthaltenen Cumarine und Furanocumarine weisen bei 366 nm eine Eigenfluoreszenz auf. Durch den hohen Gehalt an Cumarinen und Furanocumarinen, im Vergleich zu anderen Apiaceaen, zeigt ausschließlich die Meisterwurz ein charakteristisches Bandenmuster unter Verwendung des entwickelten Extraktionsverfahrens. Das in dieser Diplomarbeit entwickelte Fließmittelsystem für die Dünnsschichtchromatographie ist zwar für die Identitätsprüfung von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH geeignet, wird aber nicht in die Monographie „Meisterwurz“ aufgenommen, da auf Grund der Angleichung der Monographie „Meisterwurz“ an die Monographie „Bibernellwurzel“ das Fließmittelsystem dieser, ebenfalls neu ins ÖAB aufgenommen Monographie, verwendet wird (DC-Bilder der Monographie beiliegend).

Die durchgeführten Reinheitsprüfungen zeigen, dass die in Österreich verfügbaren Handelsdrogen ausgezeichnete Qualität aufweisen. Sie wurden an Hand der Vorschriften des Europäischen Arzneibuches Ausgabe 6 durchgeführt.

Für die Gehaltsbestimmung eignen sich zwei Inhaltsstoffgruppen: Cumarine und das ätherische Öl.

Die HPLC-Quantifizierung der Cumarine aus DCM-Extrakten der Meisterwurz erscheint sicherlich als die genaueste Methode der Quantifizierung. Es existiert dafür ein, geeignetes HPLC-Elutionsverfahren von Vogl (2011). Das Inhaltsstoffmuster und die Quantität der einzelnen Cumarine können möglicherweise Rückschlüsse auf die Wachstumsbedingungen bzw. die Herkunft der Arzneidroge zulassen (vergleiche: Osthof in KHWPO 6, S. 81).

Dennoch ist der Bestimmung des Gehalts an ätherischem Öl in Arzneibuchmonographien der Vorzug zu geben. Der Gehalt an ätherischem Öl ermöglicht neben der Einschätzung der Qualität beeinflusst durch die Herkunft, auch die Beurteilung der Erntebedingungen und der Lagerungszeit der Droge. Ein weiterer Vorteil ist, dass diese Gehaltsbestimmung mit geringem apparativen Aufwand auch direkt in Apotheken durchgeführt werden kann.

5.5.8 Monographieentwurf „Meisterwurz“

ÖAB xxxx/xxx

Meisterwurz

Imperatoriae Radix

Radix Imperatoriae

Definition

Das ganze oder geschnittene, getrocknete Rhizom und die Wurzel von *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH.

Gehalt: mindestens 0,40 Prozent ätherisches Öl, berechnet auf die getrocknete Droge

Eigenschaften

Die Droge hat einen cumarinartigen, sehr typischen Geruch.

Prüfung auf Identität

- A. Das gesamte Rhizom weist ringförmige Verdickungen auf. Bei den längsfurchigen Wanderrhizomregionen sind diese Internodien gestreckt, bei den Speicherrhizomregionen gestaucht. Den Internodien entspringen dünne, längsfurchige Wurzeln. An der Spitze des Speicherrhizoms sitzen höckrige Reste der Blattscheidenbasis. Die Schnittdroge enthält Bruchstücke der bis zu fingerdicken Speicherrhizome, zerschnittene Wanderrhizom und Wurzeln, sowie gelbliche, faserige Teile aus Teilen des oberirdischen Holzkörpers. Der Querschnitt des Rhizoms zeigt einen dünnen, schwarzbraunen Kork und einen hellen Grundkörper mit großen, teilweise mit freiem Auge sichtbaren, Sekretgängen in Mark und Rinde, die mit gelbem Sekret gefüllt sein können.
- B. In der primären Rinde des Rhizoms und im Mark finden sich Sekretgänge mit einem Durchmesser von bis zu 500 µm, im sekundären Phloem solche mit deutlich kleinerem Durchmesser. Die Wurzel weist ebenfalls Sekretgänge in der primären Rinde und im sekundären Phloem auf. Im Anschluss an die Siebzellen befinden sich ein Keratenchym, das an den hellen, unregelmäßig verdickten Zellwänden erkennbar ist. Der Holzteil besteht aus radial angeordneten Gruppen von Gefäßen, wobei weitlumige Tracheen und englumige, in Gruppen beisammen stehenden Libriformfasern, einander abwechseln. Diese Elemente werden durch breite Markstrahlen getrennt.
- C. Die Droge wird pulverisiert (355). Das Pulver ist gelbbraun. Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydratlösung R verwendet wird. Das Pulver zeigt folgende Merkmale: Korkfragmente; Fragmente parenchymatischen Gewebes aus Mark, Markstrahlen und Rinde; Xylemfragmente mit netzartig verdickten Gefäßen, die einen Durchmesser von 10 – 50 µm aufweisen; getüpfelte Libriformfasern. Erfolgt die Prüfung unter dem Mikroskop unter Verwendung einer 50 - prozentigen Lösung (V/V) von Glycerol R, zeigt das Pulver einfache, teilweise gehäuft auftretende 2 – 15 µm große Stärkekörper. Diese sind zahlreich in parenchymatischen Zellen zu finden oder frei vorliegend und zeigen im polarisierten Licht ein nur schwach sichtbares Auslöschungskreuz, dessen Form in der nachstehenden Abbildung dargestellt ist.

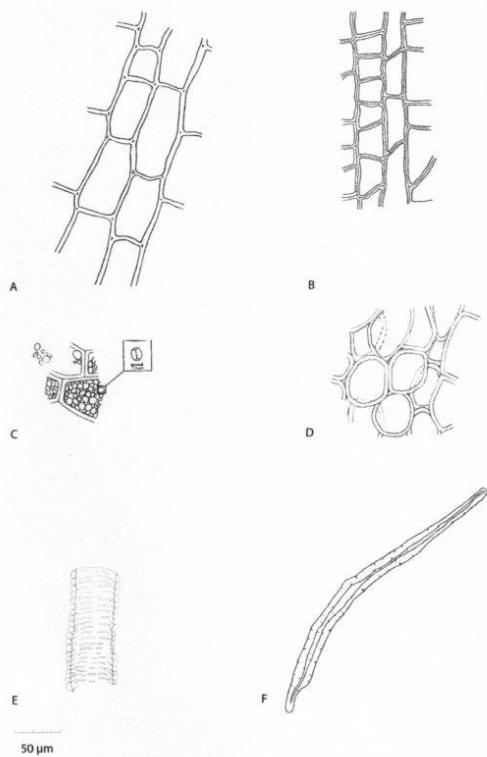


Abbildung 1:

- A: Bruchstücke von Parenchymzellen längs
- B: dunkelbraune Korkzellen
- C: mit Stärke gefüllte Parenchymzellen
- D: Zellen des Markparenchyms quer
- E: Tracheen
- F: getüpelte Libriformfaser

D. Dünnenschichtchromatographie (2.2.27)

Untersuchungslösung: 0,5 g pulverisierter Droge (355) (2.9.12) wird mit 20 ml Methanol *R* versetzt und für 15 Minuten unter Rückflusskühlung bei 40 °C im Wasserbad extrahiert. Nach dem Abkühlen wird filtriert.

Referenzlösung: 1 mg Scopoletin *R* und 2 mg Imperatorin *CRS* werden in 5 ml Methanol gelöst.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (5 bis 40 µm) [oder DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (2 bis 10 µm)]

Fließmittel: Die Oberphase einer Mischung von 20 ml Ether R, 20 ml Toluol R und 20 ml Essigsäure R wird als Fließmittel verwendet.

Auftragen: 5 µl; bandförmig (10 mm) [oder 2 µl; bandförmig (5 mm)]

Laufstrecke: 12 cm [oder 8 cm]

Trocknen: 20 min lang an der Luft

Detektion: im ultravioletten Licht bei 365 nm

Ergebnis: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen der Referenzlösung und der Untersuchungslösung ist der nachstehenden Abbildung ersichtlich. Weitere, nicht in der Abbildung vermerkte Banden können vorkommen.

Oberer Plattenrand	
Referenzlösung	Untersuchungslösung
Imperatorin: eine grünbräunlich fluoreszierende Zone	eine grünbräunlich fluoreszierende Zone eine blau fluoreszierende Zone eine grünbräunlich fluoreszierende Zone eine stark blau fluoreszierende Zone eine grün fluoreszierende Zone
Scopoletin: eine stark blau fluoreszierende Zone	

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (2.8.2): höchstens 2,0 Prozent an Bestandteilen, die nicht der Definition entsprechen.

Trocknungsverlust (2.2.32): höchstens 10,0 Prozent, mit 1,000 g pulverisierter Droge (355), durch 2 h langes Trocknen im Trockenschrank bei 100 bis 105 °C bestimmt.

Asche (2.4.16): höchstens 5,0 Prozent

Säureunlösliche Asche (2.8.1): höchstens 1,0 Prozent

Gehaltsbestimmung

Die Bestimmung erfolgt nach „Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls in Drogen“ (2.8.12) unter Verwendung von 40,0 g frisch pulverisierter Droge (500) (2.9.12), einem 2-l-Rundkolben, 10 Tropfen flüssigem Paraffin R, 500 ml Wasser R als Destillationsflüssigkeit und 0,50 ml Xylol R als Vorlage. Die Destillation erfolgt 4 h lang mit einer Destillationsgeschwindigkeit von 2 bis 3 ml je Minute.

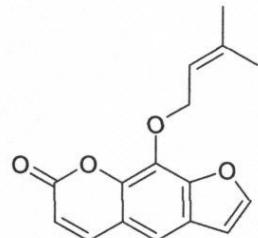
Lagerung

Vor Licht geschützt, in dicht schließenden Gefäßen.

ANHANG

Reagentien

Imperatorin CRS



C₁₆H₁₄O₄, MW: 270,28
CAS-No. 482-44-0

ChromaDex International, Germany

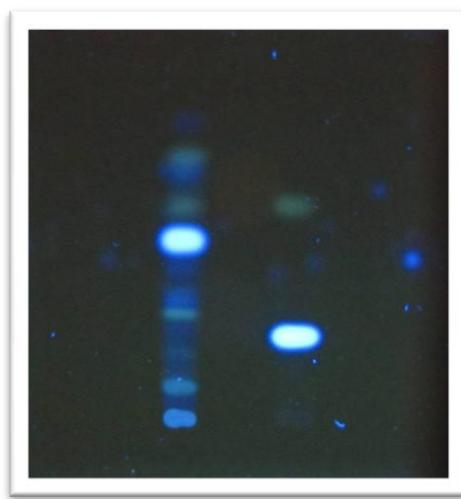
Dünnschichtchromatographisches Bild des Meisterwurz-Extrakts unter Verwendung des Fließmittelsystems aus dem Monographievorschlag „Bibernellwurzel“ für das ÖAB 2012, welches auch für die Monographie „Meisterwurz übernommen wurde.

TLC:



1 2

HPTLC:



1 2

Band 1: Meisterwurz-Extrakt

Band 2: Referenzlösung (vgl. Kapitel 5.5.3, S. 70)

6 Zusammenfassung

Als Ziel dieser Diplomarbeit wurde die Entwicklung einer Gehaltsbestimmung für die überarbeitete Monographie „Safran“ und die Erstellung einer neuen Arzneibuchmonographie für die traditionell angewandte Arzneidroge „Meisterwurz“ definiert.

Die ausgearbeiteten Monographien sollen ins Österreichische Arzneibuch 2012 aufgenommen werden.

Die „Safran“-Monographie, die schon durch vorangegangene Diplomarbeiten am Department für Pharmakognosie der Universität Wien bearbeitet wurde, konnte durch diese Diplomarbeit um eine Gehaltsbestimmung der im Safran enthaltenen all-trans-Crocine mittels HPLC ergänzt werden. Die getesteten Safranproben weisen Gesamtcrocingehalte von 4,59 bis 12,71 Prozent auf. Der Gesamtcrocingehalt verfälschter oder gefälschter Drogen ist deutlich niedriger als in identem Safran (3,8 bzw. 0,06-0,07 Prozent).

Das Hauptaugenmerk der praktischen Arbeit wurde auf die Ermittlung der experimentellen Daten für die Erstellung einer Arzneibuchmonographie der Meisterwurz gelegt.

Peucedanum ostruthium (L.) KOCH wird in Österreich in langer Tradition volksmedizinisch angewandt. Die unterirdischen Teile der Pflanze waren Ende des 19. Jahrhunderts bis Anfang des 20. Jahrhunderts in anderen deutschsprachigen Arzneibüchern auch schon offizinell, allerdings geriet die Anwendung in der Allopathie wieder in Vergessenheit.

Die aktuelle Wiederaufnahme der Forschung an *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH und die beliebte Anwendung der Zubereitungen aus der Meisterwurz, vor allem im westlichen Österreich, rechtfertigen die Aufnahme der Meisterwurz in das Österreichische Arzneibuch. Die Erstellung der Monographie „Meisterwurz“ erfolgte nach den Richtlinien der EDQM. Das dafür zur Verfügung gestellte Drogenmaterial stammt von Arzneidrogen-Lieferanten aus Österreich und Deutschland, sowie aus Wildsammlungen der Universität Wien.

Die Prüfung auf Identität erfolgte makroskopisch, mikroskopisch und nasschemisch mittels Dünnschichtchromatographie unter Beachtung der zur Verfügung stehenden Angaben der Literatur. Alle zur Verfügung stehenden Drogen entsprachen bei der Prüfung auf Identität. Als Reinheitsprüfungen wurden die Ermittlung des Anteils fremder Bestandteile (0,43 bis 1,75 Prozent), Trocknungsverlust (5,59 bis 8,04 Prozent), Asche (3,42 bis 4,83 Prozent) und säureunlösliche Asche (0,04 bis 0,25 Prozent) laut der Ph. Eur. 6 durchgeführt. Für die geforderte Prüfung „Gehaltsbestimmung“ wurde die Destillation des ätherischen Öls aus den unterirdischen Teilen der Pflanze ausgewählt. Der Gehalt an ätherischem Öl des getesteten Drogenmaterials lag zwischen 0,36 und 0,70 Prozent.

Die in dieser Diplomarbeit ermittelten Daten wurden für die Gestaltung der Identitätsprüfung, der Festlegung der Maximalwerte bei den Reinheitsprüfungen und der Festlegung des Mindestgehalts an ätherischem Öl für die ÖAB-Monographie verwendet.

7 Summary

This diploma thesis was started with two objectives. First, the development of an assay for the monograph „Safran“ in the Austrian Pharmacopoe, and second the creation of a monograph for *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH, a traditionally used plant in Austria.

The monograph „Safran“ has been substantially revised in previous thesis of the Department of Pharmacognosy, University Vienna, only the development of the assay was still missing. In this thesis the quantification of all-*trans*-crocins in saffron was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The tested samples had total all- *trans*-crocin concentrations of 4,59 to 12,71 per cent. Samples, which have been identified either as debasement of drugs or as non-ident-drugs, had much lower total crocin concentrations of 3,84 per cent, respectively 0,06 to 0,07 per cent. The data was used for the creation of the assay in the monograph „Safran“, which is going to be published in the Austrian Pharmacopoe 2012.

The second part of this thesis was the investigation of *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH according to the „Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparations“ by the EDQM, with the intention to submit all data for a monograph „Meisterwurz“ in the Austrian Pharmacopoe. Due to the frequent use in traditional Austrian medicine and the growing scientific interest during the last years, the demand of a monograph for *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH exists in Austria.

The drug samples for investigation were taken from different suppliers in Austria and Germany. Two samples were wild-harvested by Prof. Saukel, Department of Pharmacognosy, University Vienna.

Identification was proven by macroscopic botanical characters and microscopic botanical characters, as well as by thin layer chromatography (TLC), considering the available literature. All 8 available samples were identified as *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH.

Furthermore typical tests, according to Ph. Eur. 6, were performed: Total Ash (3,42-4,83 per cent), Ash Insoluble in Hydrochloric Acid (0,04-0,25 per cent), Loss on Drying (5,59-8,04 per cent) and Foreign Matter (0,43-1,75 per cent).

For the assay either the quantification of coumarins by HPLC or the quantification of the essential oil has been considered.

Two different HPLC-elution methods for coumarins were tested, one of them could be used for a quantification of the coumarins in *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH.

The advantage of the quantification of the essential oil is the possibility to draw conclusions about the true point of harvest and the quality of storage. The tested samples have a content of 0,36-0,70 per cent essential oil.

All collected data was used to draft a monograph „Meisterwurz“ for the Austrian Pharmacopoe 2012.

8 Literaturverzeichnis

- Akondzadeh S., Thamacebi-Pour, Noorbala A.A., Fallah-Pour H., Jamshidi A.H., Khani M. (2005), Hydroalcoholic extract of *Crocus sativus* (L.) in the treatment of mild to moderate depression: a double blind, randomized and placebo-controlled trial; *Phyther. Res.* 2005; **19**: 148-151
- Berger F. (1949), *Handbuch der Drogenkunde* Band 1, 1. Auflage, Wilhelm-Maudrich Verlag, Wien, S. 287 ff
- Blaschek W., Hänsel R., Keller K., Reichling J., Rimpler H., Schneider G. (Hrsg.) (1998), *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis* Folgeband 2 Drogen A-K, 5. Auflage, Springer Verlag Heidelberg, S. 442 ff
- Brenner S. (2011), Diplomarbeit, Univ. Wien, in Vorbereitung
- Bruck M. (1986), *Pharmakognostische Untersuchung der mitteleuropäischen Arten der Gattung Peucedanum* (L.) (APIACEAE), Diplomarbeit, Univ. Wien.
- Bundesministerium für Gesundheit (2010), *Österreichisches Arzneibuch 2010*, Verlag Österreich GmbH, S. 315
- Chinese Pharmacopoeia Commission (2005), *Pharmacopoeia of The People's Republic of China* Band 1, People's Medical Publishing House, S.310 f
- Cisowski W., Sawicka U., Mardarowicz M., Asztemborska M., Luczkiewicz M. (2001), Essential oil from herb and rhizome of *Peucedanum ostruthium* (L.) KOCH ex. DC, *Z. Naturforsch. C*: **56** (11-12): 930-932
- European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (2007), *Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal preparations*, Council of Europe, Strasbourg, France
- Flamm S., Kroeber L., Seel H. (1940), *Pharmakodynamik Deutscher Arzneipflanzen*, Hippocrates-Verlag Marquardt & Co., Stuttgart, S. 179 ff
- Fuchs L. (Nachdruck 2001), *The new herbal of 1543*, Tascheen GmbH, Cap. CCXCIII
- Ganzena M., Sturm S., Stuppner H. (1997) HPLC-MS and MECC Analysis of Coumarins, *Chromatographia* **46**: 197-203
- Gerlach G. (2008), *Wissenschaftliche Reflexionen über traditionelle Arzneimittel in Österreich*, Dissertation, Univ. Wien
- Gijbels M., Fischer F., Scheffer J., Svendsen A. (1984), Phthalides in Roots of *Capnophyllum peregrinum* and *Peucedanum ostruthium*, *Planta Med.* **50**(1): 110

Hadacek F., Müller C., Werner A., Greger H., Proksch P. (1994), Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivates from *Peucedanum* (Apiaceae: Apoideae), Journal of Chemical Ecology **20**(8): S. 2036-2054

Hänsel R., Sticher O. (2010), Pharmakognosie-Phytopharmazie, 9. Auflage, Springer Medizin-Verlag Heidelberg, S. 829 ff

Hegi G. (1906), Illustrierte Flora von Mitteleuropa Band V/2, A. Pichler's Witwe & Sohn, Wien, S. 1396 ff

Heß M. (2010), Erstellung von Arzneibuch-Monographien, Diplomarbeit, Univ. Wien

Hiermann A., Schantl D. (1998), Antiphlogistic and antipyretic activity of *Peucedanum ostruthium*, Planta Med. **64**(5): 400-403

Hosseinzadeh H., Noraei N.B. (2009), Anxiolytic and hypnotic effect of *Crocus sativus* aequous extract and it's constituents, crocin and safranal, in mice, Phytother. Res. **23**(6): 768-774

Hosseinzadeh H., Sadeghnia H.R. (2007), Effect of safranal, a constituent of *Crocus sativus* (saffron), on methyl methansulfonate (MMS)-induced DNA damage in mouse organs: an alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay, DNA Cell Biol. **26**(12): 841-846

Imenshahidi M., Hosseinzadeh H., Javadpour Y. (2010), Hypotensive effect of aequous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and it's constituents, safranal and crocin, in normotensive and hypertensive rats, Phytother. Res. **24**(7): 990-994

Kölbl K. (1993), Kölbl's Kräuterfibel, 23. Auflage, Reprint-Verlag Konrad Kölbl KG, München, S. 218 f

Lech K., Witowska-Jarosz J., Jarosz M. (2009) Saffran yellow: characterization of carotenoids by high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometric detection, J. Mass. Spectrom. **44**: 1661-1667

Lechtenberg M., Schepmann D., Niehues M., Hellenbrand N., Wünsch B., Hensel A. (2008) Qualtiy and Functionality of Saffron: Quality Control, Species Assortment and Affinity of Extract and Isolated Saffron Compounds to NMDA and Sigma-1 Receptors, Planta Med. **74**: 764-772

Madaus G. (1976) Lehrbuch der biologischen Heilmittel Band II, Abteilung I Heilpflanzen, Nachdruck 1976, Georg Olms Verlag Hildesheim, New York, S. 1122 ff (*Crocus sativus*) bzw. S. 1614 ff (*Imperatoria ostruthium*)

Papandreou M., Kanakis C., Polissiou M., Efthimiopoulos S., Cordopatis P. (2006), Inhibitory activity on amyloid-beta aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents, J. Agric. Food Chem. **54**(23): 8762-8768

Pitsikas N., Boultadakis A., Georgiadou G., Tarantilis P.A., Sakellaridis N. (2008) Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety, *Phytomedicine* **15**(12): 1135-1139

Schinkovitz A., Gibbons S., Stavri M., Cocksedge M.J., Bucar F. (2003) Ostruthin: An Antimycobacterial Coumarin from the Roots of *Peucedanum ostruthium*, *Planta Med.* **69**: 369-371

Schulz H. (1919), Wirkung und Anwendung der deutschen Arzneipflanzen, Verlag von Georg Thieme, Leipzig, S. 412

Tschirch A. (1917), Handbuch der Pharmakognosie, Verlag von Chr. Herm. Tauchnitz, Leipzig, S. 904 ff

Urbain A., Marston A., Hostettmann K. (2005), Coumarins from *Peucedanum ostruthium* as inhibitors of Acetylcholinesterase, *Pharmaceutical Biology* **43**(8): 647-650

Vogl S. (2011), Dissertation, Univ. Wien, in Vorbereitung

Wang Y., Han T., Zhu Y., Zheng C., Ming Q., Rahman K., Qin L. (2010), Antidepressant properties of bioactive fractions of the extract of *Crocus sativus* (L.), *J. Nat. Med.* **64**: 24-30

Xi L., Qian Z., Du P., Fu J. (2007), Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats, *Phytomedicine* **14**(9): 633-636

Curriculum vitae

Katharina Waldbauer

Persönliche Daten

Geburtstag	16. Jänner 1987
Geburtsort	Stockerau, NÖ
Staatsbürgerschaft	Österreich
Religion	römisch-katholisch
Eltern	Johannes WALDBAUER selbstständiger Kaufmann
	Johanna WALDBAUER (geb. WIMMER) Bankangestellte i. R.

Ausbildung

1993-1997	Volksschule Stockerau
1997-2005	De La Salle Schule Strebersdorf
7. Juni 2005	Ablegung der Reifeprüfung
ab Oktober 2005	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
11. Dezember 2006	1. Diplomprüfung
27. September 2010	2. Diplomprüfung

Sprachen

Deutsch (Muttersprache)
Englisch
Französisch
Latein

Erwerbstätigkeit

August 2003	Humanis Klinikum NÖ – Sekretariat der Rheumatologie
August 2005	
August 2006	
August 2007	Apotheke zur Mariazeller Muttergottes, 1210 Wien
August 2008	
seit September 2008	Apotheke zur lieben Frau bei den Schotten, 1010 Wien (TCM-Abteilung)
März bis August 2009	Universität Wien, Department Pharmakognosie (Diplomarbeit)