



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Erstellung der Monographie Calendulae extractum fluidum
sowie Identifizierung von Polygalae radix für das
Österreichische Arzneibuch“

verfasst von

Sabine Mascotti

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Material.....	2
2.1	Drogenmaterial	2
2.2	Referenzsubstanzen	4
2.3	Chemikalien	5
3	Methoden und Geräte.....	6
3.1	Prüfung auf Identität mittels Dünnschichtchromatographie	6
3.2	Prüfung auf Reinheit durch Alkoholgehaltsbestimmung	7
3.3	Gehaltsbestimmung von Flavonoiden.....	7
3.4	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	9
4	Ringelblumenfluidextrakt.....	10
4.1	Calendula officinalis (L.).....	10
4.1.1	Allgemeines	10
4.1.2	Inhaltsstoffe.....	11
4.1.3	Wirkungen und Anwendung.....	14
4.2	Herstellung eines Fluidextraktes	17
4.3	Ergebnisse.....	19
4.3.1	Dünnschichtchromatographie.....	19
4.3.2	Alkoholgehalt.....	23
4.3.3	Flavonoidgehalt	25
4.3.4	High Performance Liquid Chromatography.....	28
4.4	Diskussion	36

5	Senegawurzfluidextrakt	40
5.1	Polygala senega (L.) und Polygala tenuifolia (Willd.)	40
5.2	Ergebnisse.....	45
5.2.1	Dünnschichtchromatographie.....	45
5.2.2	Diskussion.....	50
6	Zusammenfassung	51
7	Summary	52
8	Literaturverzeichnis	53
9	Tabellenverzeichnis.....	57
10	Abbildungsverzeichnis.....	58
	 Curriculum vitae	 59
	 ANHANG.....	 60

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die es mir ermöglicht haben meine Diplomarbeit zu verfassen und mich dabei tatkräftig unterstützt haben.

In erster Linie geht mein Dank an Frau Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp, unter deren Leitung ich am Department für Pharmakognosie meine Diplomarbeit verfassen durfte. Ich danke Ihr für die Ratschläge bei der praktischen Arbeit, für die wertvolle Hilfe beim Erstellen der Arzneibuchmonographie für das Österreichische Arzneibuch sowie für die Unterstützung beim Verfassen der Diplomarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Mag. Katharina Waldbauer, die mich während meiner Zeit als Diplomandin begleitete und mir bei wissenschaftlichen und labortechnischen Fragen stets zur Seite stand. Ihre konstruktiven Beiträge und zahlreichen Erklärungen waren für mich überaus hilfreich und förderlich.

Des Weiteren richte ich den Dank an Dr. Martin Zehl, auf dessen außerordentliche Hilfe ich beim Massenspektrometer zählen konnte.

Zudem möchte ich auch dem Diplomandenkolleg zur Überarbeitung von Monographien für das Österreichische Arzneibuch für deren Unterstützung danken.

Zu guter Letzt danke ich noch meiner Familie und Freunden, die immer für mich da sind und mir in jeder Lebenslage zur Seite stehen. Danke!

ABKÜRZUNGEN

DC	Dünnschichtchromatographie
EX	Fluidextrakt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
k. A.	keine Angabe
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
Nst. A	Naturstoffreagenz A
ÖAB	Österreichisches Arzneibuch
PEG 400	Polyethylenglycol 400
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch)
Rel. Stabw.	Relative Standardabweichung
Stabw.	Standardabweichung
TLC	Thin Layer Chromatography

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.

Sabine Mascotti

1 Einleitung

In Österreich gilt neben dem Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) auch das Österreichische Arzneibuch (ÖAB), dessen Aufgabe es ist, nationale Erfordernisse abzudecken. Derzeit wird das ÖAB einer Gesamtrevision unterzogen (ÖAB, 2013). Im Zuge dessen kam der Wunsch nach zwei weiteren Monographien auf: *Calendulae extractum fluidum* und *Senegae extractum fluidum*.

Für die Erstellung der Monographie *Calendulae extractum fluidum* sollten an neun verschiedenen Fluidextrakten die Identitätsprüfung, die Reinheitsprüfung und die Gehaltsbestimmung erarbeitet werden. Als Vorlage dient die Monographie *Calendulae flos* (Ringelblumenblüten) des Europäischen Arzneibuches. Ziel der Diplomarbeit ist es, die Methoden der Identitätsprüfung und Gehaltsbestimmung von *Calendulae flos* zu überprüfen und gegebenenfalls so abzuändern, dass sie für den Ringelblumenfluidextrakt anwendbar sind. Für die Reinheitsprüfung sollte der Alkoholgehalt der Proben (Fluidextrakte) bestimmt werden, dessen Methode im Europäischen Arzneibuch (2.9.10) festgeschrieben steht. Das Ziel war letztendlich, einen Monographievorschlag (Seite 37) der ÖAB-Expertengruppe zu präsentieren.

Des Weiteren wird in dieser Arbeit auch die Vorarbeit zur Erstellung des Monographievorschlages *Senegae extractum fluidum* geleistet. Zur Herstellung des Senegafluidextraktes wird die Droge *Polygalae radix* verwendet. Dazu gehören laut Ph. Eur. *Polygala senega* (L.), andere, eng verwandte Arten oder eine Mischung dieser Arten der Gattung *Polygala*. Vor Erstellung der Monographie muss daher festgestellt werden, welche der beiden Drogenarten vermehrt auf dem Markt ist, wie man sie unterscheiden kann, ob es qualitative Unterschiede oder gar Verfälschungen gibt.

2 Material

2.1 Drogenmaterial

Wie in Tabelle 1 ersichtlich standen zur Erarbeitung der Arzneibuchmonographie *Calendulae extractum fluidum* neun Ringelblumenfluidextrakte unterschiedlicher Lieferanten zur Verfügung.

Abkürzung	Lieferant	Batch-Nummer	Ablaufdatum
EX1	Herba Chemosan Apotheker AG, Wien, Österreich	12/43	03/01/2013
EX2	Pharmonta Dr. Fischer GmbH, Gratwein, Österreich	12/09	03/01/2015
EX3	Pharmonta Dr. Fischer GmbH, Gratwein, Österreich	1011	k. A.
EX4	Apotheke zur Triumphpforte, Innsbruck, Österreich	2392/0611	06/2014
EX5	Pharmonta Dr. Fischer GmbH, Gratwein, Österreich	PH-138/13	k. A.
EX6	Gatt-Koller GmbH, Absam, Österreich	4663/1012 2313	10/2015
EX7	Gatt-Koller GmbH, Absam, Österreich	1155/0413 1513	04/2016
EX8	Gatt-Koller GmbH, Absam, Österreich	1779/0513 2613	05/2016
EX9	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland	13212501	06/ 2016

Tabelle 1: Herkunft, Batch-Nummer und Ablaufdatum der Ringelblumenfluidextrakte

Beim Vergleich *Calendulae extractum fluidum* versus *Calendulae flos* wurde als *Calendulae flos* die Ringelblumenblütendroge P12302650 der Firma Kottas Pharma GmbH (Wien, Österreich) verwendet.

Material

Tabelle 2 zeigt die für die Vorarbeit zur Erstellung der Arzneibuchmonographie *Senegae extractum fluidum* analysierten Wurzeldrogen. Im Zuge der ehemaligen Mitgliedschaft von Frau Prof. Kopp in der Europäischen Arzneibuchkommission wurde in ihrer Arbeitsgruppe bereits an der Überarbeitung der Monographie *Polygala senega* für die Ph. Eur. gearbeitet, weshalb einige Polygala-Proben bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden waren. Neu erhaltenes Drogenmaterial wurde fortlaufend nummeriert.

Abkürzung	Name	Batch-Nummer	Lieferant
RS24	Polygalae Rx.	240101	
RS25	Polygalae Rx.	310101	
RS26	Polygalae Rx.	410101	
RS27	no name		
RS28	Polygalae senegae radix	0904-5423/al	Berg-Apotheke, Zürich, Schweiz
RS29	Polygalae radix	0906A	Phytolab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
RS30	Polygalae radix	0810A	Phytolab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
RS31	Polygalae radix	0812A	Phytolab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
RS32	Radix Senegae	F3153	Council of Europe, Straßburg, Frankreich
RS33	Senegae radix concisa	F3154	Council of Europe, Straßburg, Frankreich
RS34	Senegawurzel ganz	2226/13 128332	Martin Bauer Group, Vestenbergsgreuth, Deutschland
RS35	Senegawurzel Ph.Eur.7.0	2804	Kottas, Wien Österreich / Pharmonta Dr. Fischer GmbH, Gratwein Österreich
RS36	Senegawurzel Ph.Eur.7.0	P20943	Dixa, St. Gallen, Schweiz / Pharmonta Dr. Fischer GmbH, Gratwein, Österreich
RS37	Rd. Senegae cs	P11309049	Kottas Pharma, Wien, Österreich
RS38	Rd. Senegae cs	P11309220	Kottas Pharma, Wien, Österreich

Tabelle 2: Nähere Details zu den Wurzeldrogen von *Polygalae radix*

2.2 Referenzsubstanzen

Für die Dünnschichtchromatographie und die HPLC-Messungen wurden folgende Referenzsubstanzen verwendet:

Rutin	Extrasynthese, Genay, Frankreich Batch-Nummer: 11101722 Reinheit: > 99 %
Hyperosid	Extrasynthese, Genay, Frankreich Batch-Nummer: 11101724 Reinheit: > 98 %
Chlorogensäure	Phytolab, Vestenbergsgreuth, Deutschland Batch-Nummer: 4549 Reinheit: k. A.
Kaffeesäure	ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Batch-Nummer: 1071109 Reinheit: 98 %
Isorhamnetin-3-O-glucosid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Batch-Nummer: 3313763 Reinheit: k. A.
Isorhamnetin-3-O-rutinosid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Batch-Nummer: 50942995 Reinheit: k. A.
Saccharose	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz Batch-Nummer: 58284 53K Reinheit: purissimum
Ammoniumglycyrrhizat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz Batch-Nummer: 235749/1 893 Reinheit: 95 %

2.3 Chemikalien

Alle Reagenzien und Lösungsmittel entsprachen den Anforderungen der Ph. Eur. 7.0 .

wasserfreie Ameisensäure 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasser <i>R</i>	Herstellung Universität Wien
Ethylacetat p.a.	VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Naturstoffreagenz A	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol p.a.	VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Polyethylenglycol (PEG) 400	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methenamin	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Aceton p.a.	VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril p.a.	VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 36%	Gatt-Koller, Absam, Österreich
Salzsäure <i>R1</i>	Herstellung nach Ph. Eur. 7.0
Aluminiumchlorid	Kwizda, Wien, Österreich
Essigsäure 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dichlormethan p.a.	VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Anisaldehyd	Merck, Wien, Österreich
Ethanol 70%	Herstellung aus Ethanol 96% (Brenntag CEE Group, Wien, Österreich)
Schwefelsäure 93-95%	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

3 Methoden und Geräte

3.1 Prüfung auf Identität mittels Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) dienten unterschiedliche Platten der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) als stationäre Phase:

Stationäre Phase 1: Thin Layer Chromatography (TLC), Kieselgel 60 F₂₅₄ (5 - 40 µm) auf Aluminiumfolie

Stationäre Phase 2: Thin Layer Chromatography (TLC), Kieselgel 60 F₂₅₄ (5 - 40 µm) auf Glas

Stationäre Phase 3: High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC), Kieselgel 60 F₂₅₄ (2 - 10 µm) auf Glas

Die Größe der Platte wurde je nach Anzahl der Proben und deren Laufstrecke ausgewählt.

Ausgangsmethode für die Identitätsprüfung des Ringelblumenfluidextrakts war die Arzneibuchmonographie *Calendulae flos*. Nach einigen Änderungen, die im Kapitel 4.3.1 (Seite 19 ff) ausgeführt werden, stand folgende Methode fest:

Mobile Phase: Ethylacetat R/Wasser R/wasserfreie Ameisensäure R (80/10/10)
Untersuchungslösung: Fluidextrakt
Referenzlösung: 2,5 mg Rutin R und 2,5 mg Hyperosid R in 10 ml Methanol R gelöst
Auftragen: 10 µl; bandförmig (15 mm) [oder 2 µl; bandförmig (5 mm)]
Laufstrecke: 10 cm [oder 8 cm]
Trocknen: bei 100 bis 105°C
Detektion: Die Platte wird mit einer Lösung von Diphenylboryloxyethylamin R (10 g · l⁻¹) (=Naturstoffreagenz A) in Methanol R und anschließend mit einer Lösung von Macrogol 400 R (50 g · l⁻¹) (=Polyethylenglycol 400) in Methanol R besprüht. Die Platte wird 30 min an der Luft trocknen gelassen. Die Auswertung erfolgt im ultravioletten Licht bei 365 nm.

Für die Unterscheidung der Polygala-Arten entwickelte die Arbeitsgruppe um Frau Prof. Kopp folgende Methode:

Untersuchungslösung: 1 g gepulverte Droge (355) (2.9.12) mit 10 ml Ethanol 70% 15 min unter Rückfluss am Wasserbad erhitzen und anschließend filtrieren
Mobile Phase: Dichlormethan R/Essigsäure 99% R/Methanol R/Wasser R (60/32/12/8)
Referenzlösung: 2 mg Ammoniumglycyrrhizat R und 2 mg Saccharose R in 1 ml Ethanol 70 % R gelöst
Auftragen: 20 µl; bandförmig (15 mm)
Laufstrecke: 12 cm
Trocknen: in der Luft
Auswertung: bei 254 nm und 365 nm vor dem Besprühen, bei Tageslicht und 366 nm nach dem Besprühen
Sprühreagenz: Anisaldehydreagenz R, erhitzen bei 105-110° für 5-10 min

Im Zuge der Diplomarbeit konnten auch instrumentelle DCs (Abbildung 6, 7 und 8 auf Seite 21 und 22) mit dem TLC/HPTLC-Gerät der Firma Camag (Muttens, Schweiz) angefertigt werden

Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4): 200472

Automatic Developing Chamber (ADC 2): 200267

TLC Visualizer: 200496

Software: Vision Cats

3.2 Prüfung auf Reinheit durch Alkoholgehaltsbestimmung

Die Alkoholgehaltsbestimmung erfolgte mittels Pyknometer laut Ph. Eur. (2.9.10):

Dabei werden 25,0 ml der flüssigen, ethanolischen Zubereitung in einem Destillationskolben mit 100-150 ml destilliertem Wasser *R* und einigen Siedesteinchen versetzt. Anschließend werden mit der entsprechenden Apparatur mindestens 90 ml in einen 100-ml-Messkolben destilliert. Das Destillat wird auf $20 \pm 0,1$ °C gebracht und mit Wasser *R* von $20 \pm 0,1$ °C auf 100 ml verdünnt. Dann wird mit einem Pyknometer die Dichte des Destillats bestimmt. Anhand der Dichte wird im Europäischen Arzneibuch in der Tabelle 2.9.10-1 der Alkoholgehalt abgelesen. Dieser Wert wird noch mit 4 multipliziert, um den Ethanolgehalt der Zubereitung in Prozent (V/V) zu erhalten.

3.3 Gehaltsbestimmung von Flavonoiden

Wie schon bei der Identitätsprüfung diente auch bei der Gehaltsbestimmung die Arzneibuchmonographie *Calendulae flos* als Vorlage. Nach Weiterentwicklung der Methode (siehe Kapitel 4.3.3, Seite 25) wurde der Flavonoidgehalt der Fluidextrakte auf folgende Art und Weise bestimmt:

Stammlösung:

In einem 100-ml-Rundkolben werden 30 min lang 0,800 g Fluidextrakt, 1 ml einer Lösung von Methenamin *R* ($5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), 20 ml Aceton *R* und 7 ml Salzsäure *R* zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Erkalten auf Raumtemperatur wird die Flüssigkeit mit Aceton *R*, das als Spülflüssigkeit für Kolben dient, im Messkolben zu 100,0 ml verdünnt. 20,0 ml dieser Lösung werden in einem Scheidetrichter mit 20 ml

Methoden und Geräte

Wasser *R* versetzt. Die Mischung wird einmal mit 15 ml und 3-mal mit je 10 ml Ethylacetat *R* geschüttelt. Die Ethylacetatauszüge werden in einem Scheidetrichter vereinigt, 2-mal mit je 50 ml Wasser *R* gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat *R* getrocknet, in einen Messkolben filtriert und mit Ethylacetat *R* zu 50,0 ml verdünnt.

Untersuchungslösung:

10,0 ml Stammlösung werden mit 1 ml Aluminiumchlorid-Reagenz *R* versetzt und mit einer 5-prozentigen Lösung (V/V) von Essigsäure 99 % *R* in Methanol *R* zu 25,0 ml verdünnt.

Kompensationsflüssigkeit:

10,0 ml Stammlösung werden mit einer 5-prozentigen Lösung (V/V) von Essigsäure 99 % *R* in Methanol *R* zu 25,0 ml verdünnt.

Die Absorption (2.2.25) der Untersuchungslösung wird nach 30 min bei 425 nm gegen die Kompensationsflüssigkeit gemessen. Die Absorption wurde mit dem Spektrophotometer DU 640 der Firma Beckman, USA gemessen.

Der Prozentgehalt an Flavonoiden wird als Prozentgehalt an Hyperosid nach folgender Formel berechnet:

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

A ist die gemessene Absorption bei 425 nm und als *m* wird die Einwaage des Fluidextraktes in Gramm eingesetzt. Der Faktor 1,25 ergibt sich aus den Verdünnungsschritten während der Gehaltsbestimmung und aus der spezifischen Absorption $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ (ϵ) von Hyperosid, die 500 beträgt. Die genaue Herleitung der Formel ist im Folgenden aufgeschlüsselt:

Berechnung der Verdünnung des Fluidextraktes (*m*):

$$m \cdot \frac{20 \cdot 10}{100 \cdot 50} = m \cdot \frac{1}{25} \text{ in 25 ml} = m \cdot \frac{4}{25} \text{ in 100 ml}$$

$$\frac{A \cdot 100}{\epsilon \cdot m \cdot 0,16} = \%$$

$$\frac{A \cdot 100}{500 \cdot m \cdot 0,16} = \frac{A \cdot 1,25}{m} = \%$$

3.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für die HPLC-Messungen wurde ein Gerät der Firma Perkin Elmer verwendet:

Autosampler: Series 200

Pumpe: Series 200

Säulenofen: Series 200

Detektor: UV/VIS, Series 200, Wellenlänge 320 nm

Degasser: Series 200

Controller: 600 Series 4 NK

Software: Total ChromTM

Die LC-MS wurde mit einer UltiMate 3000 RSLC-System gekoppelt an ein ESI-IT-MS durchgeführt:

Ionisation: Elektrospray

Ionenpolarität: negativ (Kapillarspannung 3500 V) und positiv (Kapillarspannung -3700 V)

Trockengastemperatur: 340°

Trockengasfluss: 26.00 p.s.i.

Vernebelungsgasdruck: 9.00 l/min

Kollisionsgas: Helium

Messbereich: 80-800 m/z

Als Säule diente eine Hypersil BDS C18, Thermo Hypersil-Keystone, die eine Länge von 250 mm, einen Durchmesser von 4 mm und eine Partikelgröße 5 µm aufwies.

4 Ringelblumenfluidextrakt

4.1 Calendula officinalis (L.)

4.1.1 Allgemeines

Der Ursprung der Ringelblume als Wildpflanze liegt wahrscheinlich in den Höhen des Atlasgebirges in Nordwestafrika. Nachweislich wurde sie im 12. Jahrhundert in Klostergärten angebaut. Heute ist sie in Mittel- und Südeuropa, Asien, Nordafrika, Mittel- und Nordamerika verbreitet. Ihre natürlichen Standorte sind Gärten, Wegränder und Schutthalden, aber aufgrund ihrer langen Blütezeit findet man sie auch auf Friedhöfen (Isaac, 1992).

Die Ringelblume ist eine einjährige Pflanze mit meist zwei Blühphasen im Frühsommer und im Herbst. Sie wird 30 bis 50 cm hoch und ist im oberen Teil sehr verzweigt. Am kantig, flaumig behaartem Stängel wachsen wechselständige Blätter, die bei einer Länge von 10 bis 15 cm und einer Breite von 3 bis 4 cm eine spatelförmige bis lanzettliche Form annehmen. Am Ende eines jeden Stängels oder Seitenzweiges befindet sich ein Blütenköpfchen mit einem Durchmesser von 5 bis 7 cm. Dieses besteht aus einem schüsselförmigen Hüllkelch, der außen 2 oder 3 Reihen gelb bis orangefarbene Zungenblüten aufweist und im Inneren mit Röhrenblüten gefüllt ist, die ebenso gelb bis orange, manchmal auch braun gefärbt sind. Die Früchte der Ringelblume sind einwärts gekrümmte Achänen, die sich durch große Vielgestaltigkeit auszeichnen (Blaschek, 2007; Isaac, 1992).

Als Arzneidroge definiert das Europäische Arzneibuch „*die ganzen oder geschnittenen, völlig entfalteten, getrockneten und vom Blütenstand befreiten Einzelblüten der kultivierten, gefüllten Varietät von Calendulae officinalis L.*“ Als „gefüllt“ werden Infloreszenzen mit mehreren Kreisen von Zungenblüten bezeichnet, da *Calendula officinalis* besonders als Kulturpflanze dazu neigt, Röhren- in Zungenblüten umzuwandeln (Blaschek, 2007).

4.1.2 Inhaltsstoffe

Die Hauptinhaltsstoffe in *Calendula officinalis* (L.) sind Triterpenglykoside, Triterpenalkohole, Carotinoide, Flavonoide, Polysaccharide und ätherisches Öl.

Triterpenglykoside:

Schon 1931 fand man heraus, dass die Blüten der Ringelblume Oleanolsäure mit Zucker- und Uronsäuresubstituenten enthält. Diese Substituenten konnten später als Glucose, Galactose und Glucuronsäure identifiziert werden. Diese Oleanolglykoside werden Saponoside genannt. Bei den Saponosiden der Blüten ist die Hydroxygruppe am C-3 der Oleanolsäure mit einer Glucuronsäure verestert, die ihrerseits β -D-Glucose und/oder β -D-Galactose als Reste trägt. Zudem kann die 28-Carboxylgruppe mit einer β -D-Glucose verestert sein. Daraus ergeben sich sechs Triterpenglykoside, die den Namen Saponoside A bis F tragen. Des Weiteren enthält die Ringelblumenblüte Calendasaponine A bis D (siehe Abbildung 1, Seite 12), wobei es sich um Triterpenoligoglykoside vom Oleanan-Typ mit Zuckerresten in C-3 und C28 handelt (Blaschek, 2007; Yoshikawa et al., 2001; Isaac, 1992).

Triterpenalkohole:

Die Ringelblumenblüten enthalten ein Gemisch von pentacyclischen Mono-, Di- und Trihydroxytriterpenen, die sich vom ψ -Taraxen, Taraxen, Lupen, Oleanen und Ursen ableiten. Alle Alkohole kommen frei oder verestert vor. Nur ein geringer Teil der Monole ist mit Essigsäure verestert, wohingegen die Diole zu 98% verestert vorliegen. Bei den Diolen handelt es sich um Faradiole (siehe Abbildung 1, Seite 13), Arnidiale und Calenduladiole, die als 3-Monoester mit Laurin-, Myristicin- und Palmitinsäure vorkommen. Der Gehalt an Faradiolestern ist in den Zungenblüten um das 10 fache höher als in den Röhrenblüten. Als Triole trifft man Heliantriol A₁, Heliantriol B₀, Heliantriol B₂, Heliantriol C, Longispinogenin und Ursatriol an (Blaschek, 2007; Neukirch et al., 2004; Zitterl-Eglseer et al., 2001).

Carotinoide:

Die starke Färbung der Ringelblumenblüten ist auf den Carotinoidgehalt zurückzuführen. Dabei lassen sich zwei Gruppen unterscheiden: die Carotine, die die orange Farbe der Blüten bilden, und die Xanthophylle, die in den gelbblühenden Pflanzen vermehrt vorkommen. Hauptvertreter sind β -Carotin, Lutein, Flavoxanthin und Luteoxanthin (Blaschek, 2007; Bakó et al., 2001; Piccaglia et al., 1997).

Flavonoide:

Getrocknete Blüten können bis zu 2 % Flavonoide enthalten. Die Flavonoide der Ringelblume sind Flavonolglykoside mit Isorhamnetin und Quercetin als Aglyka. Zu den wichtigsten Flavonoiden gehören: Quercetin-3-O-glucosid (=Isoquercitrin), Quercetin-3-O-rutinosid (=Rutin, siehe Abbildung 1, Seite 13), Isorhamnetin-3-O-glucosid, Isorhamnetin-3-O-glucosylglucosid, Isorhamnetin-3-O-rutinosid (=Narcissin, siehe Abbildung 1, Seite 13), Isorhamnetin-3-O-rutinosylrhamnosid, Quercetin-3-O-rutinosylrhamnosid und (Bilia et al., 2002; Bilia et al., 2001; Piccaglia et al. 1997).

Polysaccharide:

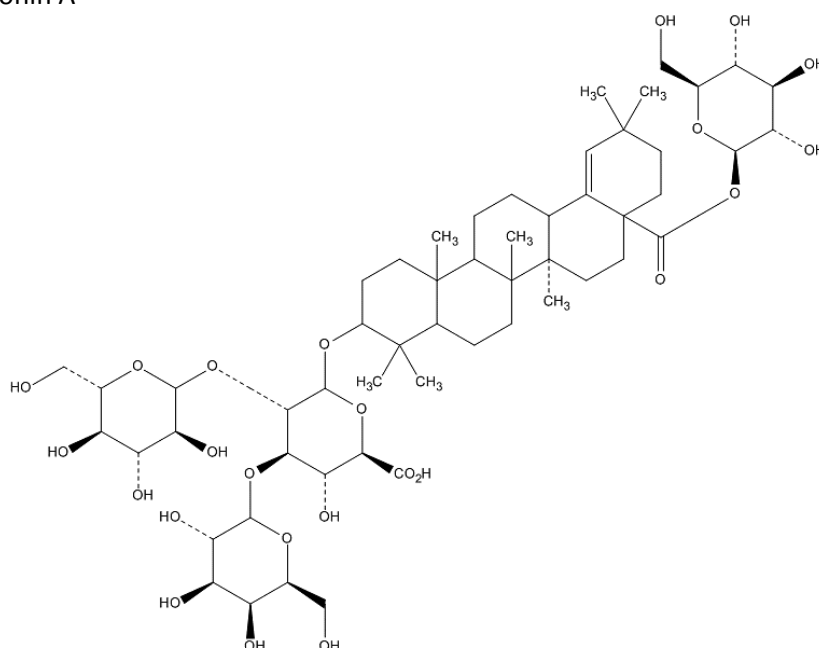
Ringelblumenblüten enthalten wasserlösliche Polysaccharide aus Galacturonsäure, Arabinose, Galactose, Glucose, Rhamnose und Xylose. Es sind saure Heteroglykane, die als Struktur Rhamnogalacturonan-1 mit unterschiedlichem Verzweigungsgrad aufweisen (Korzh et al., 2012; Isaac 1992).

Ätherisches Öl:

Der Gehalt an ätherischem Öl beträgt in der Blütezeit bis zu 0,97 %. Im ätherischen Öl der Ringelblume wurden 43 unterschiedliche Verbindungen, v.a. Monoterpene und Sesquiterpene gefunden. Die Hauptinhaltsstoffe sind 1,8-Cineol, Geraniol, Germacrene D, δ -Cadinen, α -Cardinol, α -Pinen und α -Thujen. Untersuchungen zeigten, dass die quantitative und qualitative Zusammensetzung des Öls während der Wachstumsperiode stark variiert (Kaškonienė et al., 2011; Okoh et al., 2007).

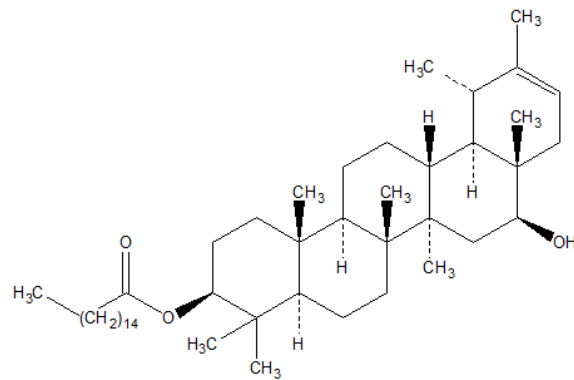
Weitere Inhaltsstoffe sind Cumarine, Aminosäuren und Fette (Muley et al., 2009).

Calendasaponin A

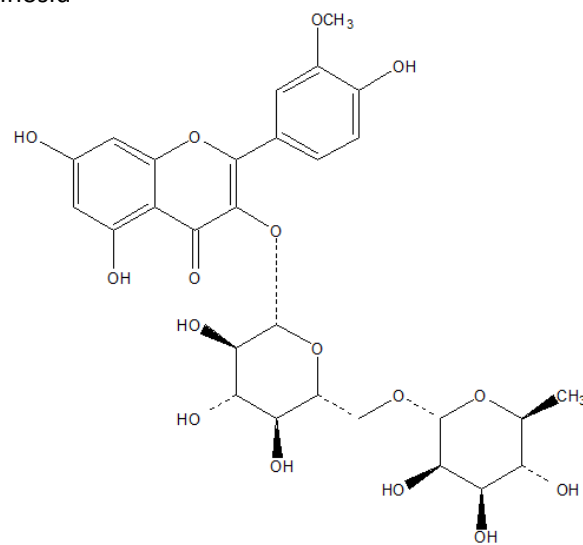


Ringelblumenfluidextrakt

Faradiol-3-O-palmitat



Isorhamnetin-3-O-rutinosid



Rutin

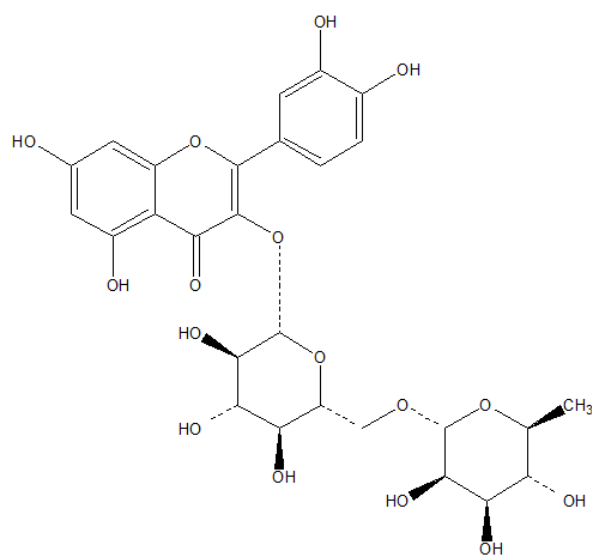


Abbildung 1: Inhaltsstoffe von *Calendula officinalis* (L.)

4.1.3 Wirkungen und Anwendung

Die Verwendung der Ringelblume als Heilpflanze reicht viele Jahrhunderte zurück. Möglicherweise meinten Dioskurides und Theophrast die Ringelblume, als sie von einer Pflanze namens „Klymenon“ sprachen. Die erste schriftliche Aufzeichnung geht auf die heilige Hildegard von Bingen zurück. In ihren Werken empfiehlt die Äbtissin die Ringelblume gegen Verdauungsstörungen und impetiginöse Ekzeme (Isaac, 1992).

Als Heilmittel gegen Hautkrankheiten und Wunden wird die Ringelblume auch von Sebastian Kneipp in seinem Buch „Das große Kneippbuch: ein Volksbuch für Gesunde und Kranke“ 1935 beschrieben. Sie ist *„eine Pflanze gegen Geschwüre, die recht bösartig und giftig aussehen...bei denen man das Eintreten des Brandes und der Blutvergiftung befürchten muss.“* Er verwendet dafür eine Ringelblumensalbe, dessen Salbengrundlage gesottenes Schweineschmalz ist. Neben der Salbe verwendet Kneipp auch den Tee aus Ringelblumenblättern bei äußeren Geschwüren. Innerlich wie *„entzündetem Magen“* empfiehlt er *„täglich sechs- bis achtmal einen Löffel voll von solchem Tee“*.

Sowohl die wundheilende als auch die antientzündliche Wirkung der Ringelblume konnte wissenschaftlich belegt werden: So führte die Gabe von Ringelblumenextrakt an Mäusen, bei denen durch Lipopolysaccharide ein Entzündungsgeschehen hervorgerufen wurde, zu signifikanten Erniedrigungen der proinflammatorischen Cytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF- α im Blut und zur Hemmung der COX-2-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Preethi et al., 2009). Duran et al. (2005) zeigte, dass die Ringelblume im Vergleich zu Kochsalzlösung das Wachstum des Epithels erhöht und dadurch zu einer statistisch signifikanten Beschleunigung der Wundheilung beiträgt.

Dass Wunden möglichst keimfrei gehalten werden sollen, ist allgemein bekannt. Daher ist die antimikrobielle Wirkung der Ringelblume willkommen. Extrakte unterschiedlicher Lösungsmittel wirken antibakteriell auf *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus subtilis* (Roopashree et al., 2008) und antifungal auf *Candida albicans* (Singh et al., 2011). Hinzu kommt eine antivirale Wirkung gegen HIV-1. Ein apolarer Auszug der Ringelblume zeigte signifikante Reduktion der Reversen-Transkriptase-Aktivität und verhinderte das Andocken HIV-1 an gesunde Zellen (Kalvatchev et al., 1997).

Viele Ärzte empfahlen die Ringelblume früher als Emmenagogum, sie regelt die Menses, lindert Uterusbeschwerden und hilft stillenden Müttern bei verhärteten Brüsten. Zudem wurde der Pflanze eine herzstärkende und schweißtreibende Kraft zugesprochen. Eine besondere Rolle spielte die Ringelblume in der Krebstherapie. Matthiolus war der erste Arzt, der sie in dieser Hinsicht als wirksam bezeichnete. Er nannte sie daher auch „Herba Cancri“. Der schwedische Arzt Westring verwendete die

Ringelblumenfluidextrakt

Ringelblume ebenfalls als Mittel gegen Krebs. Bei Uteruskrebs beispielsweise benutzte er einen Ringelblumenaufguss als Spülung und verordnete zudem die perorale Einnahme des Extraktes der Pflanze. Nach der Mitte des 19. Jahrhunderts geriet die antitumorale Wirkung allmählich in Vergessenheit (Madaus, 1976).

In den letzten Jahren jedoch wurden die Untersuchungen wieder aufgenommen. In einer in-vitro-Studie zur antitumoralen Wirkung eines wässrigen Ringelblumenextraktes wurde die Zytotoxizität bei mehreren Zelllinien festgestellt. Am stärksten wirksam war der Extrakt bei Melanomzellen Fem-x (Matić et al. 2012). Es kommt zur Unterbrechung des Zellzyklus und zur Apoptose. Ein wässriger Extrakt, der während der Herstellung immer wieder mit Laserstrahlung behandelt wurde, wirkt hingegen mitogen auf periphere Blutleukozyten, B- und T-Lymphozyten und NTK-Zellen (Jiménez-Medina et al., 2006).

Das Interesse an der Ringelblume ist in den letzten Jahren sehr stark gestiegen. Das zeigt die Vielzahl an Studien, mit denen nicht nur traditionelle Anwendungsgebiete überprüft werden, sondern auch versucht wird, neue Wirkungsbereiche zu entdecken.

Auf diese Weise konnte der Ringelblume auch eine hepato- und nephroprotektive Wirkung zugeschrieben werden. Preethi et al. (2009) löste durch Tetrachlorkohlenstoff Leberschäden bei Mäusen aus und durch Cisplatin Nierentoxizität. Nach Gabe von Ringelblumenextrakt konnte eine signifikante Reduktion der Leberwerte Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Alkalische Phosphatase und Bilirubin sowie der Nierenparameter Harnstoff und Kreatinin im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden.

In weiteren Tierstudien wurde die hypoglykämische und lipidsenkende Wirkung untersucht. Yoshikawa et al. (2001) führte mit Mäusen einen oralen Glucosetoleranztest durch. Bei der mit Ringelblumenextrakt behandelten Gruppe kam es zur Hemmung des Anstiegs der Blutglucose. Chakraborty et al. (2011) verabreichte den durch Alloxan an Diabetes mellitus erkrankten Ratten einen alkoholischen Ringelblumenextrakt, was zu einer Senkung des Blutglucosespiegels und zu verminderten Blutfettwerten im Gegensatz zur Vergleichsgruppe führte.

Heute weiß man über die analgetische (Shahidi et al., 2012) und spasmolytische (Bashir et al. 2006) Eigenschaft der Ringelblume Bescheid. Allerdings wirkte nur der organische Extrakt durch Calciumkanalblockade im Gastrointestinaltrakt krampflösend, während bei der wässrigen Fraktion eine spasmogene Wirkung festgestellt wurde.

Ringelblumenfluidextrakt

In den letzten Jahren trat das Wort „Glutamat“ verstärkt in den Medien auf.¹ In dieser Hinsicht ist wahrscheinlich eine weitere Studie interessant, in der der Zusammenhang zwischen Ringelblume und Glutamat untersucht wurde. Glutamat wird häufig als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie eingesetzt, allerdings wirkt es neurotoxisch, erhöht den oxidativen Stress im Gehirn und kann bei Anwendung in hohen Dosen zum China-Restaurant-Syndrom, gekennzeichnet durch Schwindel, Schwäche, Hitzewallungen und Kopfweh, führen. Zu diesem Thema wurde vor Kurzem eine Studie mit Ratten veröffentlicht, bei der gezeigt wird, dass Ringelblumenextrakt bei Glutamat induzierter Neurotoxizität protektiv wirkt, den oxidativen Stress senkt und so den Körper vor freien Radikalen schützt (Shivasharan et al., 2013).

Die Ringelblume zeigt eine Vielzahl an Wirkungen, allerdings werden nur wenige therapeutisch genutzt. Heute wird die Ringelblume äußerlich bei schlechtheilenden Wunden, Ulcus cruris, Atherome und bei akuten sowie chronischen Hautentzündungen eingesetzt. Innerlich findet sie Anwendung bei Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhaut, zur Behandlung von Magen- und Darmulcera, als Emmenagogum und bei Dysmenorrhoe (Blaschek, 2007).

Neben dem arzneilichen Gebrauch wird die Ringelblume in der Kosmetik eingesetzt, da sie sich zur Pflege empfindlicher, normaler und trockener Haut gut eignet. Besonders wird sie in der Säuglingspflege verwendet (Blaschek, 2007).

Als Zubereitungen dienen Tee, Tinkturen, Fluidextrakte und Salben. Für die Teebereitung werden 1-2 Teelöffel Ringelblumenblüten mit 150 ml heißem Wasser übergossen und für 10 min ziehen gelassen. Anschließend wird mit dem noch warmen Tee mehrmals täglich gegurgelt, gespült oder Leinen getränkt, um Umschläge vorzubereiten. Dieselbe Anwendung finden Tinkturen, wobei 1-2 Teelöffel davon auf 250 bis 500 ml Wasser verdünnt werden. Tinkturen und Fluidextrakte können auch pur eingenommen werden. Als Dosierung gilt dabei dreimal täglich 0,3-1,2 ml Tinktur bzw. 0,5-1,0 ml Fluidextrakt, in akuten Fällen auch mehr. Zur Herstellung von Salben werden Blüten oder Kraut der Ringelblume oder Ringelblumenfluidextrakt verwendet. 100 g der Kneipp'schen Calendulasalbe entsprechen beispielsweise 5 g Blüten und 15 g Kraut. In einem anderen Rezept werden 1 Teil Fluidextrakt in 9 Teile wasserhaltigem Wollfett eingerührt. Dr. Theiss verwendet für seinen Ringelblumenextrakt Schweineschmalz und Maiskeimöl als Salbengrundlage. Da Schweineschmalz dem menschlichen Hautfett sehr ähnlich ist, dringen die im Schmalz gelösten Wirkstoffe gut in die Haut ein. Maiskeimöl ist reich an ungesättigten Fettsäuren, die die Oberflächendurchblutung anregen sollen (Blaschek, 2007; Isaac, 1992).

¹ <http://www.welt.de/gesundheit/article3276919/So-schaedlich-ist-Glutamat-im-Essen-wirklich.html>
<http://derstandard.at/1361241218599/Glutamat-Alles-wird-gut>

4.2 Herstellung eines Fluidextraktes

Bezüglich der Herstellung eines Fluidextraktes erkundigt man sich im Arzneibuch. Im Vorwort des ÖAB wird festgehalten, dass für die neuen Monographien „*der Allgemeine Teil des Europäischen Arzneibuchs in der gültigen Fassung*“ gilt (ÖAB, 2013). Ein Blick in die Ph. Eur. 7.0/0765 zeigt, dass Fluidextrakte durch Extraktion der pflanzlichen Droge unter Verwendung von Ethanol in geeigneter Konzentration oder von Wasser oder durch Lösen eines zähflüssigen Extrakts oder Trockenextrakts hergestellt werden. Bei letzterem müssen zähflüssiger Extrakt oder Trockenextrakt mit dem gleichen Extraktionsmittel in gleicher Konzentration hergestellt werden, wie bei der Herstellung des Fluidextraktes durch direkte Extraktion verwendet wird.

Als Extraktionsmethoden werden die Mazeration oder die Perkolation verwendet. Die Mazeration (macerare = wässern, einweichen) gilt als das einfachste Auszugsverfahren. Dabei wird die zerkleinerte Droge mit dem Extraktionsmittel versetzt und in einem verschlossenen Gefäß vor Licht geschützt bei Zimmertemperatur sechs Tage stehen gelassen. Während dieser Mazerationszeit muss der Ansatz immer wieder (etwa dreimal täglich) geschüttelt werden, damit ein Konzentrationsausgleich der Extraktivstoffe in der Flüssigkeit gewährleistet ist. Nach Ablauf der Mazerationszeit wird der Ansatz koliert und der Rückstand ausgepresst. Die Kolatur und die Pressflüssigkeit werden vereinigt. Der erhaltene Extrakt wird durch Nachwaschen des Pressrückstandes mit dem Extraktionsmittel oder durch Konzentrieren auf den vorgeschriebenen Gehalt gebracht. Dann wird der Fluidextrakt drei Tage kühl gelagert und anschließend filtriert (ÖAB 2013; Voigt, 2006).

Die Mazeration wird zwar in Apothekenlaboratorien als Extraktionsmethode am häufigsten genutzt, allerdings muss man dabei in Kauf nehmen, dass eine erschöpfende Extraktion der Droge nicht erreicht wird. Erschöpfend extrahiert werden kann durch die Perkolation (Bauer et al., 2012).

Zur Perkolation (percolare = durchtropfen) wird meist grob gepulverte Droge in einen Perkulator gefüllt. Dabei handelt es sich um ein zylindrisches Glasgefäß, das eine geeignete Zu- und Ablaufvorrichtung mit Glashahn besitzt. Unten ist eine Siebplatte vorhanden, um zu vermeiden, dass Drogenteilchen in das Abflussrohr gelangen. Anstelle einer Siebplatte kann auch eine Watteschicht von 1 cm verwendet werden. Von oben fließt kontinuierlich Extraktionsmittel durch die Droge und löst die Extraktivstoffe heraus. Durch das ständige Zuführen von neuem Lösungsmittel und der damit verbundenen Neueinstellung des Konzentrationsgleichgewichtes zwischen der Lösung in der Pflanzenzelle und der sie umgebenden Flüssigkeit können 95% der extrahierbaren Stoffe gewonnen werden. Vor dem Füllen des Perkulators wird die Droge mit dem Extraktionsmittel befeuchtet, so dass

Ringelblumenfluidextrakt

eine krümelige Masse entsteht. Das Gemisch wird in einem gut verschließbaren Gefäß 12 Stunden quellen gelassen. Dadurch wird das Eindringen des Extraktionsmittels in die Zellen während der Perkolation erleichtert. Anschließend kann der Perkulator mit der vorgequellten Droge befüllt werden. Dabei sollen Hohlräume und eine zu kompakte Füllung vermieden werden, um die Gleichförmigkeit des Flüssigkeitsstroms zu gewährleisten. Auf die Droge kommt eine Schicht Filterpapier und dann kann bei offenem Glashahn das Extraktionsmittel zugeführt werden, bis der Inhalt des Perkulators mit einer 2-3 cm hohen Flüssigkeitsschicht überdeckt ist. Sobald die Extraktlösung beginnt abzutropfen, wird die Ablaufvorrichtung geschlossen und der Perkulator wird bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen gelassen. Während dieser Zeit findet die Nachquellung statt. Daran schließt sich die Perkolation an. Der Tropfhahn der Ablaufvorrichtung wird so eingestellt, dass je Minute etwa 1 ml abfließt, wobei die Droge stets mit Extraktionsflüssigkeit bedeckt sein muss. Nach Beendigung der Perkolation wird die Droge ausgepresst, die Pressflüssigkeit mit dem Perkolat vereinigt und auf einen bestimmten Gehalt eingestellt. Dann wird der Fluidextrakt drei Tage kühl gelagert und abschließend filtriert (ÖAB 2013; Voigt, 2006).

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Dünnschichtchromatographie

Ausgangsmethode für die Identitätsprüfung des Ringelblumenfluidextrakts war die Arzneibuchmonographie *Calendulae flos*:

Dünnschichtchromatographie (2.2.27)

Untersuchungslösung: 1,0 g pulverisierte Droge (500) (2.9.12) wird 10 min lang mit 10 ml Methanol *R* auf dem Wasserbad unter Rückflusskühlung erhitzt und nach dem Abkühlen abfiltriert.

Referenzlösung: 1,0 mg Kaffeesäure *R* und 1,0 mg Chlorogensäure *R* sowie 2,5 mg Rutosid *R* werden in 10 ml Methanol *R* gelöst.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel *R*

Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure *R*, Wasser *R*, Ethylacetat *R* (10:10:80 V/V/V)

Auftragen: 20 µl Untersuchungslösung, 10 µl Referenzlösung; bandförmig

Laufstrecke: 10 cm

Trocknen: bei 100 bis 105 °C

Detektion: Die noch warme Platte wird mit einer Lösung von Diphenylboryloxyethylamin *R* ($10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) in Methanol *R* und anschließend mit einer Lösung von Macrogol 400 *R* ($50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) in Methanol *R* besprüht. Die Platte wird 30 min lang an der Luft trocknen gelassen. Die Auswertung erfolgt im ultravioletten Licht bei 365 nm.

Abbildung 2: Identitätsprüfung mittels Dünnschichtchromatographie von *Calendulae flos* (Ph. Eur. 7.0)

Wie in Abbildung 3 (Seite 20) erkennbar, weisen die Untersuchungslösung, hergestellt aus der Ringelblume, und der Fluidextrakt (1:2 verdünnt mit Ethanol 70 %) das gleiche Bandenmuster auf. Daher wurden das Fließmittelsystem und die Laufstrecke für die Identitätsprüfung des Fluidextrakts übernommen. Um die Bandenschärfe zu verbessern, wurden auf den folgenden DCs als Untersuchungslösung nur mehr 10 µl Fluidextrakt (unverdünnt) mit einer Bandbreite von 15 mm aufgetragen. Dadurch fiel die Verdünnung des Fluidextrakts und somit ein weiterer Arbeitsschritt weg.

Ringelblumenfluidextrakt

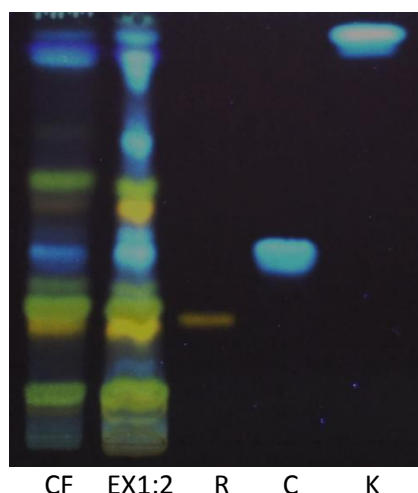
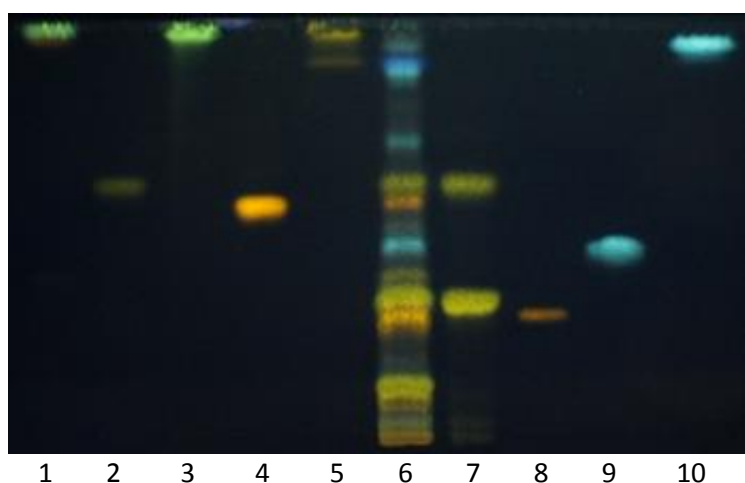


Abbildung 3: DC: Vergleich von *Calendulae flos* (CF) mit *Calendulae extractum fluidum* (EX 1:2); Referenzsubstanzen: Rutin (R), Chlorogensäure (C) und Kaffeesäure (K); nach dem Besprühen mit Nst. A/PEG 400 bei 366 nm; Bedingungen siehe S. 6 und S. 19

Bei der Wahl der Referenzlösungen kam es zu einer Änderung. Der Style Guides zur Erstellung von Monographien für das Europäische Arzneibuch (European Directorate for the Quality of Medicines, 2008) sieht zwei Substanzen zu Referenzzwecken vor, wobei eine einen Rf-Wert im unteren Drittel der Laufstrecke aufweisen sollte und die andere im oberen Drittel. Die Kaffeesäure wandert bei diesem Fließmittelsystem an die Fließmittelfront und ist daher als Referenzsubstanz nicht geeignet. Rutin und Chlorogensäure haben sehr ähnliche Rf-Werte, so dass eine Alternative für eine der beiden Referenzsubstanzen gesucht wurde. Dazu wurden unterschiedliche Flavonoide getestet. Bei Betrachtung des Chromatogramms (Abbildung 4) erscheinen Isorhamnetin-3-O-glucosid (Position 2), Isoquercitrin (Position 4) oder Isorhamnetin-3-O-rutinosid (Position 7) in Kombination mit Rutin ideal. Sie haben einen höheren Rf-Wert als Rutin und können im oberen Drittel des Chromatogramms detektiert werden, während Rutin einen niederen Rf-Wert hat und somit im unteren Drittel Laufstrecke liegt.



- 1.) Kämpferol
- 2.) Isorhamnetin-3-O-glucosid
- 3.) Isorhamnetin
- 4.) Isoquercitrin
- 5.) Quercetin
- 6.) EX (Fluidextrakt)
- 7.) Isorhamnetin-3-O-rutinosid
+ Isorhamnetin-3-O-glucosid
- 8.) Rutosid
- 9.) Chlorogensäure
- 10.) Kaffeesäure

Abbildung 4: DC: Findung der Referenzsubstanzen; nach dem Besprühen mit Nst. A/PEG 400 bei 366 nm; Bedingungen siehe S. 6 und S. 19

Ringelblumenfluidextrakt

Nachteil ist, dass Isoquercitrin und die Isorhamnetinderivate sehr teuer sind, weshalb die Entscheidung auf Hyperosid fiel. Hyperosid ist zwar nicht in der Ringelblume enthalten, hat aber einen geringfügig höheren Rf-Wert als die Chlorogensäure und befindet sich knapp unterhalb der im Fluidextrakt darauffolgenden orangen Bande. Zudem wird Hyperosid in vielen weiteren Arzneibuchmonographien als Referenzsubstanz bei der Dünnschichtchromatographie verwendet.

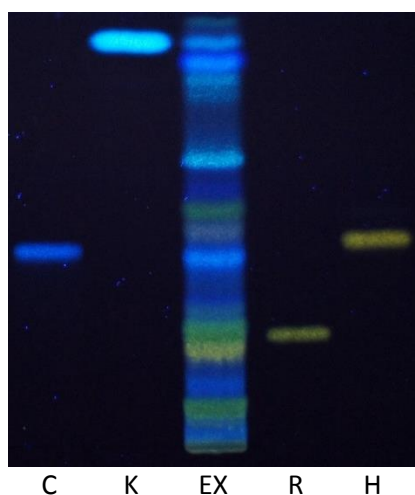


Abbildung 5: DC: Vergleich von Ringelblumenfluidextrakt (EX) mit Chlorogensäure (C), Kaffeesäure (K), Rutin (R) und Hyperosid (H); nach dem Besprühen mit Nst. A/PEG 400 bei 366 nm; Bedingungen siehe S. 6 und S. 19

Nachdem die Methode für die Identitätsprüfung feststand, wurden alle 9 Fluidextrakte chromatographiert (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7, Seite 22).

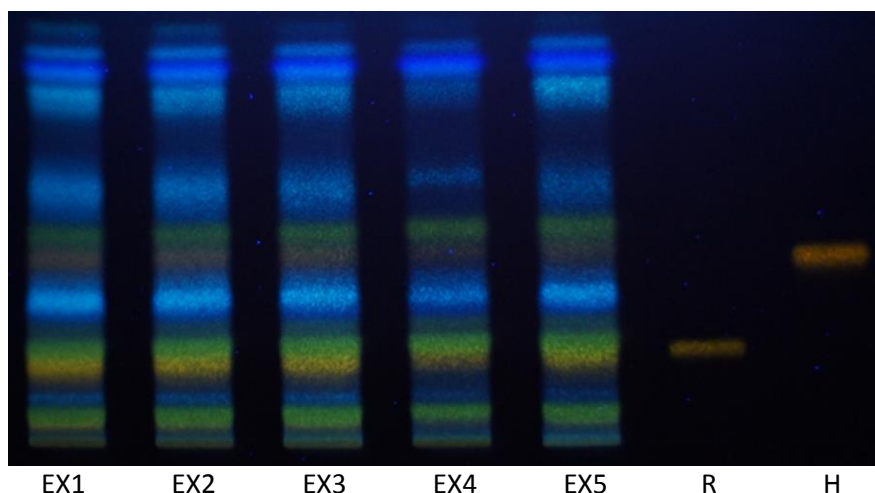


Abbildung 6: DC: Vergleich der Fluidextrakte EX1-EX5 mit Rutin (R) und Hyperosid (H); nach dem Besprühen mit Nst. A/PEG 400 bei 366 nm; Bedingungen siehe S. 6 und S. 19

Ringelblumenfluidextrakt

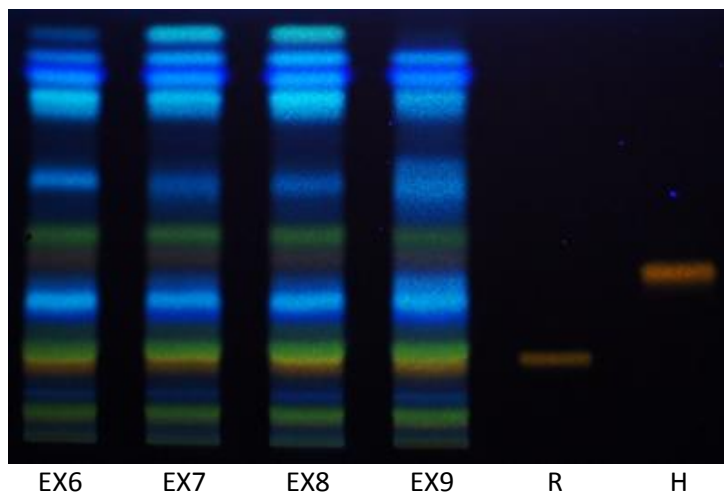


Abbildung 7: DC: Vergleich der Fluidextrakte EX6-EX9 mit Rutin (R) und Hyperosid (H); nach dem Besprühen mit Nst. A/PEG 400 bei 366 nm; Bedingungen siehe S. 6 und S. 19

Laut ÖAB kann die Identitätsprüfung mittels TLC oder HPTLC durchgeführt werden. Die HPTLC ist eine schnellere Methode als die TLC. Die HPTLC-Platten weisen eine geringere Körnchengröße als die der TLC auf, weshalb eine geringere Auftragemenge der Probe benötigt wird und die Laufstrecke kürzer ist. Da die Monographie *Calendulae flos* keine HPTLC vorsieht, mussten die Kenngrößen dafür neu ausgearbeitet werden. Zu diesem Zweck wurde die Auftragemenge für die Untersuchungslösung und die Referenzsubstanzen auf 2 µl reduziert, die Bandbreite auf 5 µm gekürzt und eine Laufstrecke von 8 cm festgelegt. Alle neun Extrakte mittels HPTLC chromatographiert zeigt die Abbildung 8.

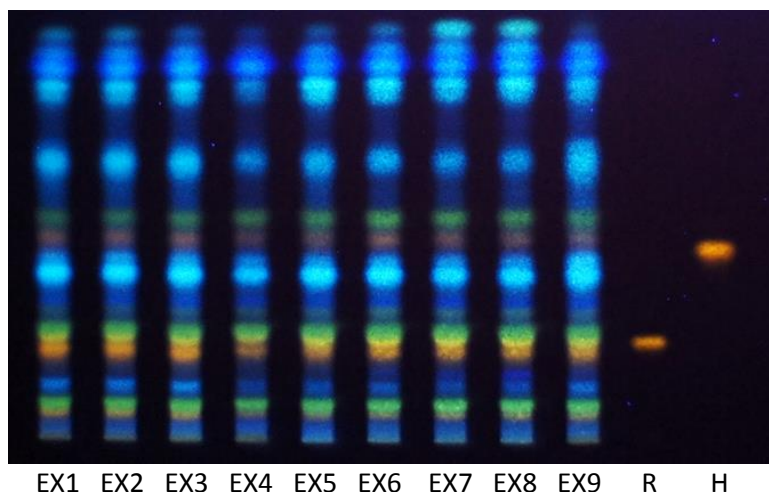


Abbildung 8: DC: Vergleich der Fluidextrakte EX1-EX9 mit Rutin (R) und Hyperosid (H); nach dem Besprühen mit Nst. A/PEG 400 bei 366 nm; Bedingungen siehe S. 6 und S. 19

Sowohl die TLC als auch die HPTLC weisen gleiche Fingerprints der neun analysierten Extrakte auf. Daher kann abschließend gesagt werden, dass die auf S. 19 ausgeführten Bedingungen zur Identifizierung von *Calendulae extractum fluidum* geeignet sind.

4.3.2 Alkoholgehalt

Die Alkoholgehaltsbestimmung erfolgte mittels Pyknometer laut Ph. Eur. (2.9.10). Pro Extrakt wurden drei Destillate angefertigt, deren Dichte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt wurde. Anhand der Dichte und der Temperatur ließ sich der Alkoholgehalt berechnen. Der Alkoholgehalt der 9 Fluidextrakte liegt zwischen 47,33 und 52,33 Prozent.

	Alkoholgehalt %								
	EX1	EX2	EX3	EX4	EX5	EX6	EX7	EX8	EX9
Tag 1	48,80	53,60	47,20	50,00	51,60	47,60	49,20	48,80	49,20
	50,00	52,40	48,00	50,80	51,20	47,20	48,80	48,40	50,00
	49,20	52,00	47,20	51,20	50,60	48,00	48,80	48,80	49,60
Tag 2	48,40	52,40	47,20	49,60	50,80	48,00	49,20	48,80	50,00
	49,60	52,00	46,80	49,60	50,40	47,60	48,40	49,60	49,20
	48,40	51,60	47,60	49,60	50,80	47,60	48,80	50,00	50,00
Mittelwert	49,07	52,33	47,33	50,13	50,90	47,67	48,87	49,07	49,67
Stabw.	0,60	0,63	0,38	0,64	0,40	0,27	0,27	0,55	0,36
rel. Stabw.	1,22	1,20	0,80	1,28	0,78	0,58	0,56	1,12	0,72

Tabelle 3: Übersicht der Alkoholgehaltbestimmung der Extrakte EX1-EX9

Zur Bestimmung des Alkoholgehalts sind folgende zwei Anmerkungen bezüglich des Pyknometers und des Destillats erforderlich:

- Die Dichte ist als Verhältnis von Masse zu Volumen definiert. Das Volumen ist am Pyknometer angegeben. Die Masse wird berechnet anhand der Differenz zwischen dem mit Destillat gefüllten Pyknometer und dessen Leergewicht. Um bei jeder Messung vom gleichen Leergewicht des Pyknometers zu starten und damit möglichst konstante Werte zu erzielen, wurde das Pyknometer nach jeder Messung gereinigt, im Trockenschrank getrocknet und für eine Stunde im Exsikkator aufbewahrt. Bei jeder darauffolgenden Messung wurde das Leergewicht des Pyknometers mit den vorhergehenden Werten verglichen, um sich einer konstanten Ausgangsmasse zu vergewissern.
- Wie in Abbildung 9 (Seite 24) erkennbar, war das Destillat leicht milchig und opaleszierend. Auf der Oberfläche schwammen Öltropfen, die keinesfalls in den Pyknometer gelangen

Ringelblumenfluidextrakt

durften, da sie die Wägung der Masse verfälschen. Um die Öltropfen zu umgehen, wurde mit einer Pipette das Destillat in das Pyknometer pipettiert.



Abbildung 9: Darstellung des leicht milchigen, opaleszierenden Destillats

4.3.3 Flavonoidgehalt

Die Vorproben wurden mit den Extrakten EX1-EX4 ausgeführt, da EX5-EX9 erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung standen.

Als Basis für die Gehaltsbestimmung galt die Vorschrift in der Arzneibuchmonographie *Calendulae flos* des Europäischen Arzneibuches:

Gehaltsbestimmung

Stammlösung: In einem 100-ml-Rundkolben werden 30 min lang 0,800 g pulverisierte Droge (500) (2.9.12), 1 ml einer Lösung von Methenamin *R* ($5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), 20 ml Aceton *R* und 7 ml Salzsäure *R* 1 zum Rückfluss erhitzt. Die Flüssigkeit wird durch einen Wattebausch in einen 100-ml-Messkolben filtriert. Der Wattebausch wird zum Rückstand im Rundkolben gebracht und der Inhalt des Kolbens 2-mal jeweils 10 min lang mit je 20 ml Aceton *R* zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Erkalten auf Raumtemperatur wird die Flüssigkeit durch einen Wattebausch filtriert. Alle Acetonauszüge werden vereinigt und durch ein Papierfilter in den Messkolben filtriert. Die Lösung wird mit Aceton *R*, das als Spülflüssigkeit für Kolben und Filter dient, im Messkolben zu 100,0 ml verdünnt. 20,0 ml dieser Lösung werden in einem Scheidetrichter mit 20 ml Wasser *R* versetzt. Die Mischung wird einmal mit 15 ml und 3-mal mit je 10 ml Ethylacetat *R* geschüttelt. Die Ethylacetatauszüge werden in einem Scheidetrichter vereinigt, 2-mal mit je 50 ml Wasser *R* gewaschen, durch 10 g wasserfreies Natriumsulfat *R* in einen Messkolben filtriert und mit Ethylacetat *R* zu 50,0 ml verdünnt.

Untersuchungslösung: 10,0 ml Stammlösung werden mit 1 ml Aluminiumchlorid-Reagenz *R* versetzt und mit einer 5-prozentigen Lösung (V/V) von Essigsäure 99 % *R* in Methanol *R* zu 25,0 ml verdünnt.

Kompensationsflüssigkeit: 10,0 ml Stammlösung werden mit einer 5-prozentigen Lösung (V/V) von Essigsäure 99 % *R* in Methanol *R* zu 25,0 ml verdünnt.

Die Absorption (2.2.25) der Untersuchungslösung wird nach 30 min bei 425 nm gegen die Kompensationsflüssigkeit gemessen.

Abbildung 10: Gehaltsbestimmung von *Calendulae flos* laut Ph. Eur. 7.0

Das wiederholte Filtrieren und Extrahieren war nicht notwendig, da es sich beim Fluidextrakt um eine klare Lösung handelt und nicht um eine Droge, wo wiederholtes Extrahieren mit frischem Lösungsmittel Sinn macht.

Ringelblumenfluidextrakt

Mit dieser den Erfordernissen angepassten Vorschrift wurde der Flavonoidgehalt bestimmt. Die Messungen erbrachten sehr niedere und unterschiedliche Werte, erkennbar an der großen relativen Standardabweichung (wie in Tabelle 4 in den weißen Spalten ersichtlich ist).

Laut Definition der Ph. Eur. 7.0/0765 sind Fluidextrakte „*flüssige Zubereitungen, von denen ... ein Masse- oder Volumteil einem Masseteil der getrockneten pflanzlichen Droge ... entspricht.*“ Da die Monographie *Calendulae flos* einen Mindestflavonoidgehalt von 0,40 % vorsieht, würde dies bedeuten, dass die zur Herstellung des Fluidextrakts verwendete Droge nicht dem Arzneibuch entsprechen würde.

Als Grund für diesen niedrigen Gehalt könnte eine unvollständige Säurehydrolyse sein. Deshalb wurde anfangs die Säurestärke von Salzsäure *R1* zu Salzsäure *R* erhöht und anschließend die Temperatur des Wasserbades von 70° auf 100° sowie die Länge der Hydrolysezeit von 30 min auf 45 min verändert.

	EX1		EX2		EX3		EX4	
	HCl <i>R</i>	HCl <i>R1</i>	HCl <i>R</i>	HCl <i>R1</i>	HCl <i>R</i>	HCl <i>R1</i>	HCl <i>R</i>	HCl <i>R1</i>
Flavonoidgehalt %	0,43	0,27	0,39	0,29	0,44	0,25	0,32	0,21
	0,41	0,22	0,41	0,35	0,46	0,31	0,31	0,16
	0,44	0,21	0,40	0,30	0,47	0,36	0,30	0,12
	0,43	0,34	0,40	0,21	0,45	0,22	0,30	0,19
Mittelwert	0,43	0,26	0,40	0,29	0,45	0,29	0,31	0,17
Stabw.	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,03
rel. Stabw.	3,19	20,25	1,96	17,79	2,40	18,93	1,68	20,35

Tabelle 4: Vergleich des Flavonoidgehalts bei Verwendung von HCl *R* und HCl *R1* bei der Säurehydrolyse

Ein deutlicher Unterschied war bei den Werten des Flavonoidgehalts unter Verwendung von Salzsäure *R* im Vergleich zu den vorhergehenden Bestimmungen, wo Salzsäure *R1* angewandt wurde, erkennbar. Der Flavonoidgehalt war deutlich höher und die Werte schwankten nicht mehr so stark, was zu einer geringeren Standardabweichung führte (siehe Tabelle 4, graue Spalten).

Infolgedessen wurde für die weiteren Bestimmungen Salzsäure *R* verwendet. Die Erhöhung der Temperatur und die Verlängerung der Hydrolysezeit brachten keine wesentliche Veränderung mit sich (siehe Tabelle 5, Seite 27).

Ringelblumenfluidextrakt

	EX1				EX2			
Temperatur	70°		100°		70°		100°	
Zeit	30 min	45 min	30 min	45 min	30 min	45 min	30 min	45 min
Flavonoidgehalt %	0,44	0,42	0,48	0,47	0,39	0,41	0,40	0,39
	0,43	0,42	0,46	0,44	0,41	0,42	0,40	0,42
Mittelwert	0,44	0,42	0,47	0,46	0,40	0,42	0,40	0,40
Stabw.	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01
rel. Stabw.	1,65	0,82	1,58	3,76	2,76	1,74	0,22	3,16

Tabelle 5: Vergleich des Flavonoidgehalts bei unterschiedlichen Hydrolysezeiten und Temperaturen des Wasserbades

Unter diesen neuen Bedingungen wurden alle neun Fluidextrakte analysiert. Es wurde an zwei Tagen jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt und aus den vier erhaltenen Werten der Mittelwert gebildet. Folglich liegt der Flavonoidgehalt der neun Extrakte zwischen 0,33 und 0,63 Prozent.

	Flavonoidgehalt %								
	EX1	EX2	EX3	EX4	EX5	EX6	EX7	EX8	EX9
	0,48	0,42	0,44	0,32	0,42	0,48	0,52	0,42	0,64
	0,46	0,39	0,45	0,31	0,41	0,49	0,55	0,43	0,65
	0,44	0,40	0,49	0,35	0,41	0,49	0,54	0,41	0,63
	0,42	0,40	0,49	0,36	0,42	0,50	0,53	0,40	0,62
Mittelwert	0,45	0,40	0,47	0,33	0,41	0,49	0,54	0,42	0,63
Stabw.	0,02	0,01	0,02	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
rel. Stabw.	4,58	2,59	5,13	6,56	1,16	1,77	2,23	2,70	1,79

Tabelle 6: Übersicht des Flavonoidgehalts der Extrakte EX1-EX9

4.3.4 High Performance Liquid Chromatography

Als mögliche Alternative zur spektrophotometrischen Gehaltsbestimmung wurde zusätzlich eine HPLC-Methode entwickelt. Die Expertengruppe des ÖAB hat sich allerdings für die spektrophotometrische Gehaltsbestimmung eingesetzt, weshalb die entwickelte HPLC-Methode nur für die Identifizierung von einigen Inhaltsstoffen verwendet wurde.

4.3.4.1 Entwicklung der Methode

Die HPLC-Analysen wurden mit einer Agilent BDS Hypersil C18-Säule (siehe 3.4, Seite 9) bei 25°C durchgeführt. Als mobile Phase dienten 2 Lösungsmittel, wobei die Flussrate 1 ml/min war:

Mobile Phase A: Wasser *R*, angesäuert mit Ameisensäure auf pH = 2,8

Mobile Phase B: Acetonitril, angesäuert mit demselben Äquivalent wie die mobile Phase A

Nach einiger Recherche (Marušek et al., 2010; Bilia et al., 2002; Bilia et al., 2001; Dissertation von Katharina Waldbauer, in Vorbereitung 2014) wurde folgender Lösungsmittelgradient erstellt:

Zeit (min)	A (% V/V)	B (% V/V)
0 - 5	95	5
5 - 15	84	16
15 - 45	75	25

Für die HPLC-Messung wurde 1 g Extrakt mit der mobilen Phase A auf 10 ml verdünnt. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl. Die Chromatogramme wurden mittels UV-Detektor bei 320 nm ausgewertet.

Ringelblumenfluidextrakt

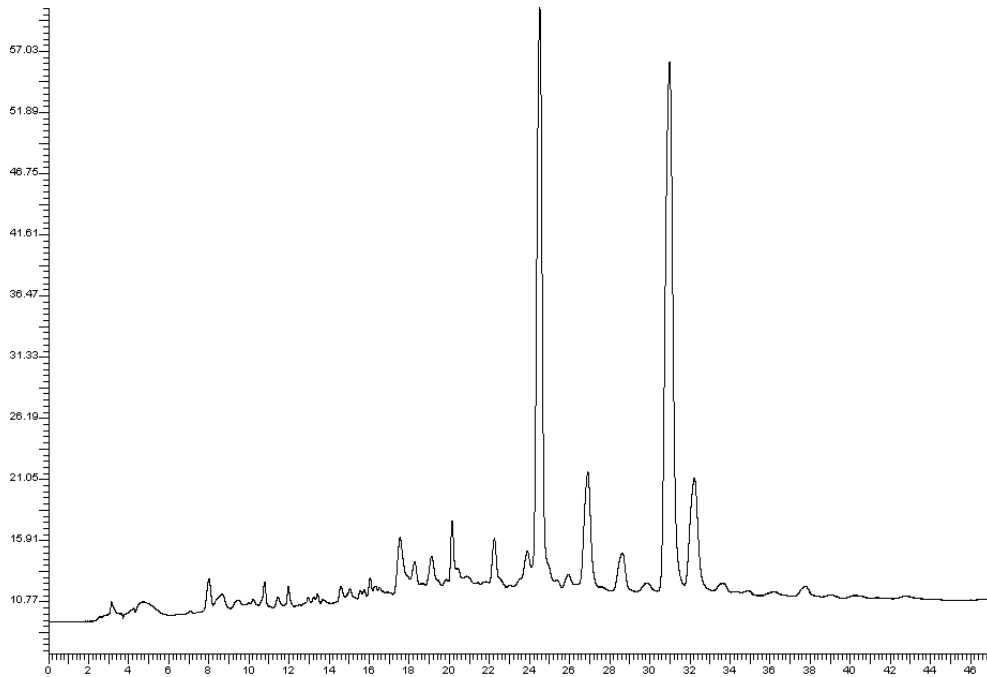


Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm von Extrakt EX1_1; Bedingungen siehe S. 9 und S. 28

Das erhaltene Chromatogramm EX1_1 (Abbildung 11) zeigt 2 Hauptpeaks und zahlreiche kleinere Peaks, die teilweise überlappen. Vor allem im Bereich 16 - 27 min ist nicht klar, um wie viele Substanzen es sich handelt. Um die Trennung der Substanzen in diesem Bereich zu verbessern, wurde der Gradient flacher gestaltet. Die Zusammensetzung der mobilen Phase war demnach folgende:

Zeit (min)	A (% V/V)	B (% V/V)
0 - 5	95	5
5 - 15	84	16
15 - 55	75	25

Wie im Chromatogramm EX1_2 (Abbildung 12, Seite 30) erkennbar, war durch die Veränderung des Gradienten ein weiterer Peak bei Minute 26 sichtbar.

Ringelblumenfluidextrakt

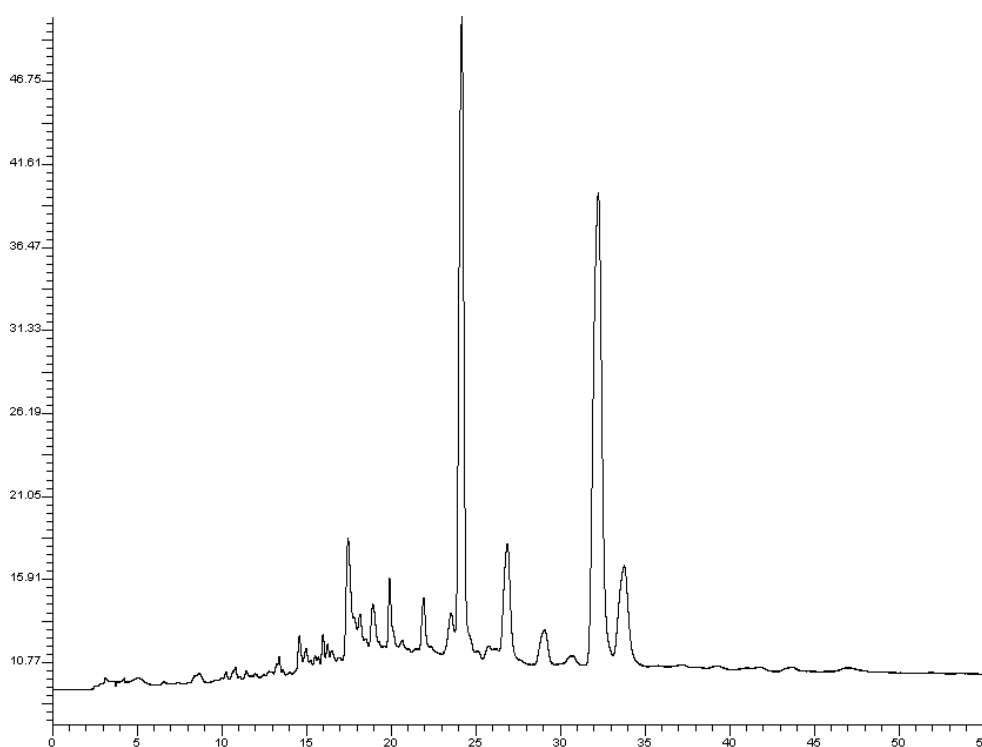


Abbildung 12: HPLC-Chromatogramm von Extrakt EX1_2; Bedingungen siehe S. 9 und S. 28

Um die Trennung weiter zu verbessern, wurde abermals der Gradient in diesem Bereich abgeflacht. Da im vorderen Teil des Chromatogramms (bei etwa 10 – 20 min) die Peaks immer noch nicht ausreichend getrennt waren, wurde ein weiterer Schritt im Lösungsmittelgradient eingeführt, um den Gradienten flacher zu gestalten:

Zeit (min)	A (% V/V)	B (% V/V)
0-5	95	5
5-15	90	10
15-25	84	16
25-85	75	25

Durch diesen zusätzlichen den Lösungsmittelgradienten abflachenden Schritt (B: 10%, 5 – 15 min) konnte die Peaktrennung verbessert werden.

Die Substanzen bei den Retentionszeiten zwischen 20 - 25 min und 27 - 42 min zeigen anscheinend eine sehr ähnliche Polarität, weshalb eine bessere Trennleistung in diesem Bereich nicht erzielt werden konnte. Positiv im Chromatogramm des Extraktes EX1_3 (Abbildung 13) zu bewerten ist, dass sich der Peak bei Minute 30 nun vollständig vom nachfolgenden Peak getrennt hat.

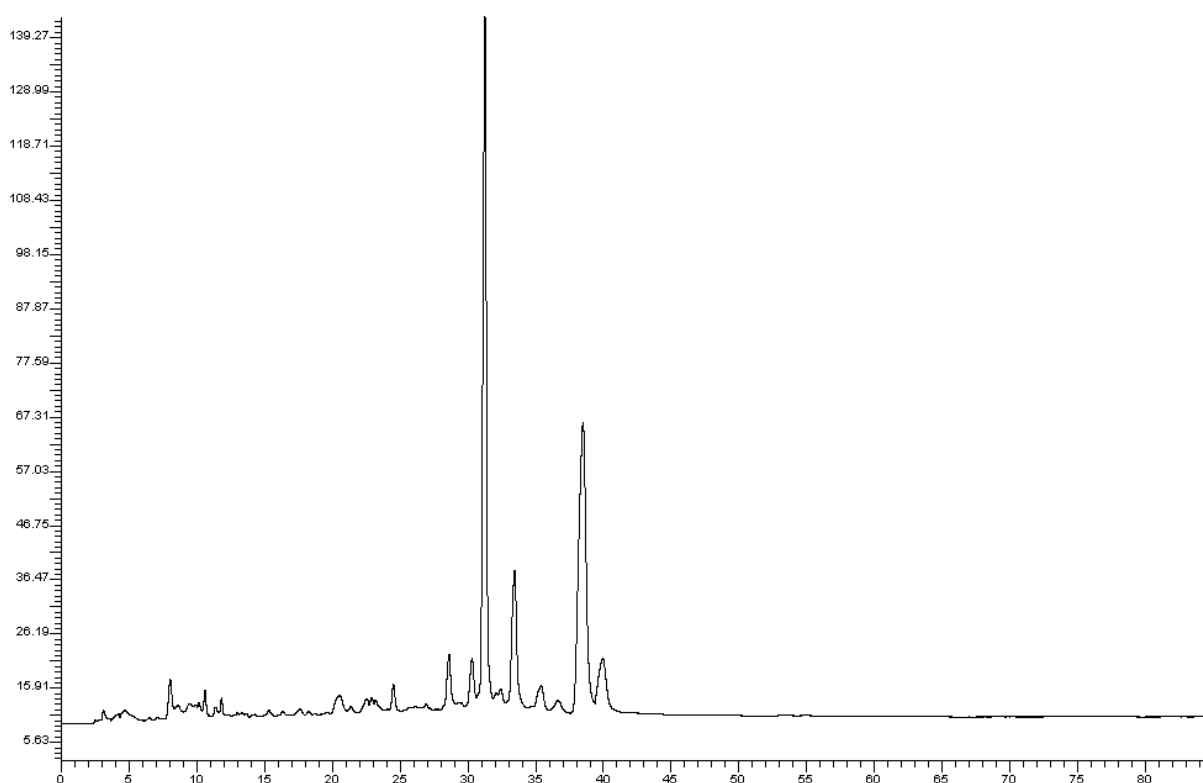


Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm von Extrakt EX1_3; Bedingungen siehe S. 9 und S. 28

In weiteren Versuchen wurde die Temperatur von 25 – 40°C variiert. Dabei konnte allerdings keine Verbesserung der Trennleistung oder Verschärfung der Peaks erreicht werden. Daher wurde die oben angeführte Methode für die Identifizierung der Inhaltsstoffe eingesetzt.

4.3.4.2 Identifizierung der Flavonoide

Die Identifizierung der Flavonoide erfolgte mittels LC-MS (vgl. Methode in Kapitel 4.3.4.1, Seite 28; MS-Bedingungen auf Seite 9). Diese Messung zeigt das Vorhandensein von 11 Flavonoiden (siehe Tabelle 7 und Abbildung 14, Seite 33) im Ringelblumenfluidextrakt. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch einen Spektrenvergleich mit einer universitätsinternen Spektrenbibliothek, die die MSⁿ Spektren von 57 Flavonoiden enthält.

Peak Nr.	[M-H] ⁻	[M+H] ⁺	vorgeschlagene Struktur	bekannte Inhaltsstoffe ²
1	755,3	757,3	Quercetin-O-(Hexosyl-O-Deoxyhexosyl)-O-Deoxyhexosid	Quercetin-3-O-rutinosylrhamnosid (Manghaslin)
2	609,2	611,2	Quercetin-O-Hexosyl-O-Deoxyhexosid	
3	739,3	741,3	Kaempferol(?) -O-(Hexosyl-O-Deoxyhexosyl)-O-Deoxyhexosid	
4	769,3	771,3	Isorhamnetin-O-(Hexosyl-O-Deoxyhexosyl)-O-Deoxyhexosid	Isorhamnetin-3-O-rutinosylrhamnosid (Typhaneosid)
5	755,3	757,3	Isorhamnetin(?) -O-(Hexosyl-O-Deoxyhexosyl)-O-Pentosid	
6	609,2	611,2	Quercetin-O-Hexosyl-O-Deoxyhexosid	Rutin
7	623,1	625,2	Isorhamnetin-O-Hexosyl-O-Deoxyhexosid	Isorhamnetin-3-O-nehesperidosid (Calendoflavosid)
8	609,1	611,2	Isorhamnetin-O-Hexosyl-O-Pentosid	
9	593,2	595,2	Kaempferol(?) -O-Hexosyl-O-Deoxyhexosid	
10	623,2	625,2	Isorhamnetin-O-Hexosyl-O-Deoxyhexosid	Isorhamnetin-3-O-rutinosid (Narcissin)
11	477,0	479,1	Isorhamnetin-O-Hexosid	Isorhamnetin-3-O-glucosid

Tabelle 7: Ergebnisse der MS-Analytik

² Matic et al. (2012); Bilia et al. (2002)

Ringelblumenfluidextrakt

Mittels HPLC wurden die Ergebnisse der LC-MS-Analyse überprüft und bestätigt: Die Flavonoide, deren Referenzsubstanzen im Labor vorhanden waren, konnten ihren Peaks zugeordnet werden. So wurden Rutin (Peak 6), Isorhamnetin-3-O-rutinosid (Peak 10) und Isorhamnetin-3-O-glucosid (Peak 11) identifiziert. Neben diesen drei Flavonoiden wurde auch die Chlorogensäure (Peak a) und Kaffeesäure (Peak b) mit Hilfe von authentischen Referenzsubstanzen identifiziert.

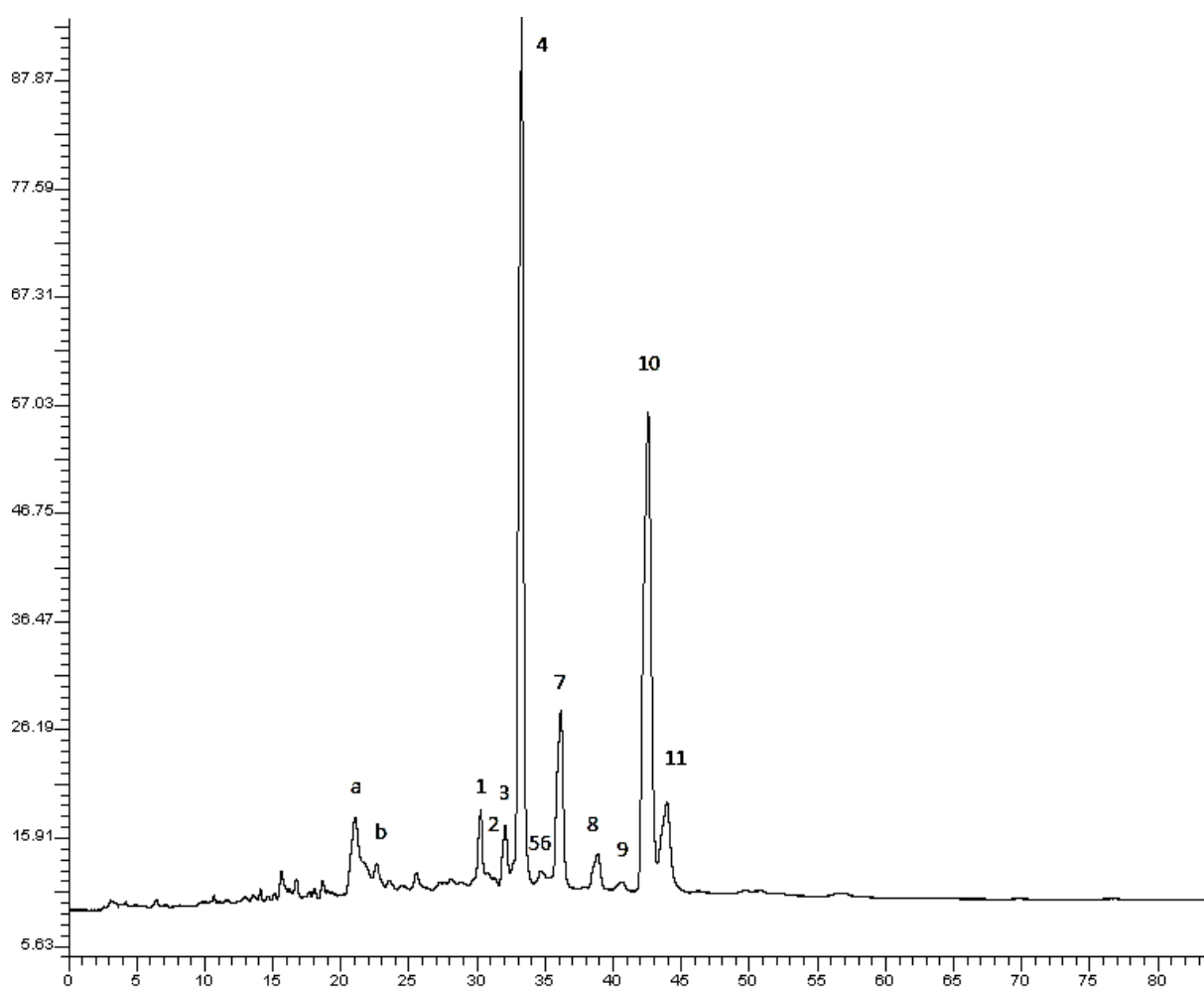


Abbildung 14: Zuordnung der Peaks den Substanzen, die mittels LC-MS vermutet wurden

Die Identifizierung erfolgte an Hand der Retentionszeit und „Spiking“-Experimenten. Für jede Referenzsubstanz wurde eine Stammlösung mit Methanol in der Konzentration von 1 mg/ml hergestellt, die für die Analysenlösung 1:20 mit Methanol verdünnt wurde. Dieselbe Verdünnung mit Fluidextrakt diente als Probenlösung. Die folgenden beiden Chromatogramme (Abbildung 15, Seite 34 und Abbildung 16, Seite 35) zeigen dies anhand von Isorhamnetin-3-O-rutinosid.

Ringelblumenfluidextrakt

Das Chromatogramm (Abbildung 15) zeigt im Hintergrund den Fluidextrakt (blau) und im Vordergrund Isorhamnetin-3-O-rutinosid (pink). Bei der Retentionszeit von 43 min überschneidet die pinke Linie des Isorhamnetin-3-O-rutinosid die blaue Linie des Fluidextraktes, der ebenfalls bei der Retentionszeit von 43 min einen Peak zeigt. Daher kann man annehmen, dass der Peak, der bei Minute 43 im Fluidextrakt sichtbar ist, Isorhamnetin-3-O-rutinosid ist.

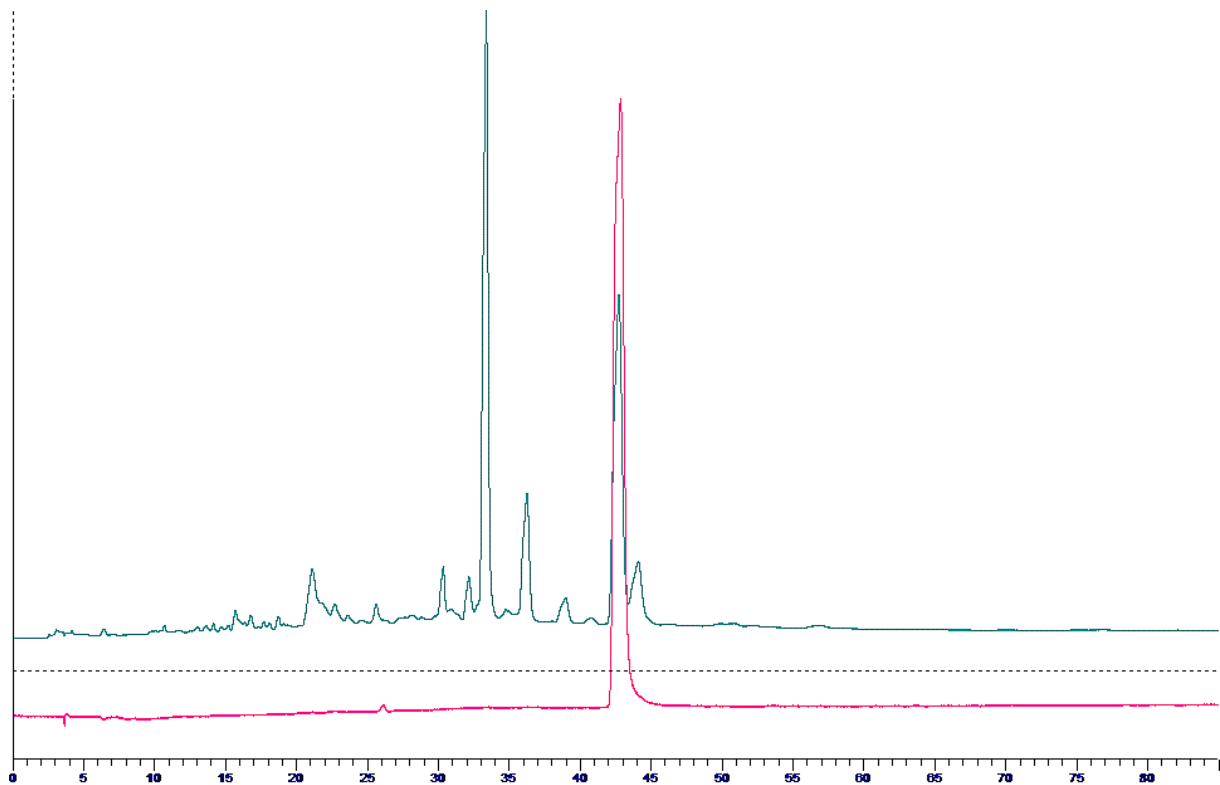


Abbildung 15: Chromatogramm von Fluidextrakt (blau) und Isorhamnetin-3-O-rutinosid (pink)

Bestätigt wird diese Annahme im darauffolgenden Chromatogramm (Abbildung 16, Seite 35). Wiederum ist das Chromatogramm im Hintergrund (blau) jenes des Fluidextraktes. Im Vordergrund befindet sich das orange Chromatogramm des Fluidextraktes, dem Isorhamnetin-3-O-rutinosid zugesetzt worden ist. Bei Minute 43 zeigt das orange Chromatogramm einen sehr hohen Peak, der den genau darüber liegenden Peak im blauen Chromatogramm überschneidet. Im Größenvergleich der beiden sich überschneidenden Peaks überragt der orange Peak (Fluidextrakt + Isorhamnetin-3-O-rutinosid) den blauen (Fluidextrakt) bei Weitem. Daraus kann man schließen, dass es sich bei diesem Peak im orangen Chromatogramm um Isorhamnetin-3-O-rutinosid handelt, das dem Fluidextrakt zugesetzt wurde.

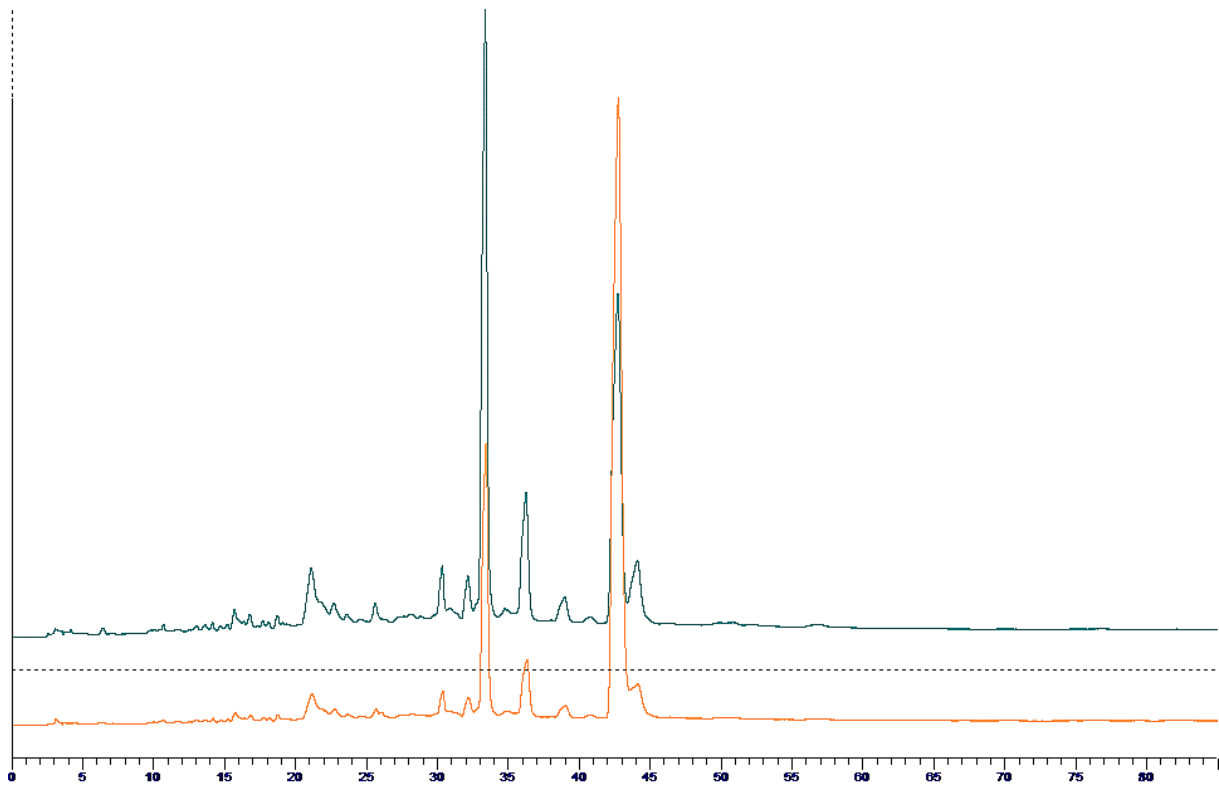


Abbildung 16: Chromatogramm Fluidextrakt (blau) und Fluidextrakt+Isorhamnetin-3-O-rutinosid (orange)

Das Ergebnis der Identifizierung mittels HPLC stimmt mit der LC-MS-Messung überein, so dass der Peak Nr. 10 (Abbildung 14, Seite 33) als Isorhamnetin-3-O-rutinosid identifiziert werden konnte.

Die Identifizierung von Rutin, Isorhamnetin-3-O-glucosid, Chlorogensäure und Kaffeesäure erfolgte analog (siehe Anhang Seite 60 ff).

4.4 Diskussion

Der Ringelblumenfluidextrakt wird in der neuen ÖAB-Monographie *Calendulae extractum fluidum* als gelbbraune klare Flüssigkeit beschrieben. Zur Identifizierung reicht dies allerdings nicht aus. Daher wird die Dünnschichtchromatographie zur Identitätsprüfung herangezogen. Dieses Verfahren ist schnell und einfach und kann auch in Apotheken eingesetzt werden, um die Identität eines Extrakts zu überprüfen. Der Ringelblumenextrakt weist ein charakteristisches Bandenmuster, das in dem Monographievorschlag (Seite 37 ff) detailliert ausgeführt wird, auf.

Bei der Reinheitsprüfung wird unter anderem der Alkoholgehalt bestimmt. Dies ist wichtig, um festzustellen, ob der Fluidextrakt im Nachhinein mit Wasser oder Ethanol verdünnt wurde oder durch falsche Lagerung Lösungsmittel verdampft ist. Die Alkoholgehaltsbestimmung mittels Dichtebestimmung kann aufgrund des geringen apparativen Aufwandes auch in Apotheken durchgeführt werden. Der Alkoholgehalt der untersuchten Extrakte lag zwischen 47,33 und 52,33 %. Von der Expertenkommission des ÖAB wurde kein Grenzwert für den Alkoholgehalt gefordert, sondern festgelegt, dass der Alkoholgehalt 95 bis 105 % der in der Beschriftung angegebenen Menge sein muss. Zur Herstellung des Ringelblumenfluidextraktes darf allerdings nur Ethanol 50 bis 70 % (V/V) verwendet werden.

Zur Reinheitsprüfung gehört auch die Bestimmung von Methylalkohol und iso-Propylalkohol, was allerdings nicht ausgeführt wurde, da die Firmen, die den Ethanol zur Herstellung eines Fluidextraktes liefern, bereits deklarieren müssen, dass die beiden genannten Alkohole nicht im Ethanol enthalten sind.

Bei der Gehaltsbestimmung wird der Flavonoidgehalt mittels eines spektrophotometrischen Verfahrens bestimmt. Er lag bei fast allen Extrakten zwischen 0,40 und 0,50%. Extrakt EX3 weist nur 0,33% Flavonoide auf, hingegen die Extrakte EX7 0,54 % und EX9 sogar 0,63 %. Infolgedessen legte die Expertenkommission des ÖAB einen Mindestflavonoidgehalt von 0,30 % fest.

Eine Gehaltsbestimmung mittels HPLC wäre aufgrund der teuren Geräte in Apotheken undenkbar. Zudem verfügt die Ringelblume über ein großes Spektrum an Flavonoiden, dessen Auftrennung sich nicht als einfach erwies. Die in der Diplomarbeit entwickelte Methode stellt zwar beinahe alle Flavonoide als Einzelpeaks dar, allerdings liegen diese dennoch nahe beieinander und zeigen teilweise Überlagerungen, so dass eine Quantifizierung dadurch erschwert wird.

Folgender Monographievorschlag wurde der ÖAB-Expertengruppe präsentiert:

Ringelblumenfluidextrakt
Calendulae extractum fluidum
Extractum Calendulae fluidum

Definition

Der aus **Ringelblumenblüten** (*Calendulae flos*) hergestellte Fluidextrakt

Gehalt: mindestens 0,30 Prozent Flavonoide, berechnet als Hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$; M_r 464,4)

Herstellung:

Der Fluidextrakt wird aus der Droge unter Verwendung von Ethanol 50 bis 70 % (*V/V*) nach einem geeigneten Verfahren hergestellt.

Eigenschaften

Aussehen: klare, gelbbraune Flüssigkeit

Löslichkeit: mischbar unter Trübung mit Wasser und Ethanol 96%, löslich in Ethanol 70 % (*V/V*)

Prüfung auf Identität

Dünnschichtchromatographie (2.2.27):

Untersuchungslösung: Fluidextrakt

Referenzlösung: 2,5 mg Rutosid *R* und 2,5 mg Hyperosid *R* werden in 10 ml Methanol *R* gelöst

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

Fließmittel: Wasser *R*, wasserfreie Ameisensäure *R*, Ethylacetat *R* (10:10:80 *V/V/V*)

Auflagen: 10 μl ; bandförmig (15 mm) [oder 2 μl ; bandförmig (5 mm)]

Laufstrecke: 10 cm [oder 8 cm]

Trocknen: bei 100 bis 105°C

Detektion: Die Platte wird mit einer Lösung von Diphenylboryloxyethylamin *R* ($10\text{ g} \cdot l^{-1}$) in Methanol *R* und anschließend mit einer Lösung von Macrogol 400 *R* ($50\text{ g} \cdot l^{-1}$) in Methanol *R* besprüht. Die Platte wird 30 min an der Luft trocknen gelassen. Die Auswertung erfolgt im ultravioletten Licht bei 365 nm.

Ergebnis: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen der Referenzlösung und der Untersuchungslösung ist aus der nachstehenden Abbildung ersichtlich. Im Chromatogramm der Untersuchungslösung können weitere Zonen vorhanden sein.

Ringelblumenfluidextrakt

Oberer Plattenrand	
Hyperosid: eine orange fluoreszierende Zone	eine blau fluoreszierende Zone eine blau fluoreszierende Zone grün fluoreszierende Zone eine orange fluoreszierende Zone
Rutosid: eine orange fluoreszierende Zone	eine blau fluoreszierende Zone eine grün fluoreszierende Zone eine orange fluoreszierende Zone eine grün fluoreszierende Zone eine orange fluoreszierende Zone
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Alkoholgehalt (2.9.10): 95 bis 105 Prozent der in der Beschriftung angegebenen Menge

Methylalkohol, iso-Propylalkohol (2.9.11): Höchstens 0,05 Prozent (V/V) Methanol und höchstens 0,05 Prozent (V/V) iso-Propylalkohol

Gehaltsbestimmung

Stammlösung: In einem 100-ml-Rundkolben werden 30 min lang 0,800 g Fluidextrakt, 1 ml einer Lösung von Methenamin *R* ($5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), 20 ml Aceton *R* und 7 ml Salzsäure *R* zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Erkalten auf Raumtemperatur wird die Flüssigkeit mit Aceton *R*, das als Spülflüssigkeit für den Kolben dient, im Messkolben zu 100,0 ml verdünnt.

20,0 ml dieser Lösung werden in einem Scheidetrichter mit 20 ml Wasser *R* versetzt. Die Mischung wird einmal mit 15 ml und 3-mal mit je 10 ml Ethylacetat *R* geschüttelt. Die Ethylacetatauszüge werden in einem Scheidetrichter vereinigt, 2-mal mit je 50 ml Wasser *R* gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat *R* getrocknet, in einen Messkolben filtriert und mit Ethylacetat *R* zu 50,0 ml verdünnt.

Untersuchungslösung: 10,0 ml Stammlösung werden mit 1 ml Aluminiumchlorid-Reagenz *R* versetzt und mit einer 5-prozentigen Lösung (V/V) von Essigsäure 99 % *R* in Methanol *R* zu 25,0 ml verdünnt.

Kompensationsflüssigkeit: 10,0 ml Stammlösung werden mit einer 5-prozentigen Lösung (V/V) von Essigsäure 99 % *R* in Methanol *R* zu 25,0 ml verdünnt.

Ringelblumenfluidextrakt

Die Absorption (2.2.25) der Untersuchungslösung wird nach 30 min bei 425 nm gegen die Kompensationsflüssigkeit gemessen.

Der Prozentgehalt an Flavonoiden wird als Prozentgehalt an Hyperosid nach folgender Formel berechnet:

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

Die spezifische Absorption $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ von Hyperosid beträgt 500.

A = Absorption bei 425 nm

m = Einwaage des Fluidextraktes in Gramm

Lagerung

Vor Licht geschützt, in dicht schließenden Gefäßen.

5 Senegawurzelfluidextrakt

5.1 *Polygala senega* (L.) und *Polygala tenuifolia* (Willd.)

Polygala senega (L.) ist in Nordamerika weit verbreitet. Sie wächst in trockenen, lichten Wäldern vom Winnipegsee über Südkanada bis Tennessee und Nordkarolina. Zu den im gemäßigten Asien bis Sibirien beheimateten Polygalaarten zählt *Polygala tenuifolia* (Willd.) (Blaschek, 2007). Sie ist billiger als *Polygala senega* (L.) und wird deshalb gerne als *Polygalae radix* verwendet, da die Ph. Eur. als Droge *Polygala senega* (L.) und einige eng verwandte Arten zulässt.

Das Spektrum an Inhaltsstoffe ist bei *Polygala senega* (L.) und *Polygala tenuifolia* (Willd.) sehr ähnlich:

Triterpensaponine:

Die Triterpensaponine sind ein Gemisch aus bidesmosidischen Estersaponinen vom Oleanolsäuretyp, deren Aglykon das Presenegenin ist. Befindet sich in Position 3 eine O-glykosidische Bindung mit einer β -D-Glucopyranose, spricht man vom Tenuifolin. Die vom Tenuifolin abgeleiteten Saponine unterscheiden sich in der Zuckerkette in Position C28 sowie im Methoxyierungsgrad und der räumlichen Anordnung des Zimtsäurerestes, der mit der Zuckerkette verestert ist. Zu den Triterpensaponinen von *Polygala senega* (L.) gehören *E*, *Z*-Senegasaponine A, B und C, die Senegine II (siehe Abbildung 17, Seite 42), III und IV, die ebenfalls als *E*, *Z*-Isomere vorliegen, sowie Desacylsenegasaponine und – senegin, wobei Senegin II die Hauptkomponente darstellt. Die Triterpensaponine von *Polygala tenuifolia* (Willd.) sind Onjisaponine A – G, *E*, *Z*-Onjisaponin H, Onjisaponine V-Z und Vg (Klein et al., 2012; Blaschek, 2007; Sakuma et al., 1981).

Kohlenhydrate:

Beide Polygalaarten enthalten Oligosaccharide. Die Senegosen A-O der *Polygala senega* (L.) (siehe Abbildung 17, Seite 41) können mit Essig-, Benzoe-, *p*-Cumar- und Ferulasäuren verestert sein. Bei *Polygala tenuifolia* (Willd.) spricht man von den Tenuifoliosen A-P. Sie liegen als Oligosaccharidmultiester mit Sinapinsäure und 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure vor. Weiterens kommt sowohl in der *Polygala senega* (L.) als auch in der *Polygala tenuifolia* (Willd.) Polygalit (= 1,5-Anhydrosorbit) vor. Aus einem wasserlöslichen Extrakt von *Polygala tenuifolia* (Willd.) isolierte man fünf weitere Komponenten namens Polygalatenoside A-E. In *Polygala tenuifolia* (Willd.) kommen auch mehrfach methoxylierte Xanthone vor, die unterschiedliche C- und O- Glykoside aufweisen. Je nachdem handelt es sich in der Wurzel um die Polygalaxanthone III- VII (siehe Abbildung 17, Seite 42) (Klein et al., 2012; Blaschek, 2007; Hegnauer, 1969).

Ätherisches Öl:

Aus der Wurzel Droge von *Polygala senega* (L.) wurde ätherisches Öl mit 230 Komponenten isoliert. Hauptsächlich enthielt es Carbonsäuren, v.a. Hexansäure und Methylsalicylat, aber auch Hexanal und Kresol. Zudem fand man fettes Öl, das der älteren Droge einen ranzigen Geruch verleiht. Eine ähnliche Zusammensetzung hatte das ätherische Öl der *Polygala tenuifolia* (Willd.), das als Hauptkomponenten neben den Carbonsäuren auch Aldehyde und Alkohole wie Hexanal, E,E-2,4-Decadienal und Amylalkohol enthielt (Blaschek, 2007).

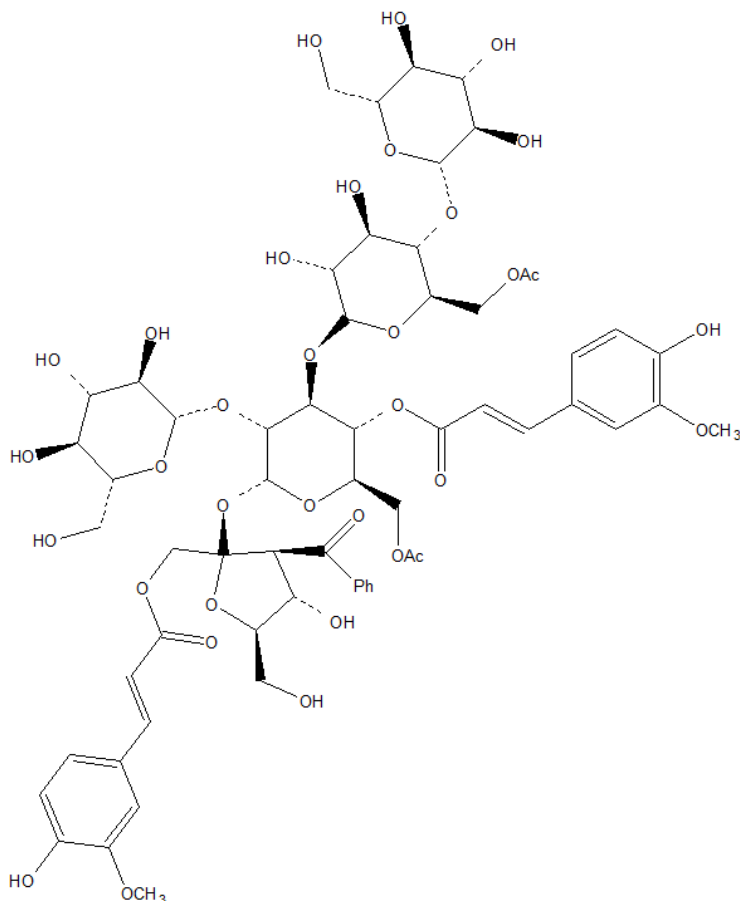
Alkaloide:

Polygala tenuifolia (Willd.) enthält Spuren von Alkaloiden, wobei man aus den Wurzeln β -Carbolinalkaloide isolierte (Blaschek, 2007).

Flavonoide:

Sowohl in *Polygala senega* (L.) als auch in *Polygala tenuifolia* (Willd.) wurden Flavonoide gefunden. Dabei handelt es sich v.a. um Isorhamnetin- und Quercetinderivate (Shi et al., 2013; Blaschek, 2007).

Senegose A aus *Polygala senega* (L.)



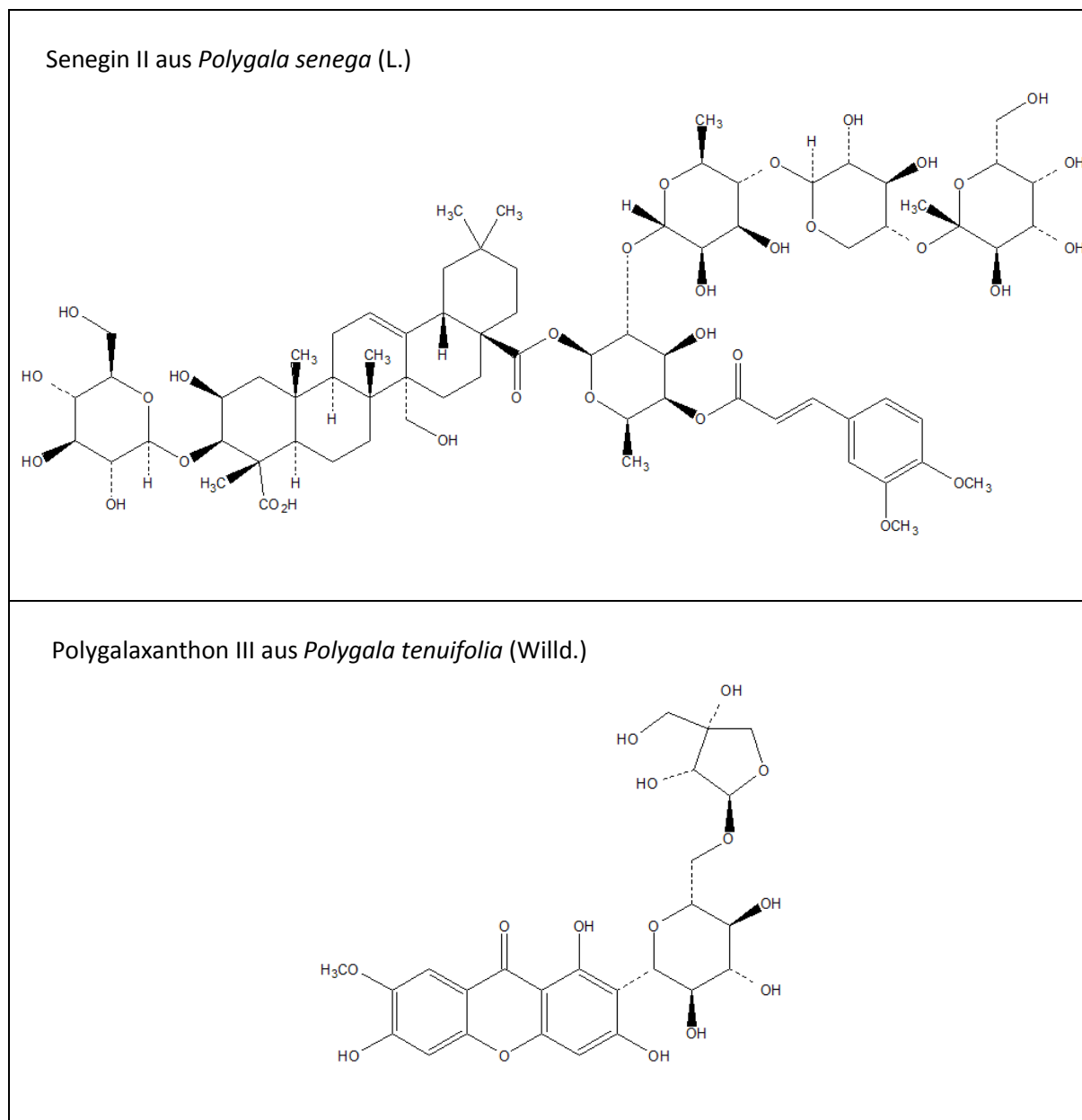


Abbildung 17: Inhaltsstoffe von *Polygala senega* (L.) und *Polygala tenuifolia* (Willd.)

Aufgrund ihrer Inhaltsstoffe finden *Polygala senega* (L.) und *Polygala tenuifolia* (Willd.) Anwendung als Expectorans bei Katarrhen der oberen Luftwege, chronischer Bronchitis und Pharyngitis. Für die sekretolytische Wirkung sind die Saponine verantwortlich. Es kommt zu einer lokalen Reizung der Schleimhaut, die reflektorisch die Bronchialsekretion anregen (Blaschek, 2007).

Unterstützend wirkt die antiinflammatorische Wirkung der beiden Polygalaarten. Ein wässriger Extrakt aus der Wurzel von *Polygala tenuifolia* (Willd.) hemmte die durch Substanz P und Lipopolysaccharid hervorgerufene Sekretion von IL-1 und TNF- α in Astrozyten (Klein et al., 2012).

Bei einem in-vitro-Test mit einer murinen Makrophagenzelllinie konnte durch unterschiedliche Fraktionen von *Polygala senega* (L.) eine signifikante Reduktion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α gezeigt

werden. Nur die phenolische Fraktion führte zu einer Erhöhung der IL-6-Spiegel, was vielleicht eine mögliche Stimulierung des Immunsystems bedeutet. Schon in früheren Studien wurde auf das Potential von *Polygala senega* (L.) hingewiesen, die spezifische Immunantwort zu erhöhen (Van et al., 2009). Estrada et al. (2000) verglichen in vivo zwei hämolytisch aktive Saponinfraktionen von *Polygala senega* (L.) mit einer Saponinfraktion aus *Quillaja saponaria*, die häufig als Adjuvans verwendet wird. Als Versuchstiere dienten mit Ovalbumin beimpfte Mäuse und mit Rotavirus infizierte Hennen. Beide Senegafraktionen verursachten einen ähnlich erhöhten Spiegel an IgG-Antikörpern wie die Saponine von *Quillaja saponaria* und waren zudem weniger toxisch als letztere.

Bei *Polygala tenuifolia* (Willd.) wurde ebenfalls die adjuvante Wirkung untersucht. Die Onjisaponine A, E, F und G verbesserten im Tierversuch mit Mäusen die Wirksamkeit von Influenza- und DPT-Impfstoffen. Drei Wochen nach Behandlung mit dem Influenzaimpfstoff zeigten die Tiere erhöhte Titer vom hämagglutinationshemmenden Antikörper und des nasalen IgA-Antikörpers im Vergleich zur Kontrollgruppe, die den Impfstoff ohne Adjuvans erhielten. Ähnliche Ergebnisse wiesen die mit DPT-Impfstoff behandelten Mäuse auf. Ihre Titer von Serum-IgG-Antikörpern und nasalen IgA-Antikörpern waren im Gegensatz zur Vergleichsgruppe ebenfalls erhöht (Lacaille-Dubois et al., 2005).

Im Tierversuch mit Mäusen zeigte *Polygala senega* (L.) eine antidiabetische Wirkung. Senegin II hielt 4 bis 10 h nach der Applikation den Blutzuckerspiegel niedrig, während die Wirkung der Positivkontrolle Tolbutamid im Lauf der 10 h vollständig nachließ (Kako et al., 1995).

Des Weiteren stellte man bei Auszügen von *Polygala senega* (L.) eine antitumorale und antiangiogenetische Wirkung fest. Sowohl in vivo, wo durch Benzo[a]pyren das Wachstum eines Lungenkarzinoms bei Mäusen induziert wurde, als auch bei in vitro Versuchen mit Adenokarzinomzellen der Lunge führte der Wurzelextrakt von *Polygala senega* (L.) zur Apoptose (Paul et al., 2010). Um das Wachstum eines Tumors aufrechtzuerhalten ist der Prozess der Angiogenese erforderlich. *Polygala senega* (L.) kann dies unterdrücken. Arai et al. (2011) zeigten, dass Senegasaponine eine antiproliferative Wirkung auf menschliche Endothelzellen aus der Nabelschnurvene haben, wofür die 28-C-Glykosideinheit und der Methoxyzimtsäurerest essentiell sind.

Polygala tenuifolia (Willd.) wird in der traditionellen chinesischen Medizin zur Behandlung von Amnesie, Insomnie und Angstzuständen eingesetzt. Die Wirkung der Pflanze auf das ZNS wurde zahlreich untersucht. So führte ein ethanolischer Extrakt von *Polygala tenuifolia* (Willd.) zur Abnahme von ATP, zur Hemmung des Lactatanstiegs und der Lipidperoxidation, was darauf hindeutet, dass er postischämische neuronale Nekrosen abschwächt und die Hirnschäden während der Ischämie und der Reperfusion reduziert. Des Weiteren zeigten Oligosaccharide von *Polygala tenuifolia* (Willd.) eine

antidepressive Wirkung. 3,6'-Disinapolysaccharose führte zur Senkung der Serumspiegel von Cortisol, ACTH und CRH und Polygalatenoside A und B hemmten den Transport und die Wiederaufnahme von Norepinephrin. Es gibt mehrere Studien, die den Zusammenhang von *Polygala tenuifolia* (Willd.) und der Verbesserung des Erinnerungsvermögens und Alzheimer untersuchten. Durch Scopolamin induzierte kognitive Beeinträchtigung konnte mit einem Wurzelextrakt von *Polygala tenuifolia* (Willd.) rückgängig gemacht werden. Zudem kam es zur Reduktion des Zelltodes, der durch Glutamat, Amyloid- β -Protein und C-terminales Fragment des Amyloidpräkursorproteins induziert wird, und zur Hemmung der Acetylcholinesterase (Klein et al., 2012).

Nach dieser Gegenüberstellung von *Polygala senega* (L.) und *Polygala tenuifolia* (Willd.) kann man sagen, dass die beiden Arten hinsichtlich ihrer pharmakologischen Wirkung sehr ähnlich sind. In ihrer Zusammensetzung des Inhaltsstoffspektrum kann man sie hingegen mittels Dünnschichtchromatographie eindeutig unterscheiden, aber auch Drogen, die als Verfälschung im Handel bekannt sind, differenzieren (siehe Kapitel 5.2, Seite 45).

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die Arbeitsvorschrift (siehe Kapitel 3.1, Seite 6) wurde dem vorangegangenen Report, den die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kopp für die Europäische Arzneibuchkommission erstellt hat, übernommen.

In diesem Report wurden bereits Unterschiede zwischen *Polygala senega* (L.) und *Polygala tenuifolia* (Willd.) ausgearbeitet, die bei der Identifizierung der Proben von *Polygalae radix* zu Hilfe genommen wurden. Abbildung 18 zeigt eine Dünnschichtchromatographie aus diesem Report, wobei die Unterschiede, die im späteren genauer ausgeführt werden, schwarz markiert wurden. Auf den Positionen 01 und 02 befinden sich die Chromatogramme von *Polygala tenuifolia* (Willd.), während auf den Positionen 03 und 04 die von *Polygala senega* (L.) zu sehen sind. Die Positionen 05 und 06 zeigen die Verfälschung *Glinus oppositifolius* und auf Position 07 sind die Referenzsubstanzen Ammoniumglycyrrhizat und Saccharose sichtbar.

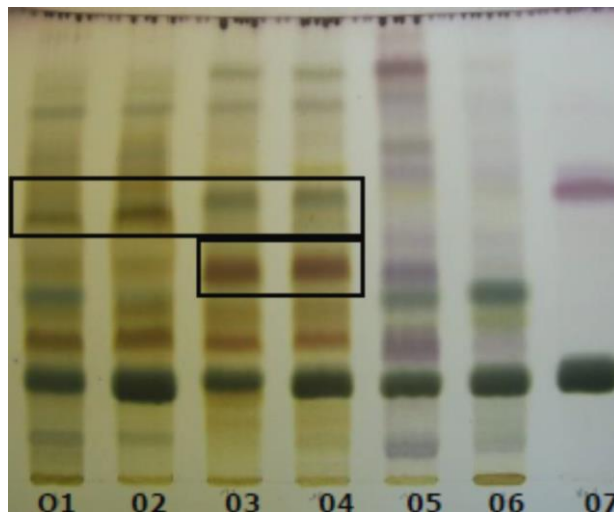


Abbildung 18: DC aus dem Report: Vergleich von *Polygala senega* (L.), *Polygala tenuifolia* (Willd.) und *Glinus oppositifolius*

In diesem Report wurden schon verschiedene Proben der zwei Polygalaarten untersucht und deren Probenliste wurde fortgesetzt. Daher beginnt die Probennummerierung mit RS24. Im Folgenden (Abbildung 19, Seite 46 und Abbildung 20, Seite 47) werden die Chromatogramme von RS24 bis RS38 gezeigt:

Senegawurzelfluidextrakt

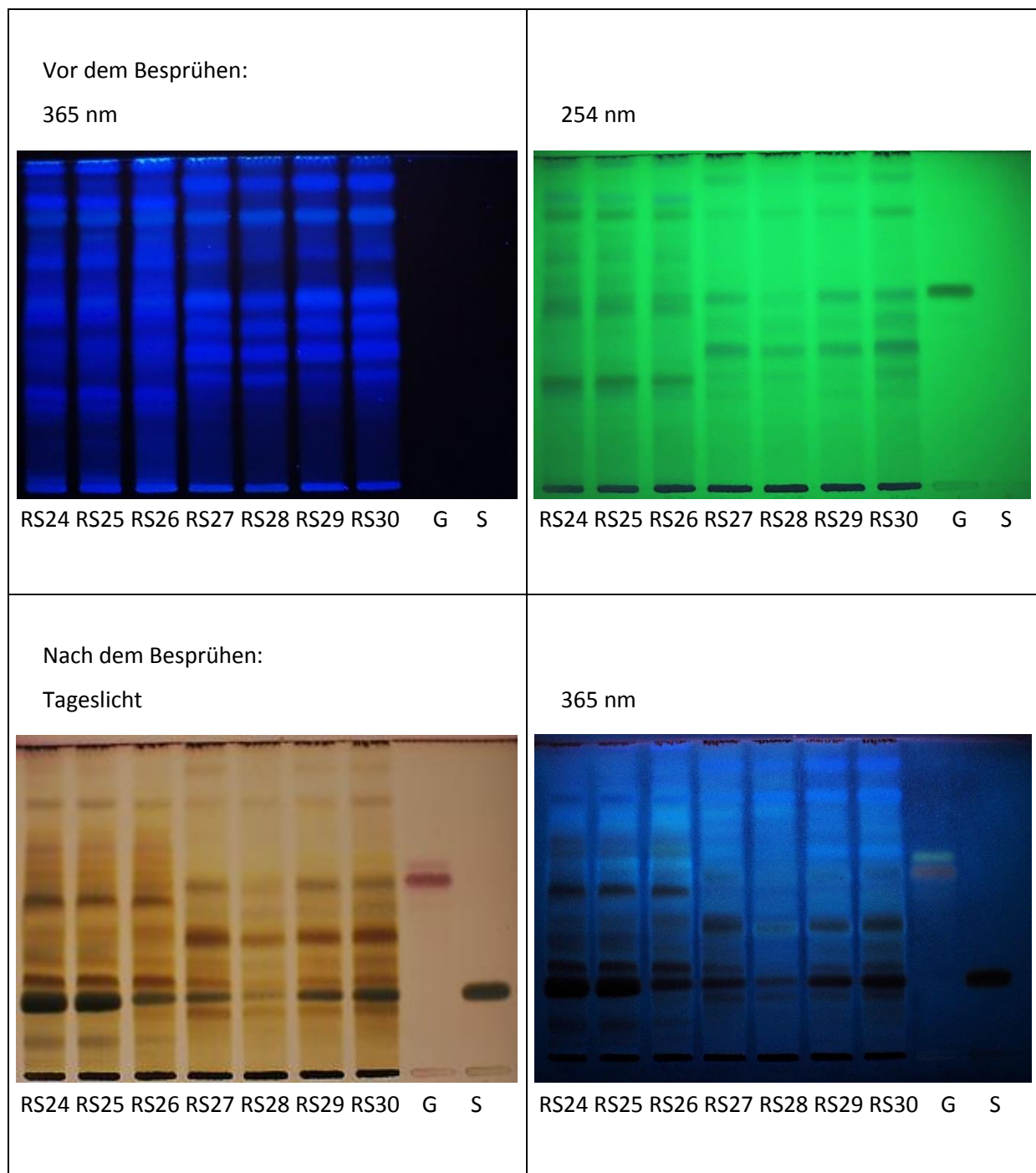


Abbildung 19: DC der Probenmuster: RS24-RS30, Ammoniumglycyrrhizat (G) und Saccharose (S) als Referenzsubstanzen; Sprühreagenz: Anisaldehydreagenz R; Bedingungen siehe S. 6

Senegawurzelfluidextrakt

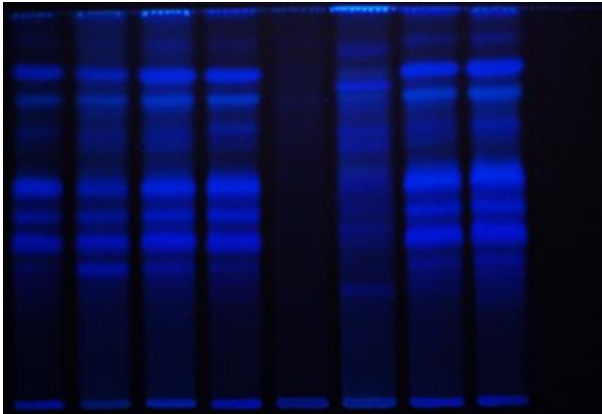
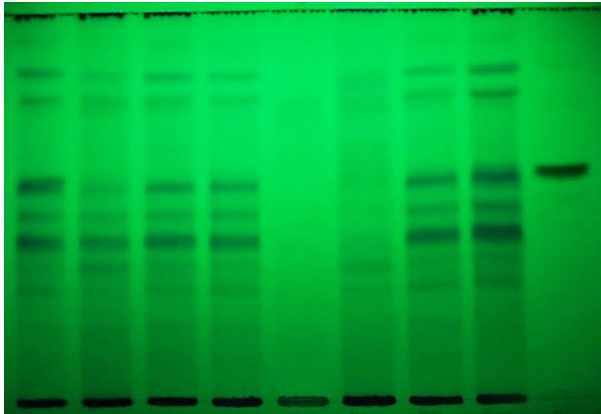
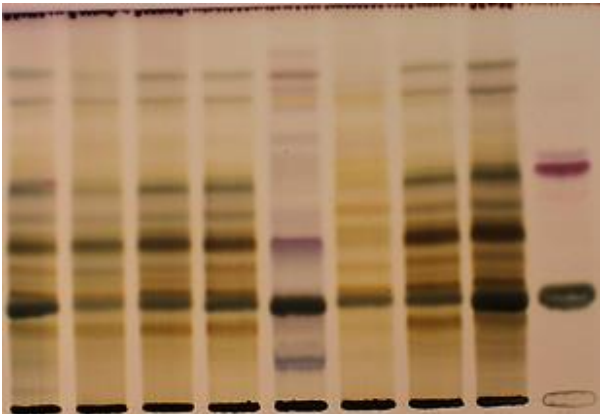
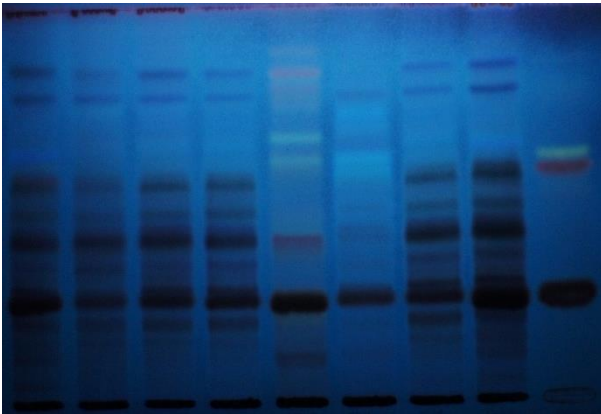
Vor dem Besprühen: 365 nm  RS31 RS32 RS33 RS34 RS35 RS36 RS37 RS38 G/S	254 nm  RS31 RS32 RS33 RS34 RS35 RS36 RS37 RS38 G/S
Nach dem Besprühen: Tageslicht  RS31 RS32 RS33 RS34 RS35 RS36 RS37 RS38 G/S	365 nm  RS31 RS32 RS33 RS34 RS35 RS36 RS37 RS38 G/S

Abbildung 20: DC der Probenmuster: RS31-RS38, Ammoniumglycyrrhizat (G) und Saccharose (S) als Referenzsubstanzen; Sprühreagenz: Anisaldehydreagenz R, Bedingungen siehe S. 6

Senegawurzelfluidextrakt

Am besten erkennbar sind die Unterschiede von *Polygala senega* (L.) und *Polygala tenuifolia* (Willd.) bei Tageslicht nach dem Besprühen der Platte mit Anisaldehydreagenz.

Beim Rf-Wert der Saccharose (in Abbildung 21 gelb markiert) ist bei beiden Arten eine starke dunkelgrüne Bande zu sehen und knapp darüber folgt eine rotbraune Bande. Bei *Polygala senega* (L.) ist eine weitere rotbraune Bande (in Abbildung 21 rot markiert) bei einem Rf-Wert zwischen Saccharose und Ammoniumglycyrrhizat vorhanden. Bei *Polygala tenuifolia* (Willd.) fehlt diese Bande. Einen weiteren Unterschied (in Abbildung 21 hellblau markiert) zeigt sich beim Rf-Wert des Ammoniumglycyrrhizats: Während bei *Polygala senega* (L.) auf gleicher Höhe eine grüne Bande zu sehen ist, erkennt man bei der *Polygala tenuifolia* (Willd.) eine rot-grüne Bande, die sich allerdings unterhalb des Ammoniumglycyrrhizats befindet.

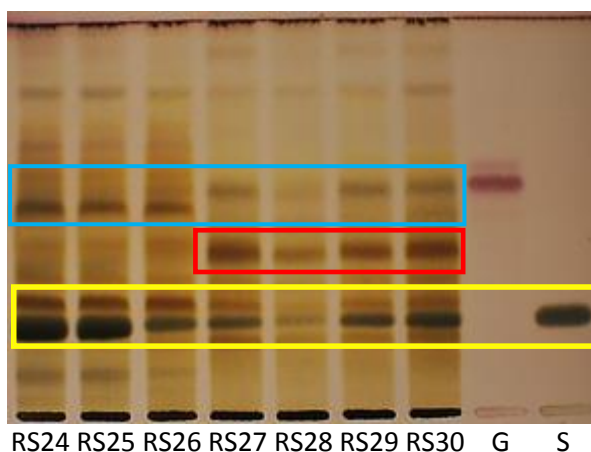


Abbildung 21: DC: Vergleich *Polygala tenuifolia* Willd.(RS24-RS26) und *Polygala senega* L. (RS27-RS30) nach dem Besprühen mit Anisaldehydreagenz R bei Tageslicht, Bedingungen siehe S. 6

Die Verfälschung *Glinus oppositifolius* (RS35) ist einfach zu erkennen (siehe Abbildung 20, Seite 47). Schon vor dem Besprühen mit Anisaldehydreagenz sind bei 365 nm und 254 nm kaum Banden erkennbar. Nach dem Besprühen mit Anisaldehydreagenz sieht man bei Tageslicht eine starke dunkelgrüne Bande beim Rf-Wert der Saccharose. Alle übrigen Banden haben eine violette Färbung, die weder im Chromatogramm von *Polygala senega* (L.), noch von *Polygala tenuifolia* (Willd.) detektierbar sind.

Senegawurzelfluidextrakt

Aufgrund der Unterscheidungsmerkmale und mit Hilfe des Reportes von Frau Prof. Kopp konnte folgende Zuordnung der Polygala-Proben vorgenommen werden:

Abkürzung	Identifizierung
RS24	Polygala tenuifolia
RS25	Polygala tenuifolia
RS26	Polygala tenuifolia
RS27	Polygala senega
RS28	Polygala senega
RS29	Polygala senega
RS30	Polygala senega
RS31	Polygala senega
RS32	Polygala senega
RS33	Polygala senega
RS34	Polygala senega
RS35	Glinus oppositifolius
RS36	Polygala tenuifolia (?)
RS37	Polygala senega
RS38	Polygala senega

Tabelle 8: Identifizierung der Proben RS24-RS38

Bei Probe RS36 empfiehlt es sich eine mikroskopische Betrachtung vorzunehmen, um über die Identität der Droge Gewissheit zu bekommen.

5.2.2 Diskussion

Nach dem Erstellen der Dünnschichtchromatogramme konnten die Unterscheidungsmerkmale von *Polygala senega* (L.) und *Polygala tenuifolia* (Willd.), die die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kopp ausgearbeitet hat, bestätigt werden. Mittels Dünnschichtchromatographie kann man klar feststellen, um welche der beiden Arten es sich bei einer Wurzelprobe handelt oder ob eine Verfälschung vorliegt. Die Dünnschichtchromatographie ist eine einfache und schnelle Methode, um Proben zu untersuchen und zu identifizieren und ist insofern gut in Apotheken anwendbar.

Sarah Kruderer wird im Zuge ihrer Diplomarbeit die Drogen mikroskopisch untersuchen, Unterschiede und Gemeinsamkeiten feststellen und weitere Informationen sammeln, um die Monographie für den Senegafluidextrakt zu erstellen (Sarah Kruderer, Diplomarbeit, Universität Wien, in Vorbereitung)

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war einerseits die Erstellung der Arzneibuchmonographie *Calendulae extractum fluidum* für das ÖAB und andererseits die Identifizierung unterschiedlicher Proben von *Polygalae radix*, dessen Information für die Erarbeitung der Arzneibuchmonographie *Senegae extractum fluidum* für das ÖAB benötigt werden.

Die Anwendung der Ringelblume bei unterschiedlichen Hautkrankheiten und Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes zeigt lange Tradition in der Volksmedizin und viele Arzneimittel aus der Pflanze werden auch heute noch in diesen Bereichen zahlreich angewandt. Zudem zeigt die Studienlage der letzten Jahre rege Forschungsarbeit an der Ringelblume, was die Aufnahme des Flüssigextraktes dieser Pflanze ins ÖAB rechtfertigt.

Der Schwerpunkt der praktischen Arbeit lag in der Sammlung der verschiedenen Analysedaten und Entwicklung der Methoden, um die Monographie *Calendulae extractum fluidum* zu gestalten. Dafür standen 9 Ringelblumenfluidextrakte unterschiedlicher Lieferanten zur Verfügung. Die Prüfung auf Identität erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie, deren Vorlage die Monographie *Calendulae flos* aus dem Europäischen Arzneibuch war. Der Ringelblumenfluidextrakt weist ein sehr charakteristisches Bandenmuster auf. Alle 9 Proben zeigten gleiche Fingerprints auf den Dünnschichtchromatographien.

Für die Reinheitsprüfung wurde der Alkoholgehalt mittels Dichte laut Ph. Eur. (2.9.10) bestimmt. Der Alkoholgehalt der 9 Proben lag zwischen 47,33 und 52,33 Prozent.

Für die Gehaltsbestimmung wurde mit Hilfe einer abgeänderten Methode von *Calendulae flos* aus der Ph. Eur. der Gesamtflavonoidgehalt spektrophotometrisch bestimmt. Von den 9 Proben betrug er 0,33 bis 0,63 Prozent. Zusätzlich wurde auch eine HPLC-Methode entwickelt, die anfänglich zur Gehaltsbestimmung dienen sollte. Nachdem die ÖAB-Kommission sich allerdings dagegen ausgesprochen hat, wurde sie zur Identifizierung der Hauptinhaltsstoffe verwendet. Anhand der im Zuge der Diplomarbeit erhaltenen Daten wurde eine Methode zur Identitätsprüfung entwickelt, die Grenzwerte des Alkoholgehalts festgelegt und ein Mindestgehalt an Flavonoiden bestimmt.

Der zweite Teil der Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Unterscheidung verschiedener Proben von *Polygalae radix*, was als Vorarbeit für die Erstellung der Monographie *Senegae extractum fluidum* dient. Die Identifizierung von 15 Proben erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Mit dieser Methode kann man klar feststellen, ob die Wurzeldroge von *Polygala senega* (L.) oder *Polygala tenuifolia* (Willd.) oder gar von einer Verfälschung wie *Glinus oppositifolius* stammt.

7 Summary

The aim of this diploma thesis was on the one hand the establishment of the monograph *Calendulae extractum fluidum* for the Austrian Pharmacopoeia and on the other hand the identification of different samples from *Polygalae radix*, as pilot test for the development of the monograph *Senegae extractum fluidum* for the Austrian Pharmacopoeia.

The application of marigold in the treatment of different skin diseases and disorders of the gastrointestinal tract has a long tradition in folk medicine and different formulations of this plant are frequently used in the treatment of the above-mentioned diseases. In addition, as numerous scientific studies over the last years have shown, there is an active research interest in the marigold, which justifies the entry of the liquid extract of this plant in the Austrian Pharmacopoeia.

The focus of the practical work was the development of methods for the monograph *Calendulae extractum fluidum* and the collection of various analysis data. For the investigations 9 samples of marigold fluid extract from different suppliers were available. Their identity was proven through thin layer chromatography (TLC) using TLC parameters of the monograph *Calendulae flos* of the European Pharmacopoeia as template. The marigold fluid extract has a very characteristic fingerprint. All 9 samples were identified as *Calendulae extractum fluidum*.

Purity was assessed by measuring the ethanolic content of the preparations according to the European Pharmacopoeia (2.9.10). The ethanol content of the 9 samples ranged from 47,33 to 52,33 per cent. For quantitative analysis, the total flavonoid content was measured spectrophotometrically. Therefore, the method of *Calendulae flos* from the European Pharmacopoeia was adapted to be used for the fluid extract. The 9 samples showed a total flavonoid content of 0,33 to 0,63 per cent. Additionally, a HPLC method was developed, which could be used for the quantification of the flavonoids, but the expert group of Austrian Pharmacopoeia decided to use the spectrophotometrically determination of the total flavonoid content for the quantification.

In accordance to the collected data, a draft of the monograph *Calendulae extractum fluidum* was prepared that is going to be published in the Austrian Pharmacopoeia.

The second part of this diploma thesis was the prework for a following diploma thesis, in which a draft for the monograph *Senegae extractum fluidum* should be prepared. Therefore the identity of 15 samples of *Polygala radix* was tested via TLC. All samples were identified as either *Polygala senega* (L.), *Polygala tenuifolia* (Willd.) or *Glinus oppositifolius*.

8 Literaturverzeichnis

- Arai M., Hayashi A., Sobou M., Ishida S., Kawachi T., Kotoku N., Kobayashi M. (2011), Anti-angiogenic effect of triterpenoidal saponins from *Polygala senega*, *Journal of Natural Medicines* 65: 149–156
- Bakó E., Deli J., Tóth G. (2002), HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 53: 241–250
- Bashir S., Janbaz K. H., Jabeen Q., Gilani A. H. (2006), Studies on Spasmogenic and Spasmolytic Activities of *Calendula officinalis* Flowers, *Phytotherapy Research* 20: 906–910
- Bauer K. H., Frömming K., Führer C. (2012), *Pharmazeutische Technologie: mit Einführung in die Biopharmazie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. 9 Auflage, S. 642, 644
- Bilia A. R., Salvani D., Mazzi G., Vincieri F. F. (2001), Characterization of *Calendula* Flower, Milk-Thistle Fruit, and Passion Flower Tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS, *Chromatographia* 53: 210-215
- Bilia A. R., Bergonzi M. C., Gallori S., Mazzi G., Vincieri F. F. (2002), Stability of the constituents of *Calendula*, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30: 613–624
- Blaschek W. (Hrsg.) (2007), *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, Band 3, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, S.552 ff, 1023 ff
- Chakraborty G. S., Majee A. R. (2011), Antidiabetic and antihyperlipidaemic effect of hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis*, *International Research Journal of Pharmacy* 2(1): 61-65
- Duran V., Matic M., Jovanović M., Mimica N., Gajinov Z., Poljacki M., Boza P. (2005), Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers, *International Journal of Tissue Reactions* 27 (3):101-106
- Estrada A., Katselis G. S., Laarveld B., Barl B. (2000), Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L., *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 23: 27-43
- Europäisches Arzneibuch (2011), 7. Auflage, Verlag Österreich GmbH, S. 378 ff, 1034, 1844 ff, 1863 ff
- European Directorate for the Quality of Medicines (2008), *Style Guide*, European Pharmacopoeia
- Hegnauer R. (1969), *Chemotaxonomie der Pflanzen V*, Birkhäuser Verlag Basel, S. 357

Literaturverzeichnis

- Isaac O. (1992). Die Ringelblume: Botanik, Chemie, Pharmakologie, Toxikologie, Pharmazie und therapeutische Verwendung ; Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 5, 23 ff, 35, 46, 69, 97, 98
- Jiménez-Medina E., Garcia-Lora A., Paco L., Algarra I., Collado A., Garrido F. (2006), A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation, BMC Cancer 6: 119
- Kako M., Miura T., Usami M., Nishiyama Y., Ichimaru M., Moriyasu M., Kato A. (1995), Effect of Senegin-II on Blood Glucose in normal and NIDDM mice, Biological & Pharmaceutical Bulletin 18(8): 1159-1161
- Kalvatchev Z., Walder R., Garzaro D. (1997), Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers, Biomedicine & Pharmacotherapy 51: 176-180
- Kaškonienė V., Kaškonas P., Jalinskaitė M., Maruška A. (2011), Chemical Composition and Chemometric Analysis of Variation in Essential Oils of *Calendula officinalis* L. during Vegetation Stages, Chromatographia 73(1): 163–169
- Klein Júnior L. C., de Andrade S. F., Cechinel V. (2012), A Pharmacognostic Approach to the Polygala Genus: Phytochemical and Pharmacological Aspects, Chemistry & Biodiversity 9: 181-209
- Kneipp S., Reile B. (Hrsg.) (1935), Das große Kneippbuch: ein Volksbuch für Gesunde und Kranke, Verlag Kösel und Pustet, München, S. 959 ff
- Korzh A. P., Gur'ev A. M., Belousov M. V., Yusubov M.S., Belyanin M. L. (2012), Composition of water soluble polysaccharides from *Calendula officinalis* L. flowers, Pharmaceutical Chemistry Journal 46(4): 219-221
- Lacaille-Dubois M., Mitaine-Offer A. (2005), Triterpene saponins from Polygalaceae, Phytochemistry Reviews 4: 139–149
- Madaus G. (1976), Lehrbuch der biologischen Heilmittel Band I, Georg Olms Verlag Hildesheim, S. 779 ff
- Maruška A., Proscavicius J., Bimbraitė-Survilienė K., Kornysheva O., Ragažinskienė O., Ratautaitė V. (2010), Comparison of phytochemical composition of medicinal plants by means of chromatographic and related techniques, Procedia Chemistry 2: 83–91
- Matić I. Z., Juranić Z., Šavikin K., Zdunić G., Nađvinski N., Gođevac D. (2012), Chamomile and Marigold Tea: Chemical Characterization and Evaluation of Anticancer Activity, Phytotherapy Research
Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/ptr.4807

- Muley B. P., Khadabadi S. S., Banarase N. B. (2009), Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8(5): 455-465
- Neukirch H., D'Ambrosio M., Dalla Via J., Guerriero A. (2004), Simultaneous Quantitative Determination of Eight Triterpenoid Monoesters from Flowers of 10 Varieties of *Calendula officinalis* L. and Characterisation of a New Triterpenoid Monoester, *Phytochemical Analysis* 15: 30–35
- Okoh O. O., Sadimenko A. A., Afolayan A. J. (2007), The effects of Age on Yield and Composition of the Essential Oils of *Calendula officinalis*, *Journal of Applied Sciences* 7(23): 3806-3810
- Österreichisches Arzneibuch (2013), Bundesministerium für Gesundheit, Verlag Österreich GmbH, S. 3, 36
- Paul S., Mandal S. K., Bhattacharyya S. S., Boujedaini N., Khuda-Bukhsh A. R. (2010), *In Vitro* and *In Vivo* Studies Demonstrate Anticancer Property of Root Extract of *Polygala senega*, *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 3(3): 188–196
- Piccaglia R., Marotti M., Chiavari G., Gandini N. (1997), Effects of Harvesting Date and Climate on the Flavonoid and Carotenoid Contents of Marigold (*Calendula officinalis* L.), *Flavour and Fragrance Journal* 12: 85-90
- Preethi K. C., Kuttan G., Kuttan R. (2009), Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action, *Indian Journal of Experimental Biology* 47: 113-120
- Preethi K. C., Kuttan R. (2009), Hepato and reno protective action of *Calendula officinalis* L. flower extract, *Indian Journal of Experimental Biology* 47: 163-168
- Roopashree T. S., Raman Dang, Shobha Rani R. H., Narendra C. (2008), Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*, *International Journal of Applied Research in Natural Products* 1(3): 20-28
- Sakuma S., Shoji J. (1981), Studies on the Constituents of the Root of *Polygala tenuifolia* WILLDENOW. I. Isolation of Saponins and the Structures of Onjisaponins G and F, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 29(9): 2431-2441
- Shahidi S., Mahmoodi M., Farahmandlou N. (2012), Antinociceptive Properties of Hydro-Alcoholic Extract of *Calendula officinalis* in Rat, *Basic and Clinical Neuroscience* 3(5): 45-48

Literaturverzeichnis

- Shi T., Li Y., Jiang Y., Tu P. (2013), Isolation of flavonoids from the aerial parts of *Polygala tenuifolia* Willd. and their antioxidant activities, *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 22: 36–39
- Singh M. Kr., Sahu P., Nagori K., Dewangan D., Kumar T., Alexander A., Badwaik H., Tripathi D. K. (2011), Organoleptic properties *in-vitro* and *in-vivo* pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn: An over review, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3(4): 655-663
- Shivasharan B. D., Nagakannan P., Thippeswamy B. S., Veerapur V. P. (2013), Protective Effect of *Calendula officinalis* L. Flowers Against Monosodium Glutamate Induced Oxidative Stress and Excitotoxic Brain Damage in Rats, *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 28(3): 292–298
- Van Q., Nayak B.N., Reimer M., Jones P.J.H., Fulcher R.G., Rempel C.B. (2009), Anti-inflammatory effect of *Inonotus obliquus*, *Polygala senega* L., and *Viburnum trilobum* in a cell screening assay, *Journal of Ethnopharmacology* 125: 487–493
- Voigt R. (2000), *Pharmazeutische Technologie, Für Studium und Beruf*, 9. Auflage, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart, S. 445 ff, 623
- Waldbauer K. (2014), Dissertation, Univ. Wien, in Vorbereitung
- Yoshikawa M., Murakami T., Kishi A., Kageura T., Matsuda H. (2001) Medicinal Flowers. III. Marigold. (1): Hypoglycemic, Gastric Emptying Inhibitory, and Gastroprotective Principles and New Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides, Calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49(7) 863—870
- Zitterl-Eglseer K., Reznicek G., Jurenitsch J., Novak J., Zitterl W., Franz C. (2001), Morphogenetic Variability of Faradiol monoesters in Marigold *Calendula officinalis* L., *Phytochemical Analysis* 12: 199–201

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herkunft, Batch-Nummer und Ablaufdatum der Ringelblumenfluidextrakte.....	2
Tabelle 2: Nähere Details zu den Wurzeldrogen von <i>Polygalae radix</i>	3
Tabelle 3: Übersicht der Alkoholgehaltbestimmung von EX1-EX9.....	23
Tabelle 4: Vergleich des Flavonoidgehalts bei Verwendung von HCl <i>R</i> und HCl <i>R1</i> bei der Säurehydrolyse	26
Tabelle 5: Vergleich des Flavonoidgehalts bei unterschiedlichen Hydrolysezeiten und Temperaturen des Wasserbades.....	27
Tabelle 6: Übersicht des Flavonoidgehalts von EX1-EX9.....	27
Tabelle 7: Ergebnisse der MS-Analytik	32
Tabelle 8: Identifizierung der Proben RS24-RS38.....	49

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inhaltsstoffe von <i>Calendula officinalis</i> (L.)	13
Abbildung 2: Identitätsprüfung mittels Dünnschichtchromatographie von <i>Calendulae flos</i>	19
Abbildung 3: DC: Vergleich <i>Calendulae flos</i> mit <i>Calendulae extractum fluidum</i>	20
Abbildung 4: DC: Findung der Referenzsubstanzen	20
Abbildung 5: DC: Ringelblumenfluidextrakt mit Chlorogensäure, Kaffeesäure, Rutin und Hyperosid. 21	
Abbildung 6: DC: EX1-EX5 mit Rutin und Hyperosid	21
Abbildung 7: DC: EX6-EX9 mit Rutin und Hyperosid	22
Abbildung 8: DC: EX1-EX9 mit Rutin und Hyperosid	22
Abbildung 9: Darstellung des milchig, opaleszierenden Destillats.....	24
Abbildung 10: Gehaltsbestimmung von <i>Calendulae flos</i> laut Ph. Eur. 7.0	25
Abbildung 11: Chromatogramm EX1_1.....	29
Abbildung 12: Chromatogramm EX1_2.....	30
Abbildung 13: Chromatogramm EX1_3.....	31
Abbildung 14: Zuordnung der Peaks den Substanzen, die mittels LC-MS identifiziert wurden	33
Abbildung 15: Chromatogramm von Fluidextrakt und Isorhamnetin-3-O-rutinosid	34
Abbildung 16: Chromatogramm Fluidextrakt und Fluidextrakt+Isorhamnetin-3-O-rutinosid.....	35
Abbildung 17: Inhaltsstoffe <i>Polygala senega</i> (L.) und <i>Polygala tenuifolia</i> (Willd.)	42
Abbildung 18: DC aus dem Report: Vergleich von <i>Polygala senega</i> (L.), <i>Polygala tenuifolia</i> (Willd.) und <i>Glinus oppositifolius</i>	45
Abbildung 19: DC: RS24-RS30, Ammoniumglycyrrhizat und Saccharose.....	46
Abbildung 20: DC: RS31-RS38, Ammoniumglycyrrhizat und Saccharose	47
Abbildung 21: DC: Vergleich <i>Polygala tenuifolia</i> Willd. und <i>Polygala senega</i> L.....	48
Abbildung 22: Chromatogramm von Fluidextrakt und Rutin	60
Abbildung 23: Chromatogramm Fluidextrakt und Fluidextrakt+Rutin	60
Abbildung 24: Chromatogramm von Fluidextrakt und Isorhamnetin-3-O-glucosid	61
Abbildung 25: Chromatogramm Fluidextrakt und Fluidextrakt+Isorhamnetin-3-O-glucosid.....	61
Abbildung 26: Chromatogramm von Fluidextrakt und Chlorogensäure	62
Abbildung 27: Chromatogramm Fluidextrakt und Fluidextrakt+Chlorogensäure	62
Abbildung 28: Chromatogramm von Fluidextrakt und Kaffeesäure	63
Abbildung 29: Chromatogramm Fluidextrakt und Fluidextrakt+Kaffeesäure.....	63

Curriculum vitae

Sabine Mascotti

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 18. Mai 1989

Geburtsort: Bozen, Italien

Staatsbürgerschaft: Italienisch

Schule und Akademische Ausbildung:

2008-heute	Universität Wien , Wien Studium der Pharmazie
2000-2008	Franziskanergymnasium , Bozen Matura mit humanistischer Fachrichtung Mittelschule und Oberschule
1995-2000	Goethe-Schule , Bozen Volksschule

Sprachen:

Muttersprache: Deutsch

Fremdsprache: Italienisch, Englisch

ANHANG

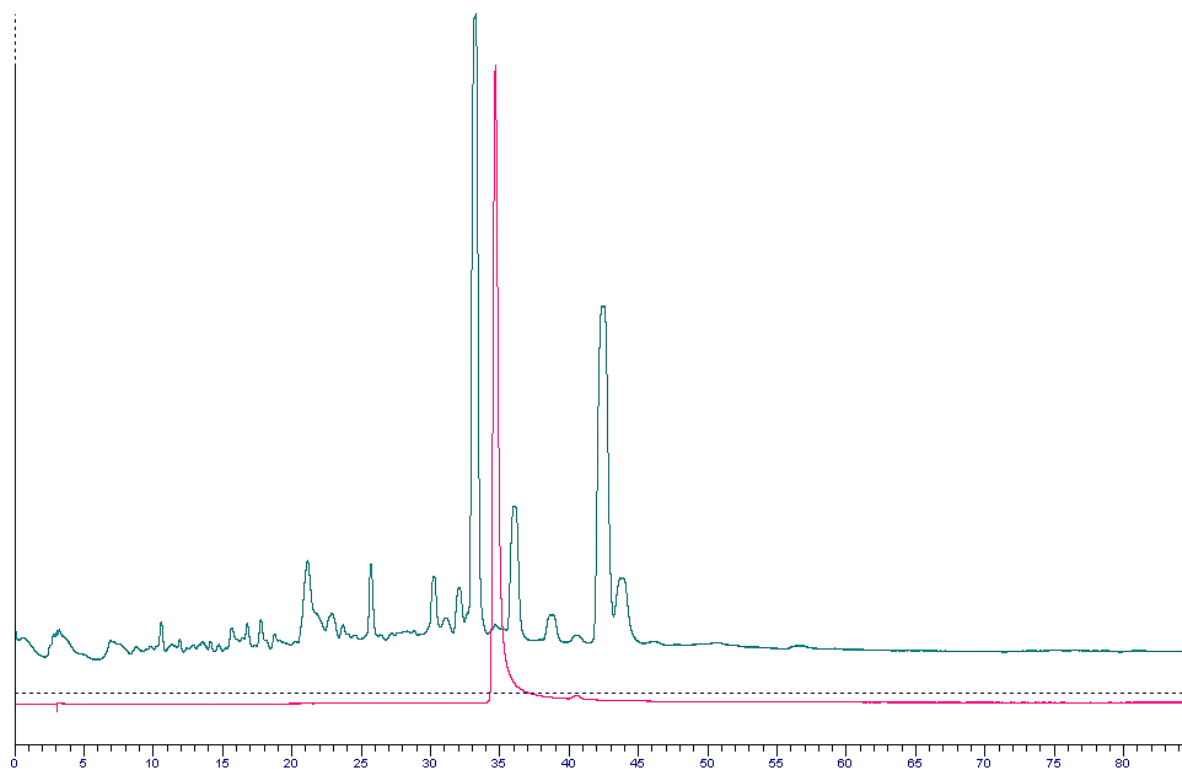


Abbildung 22: Chromatogramm von Fluidextrakt (blau) und Rutin (pink)

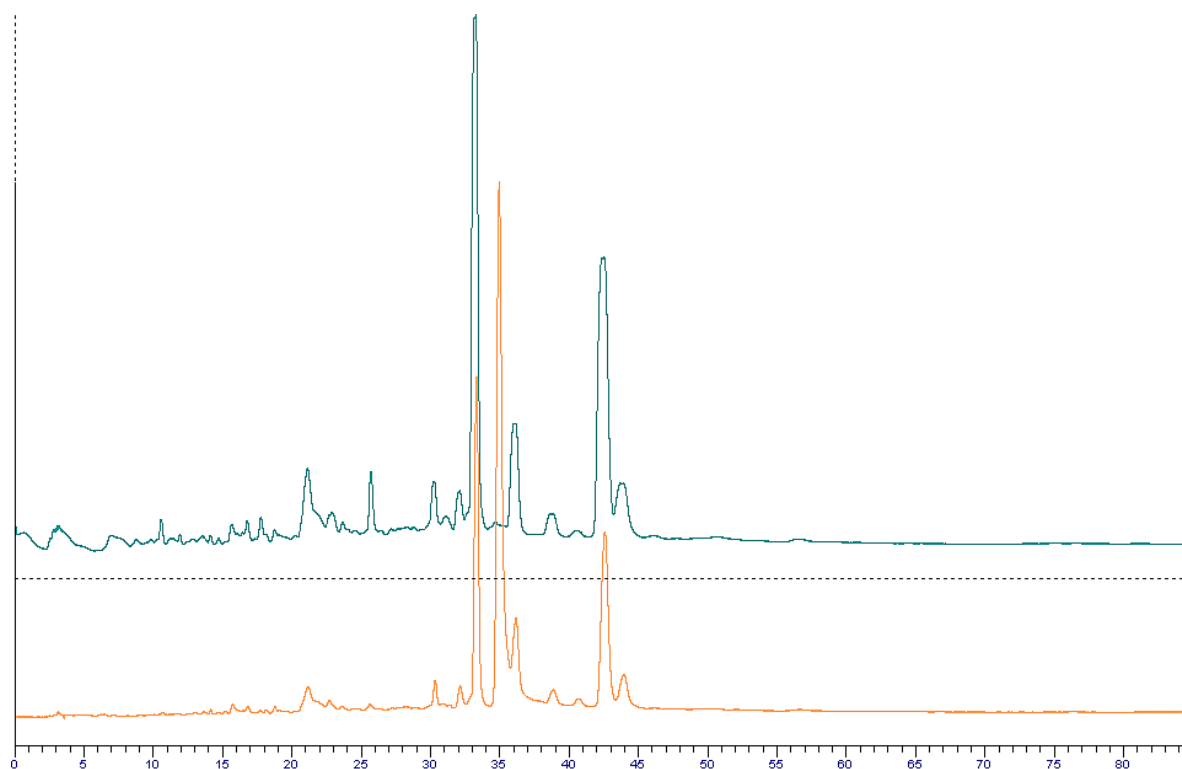


Abbildung 23: Chromatogramm Fluidextrakt (blau) und Fluidextrakt+Rutin (orange)

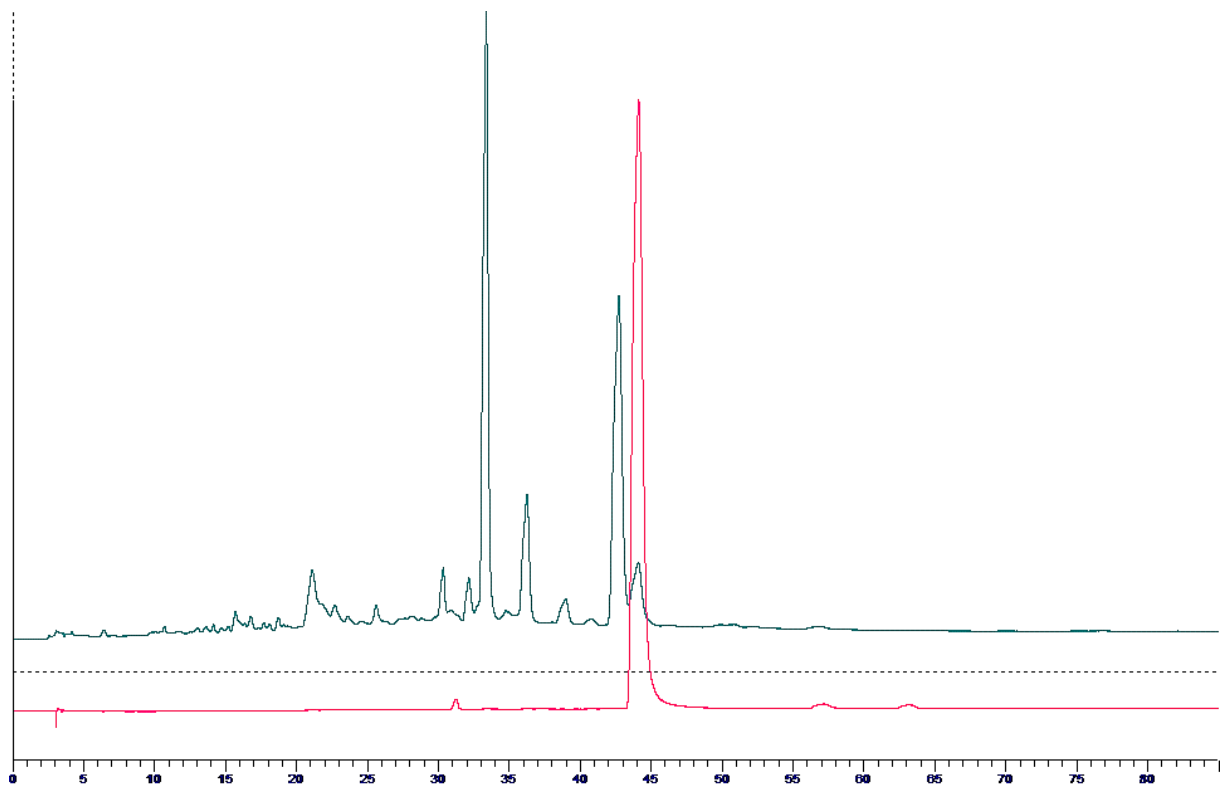


Abbildung 24: Chromatogramm von Fluidextrakt (blau) und Isorhamnetin-3-O-glucosid (pink)

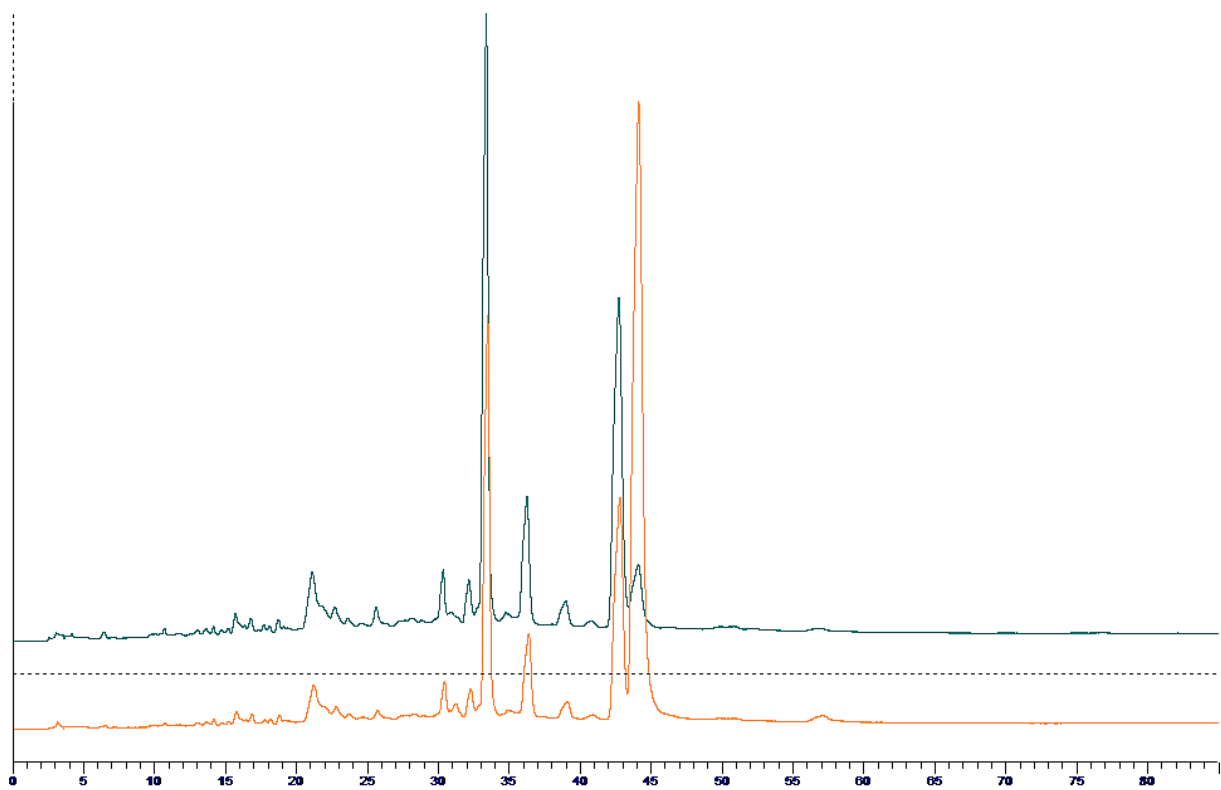


Abbildung 25: Chromatogramm Fluidextrakt (blau) und Fluidextrakt+Isorhamnetin-3-O-glucosid (orange)

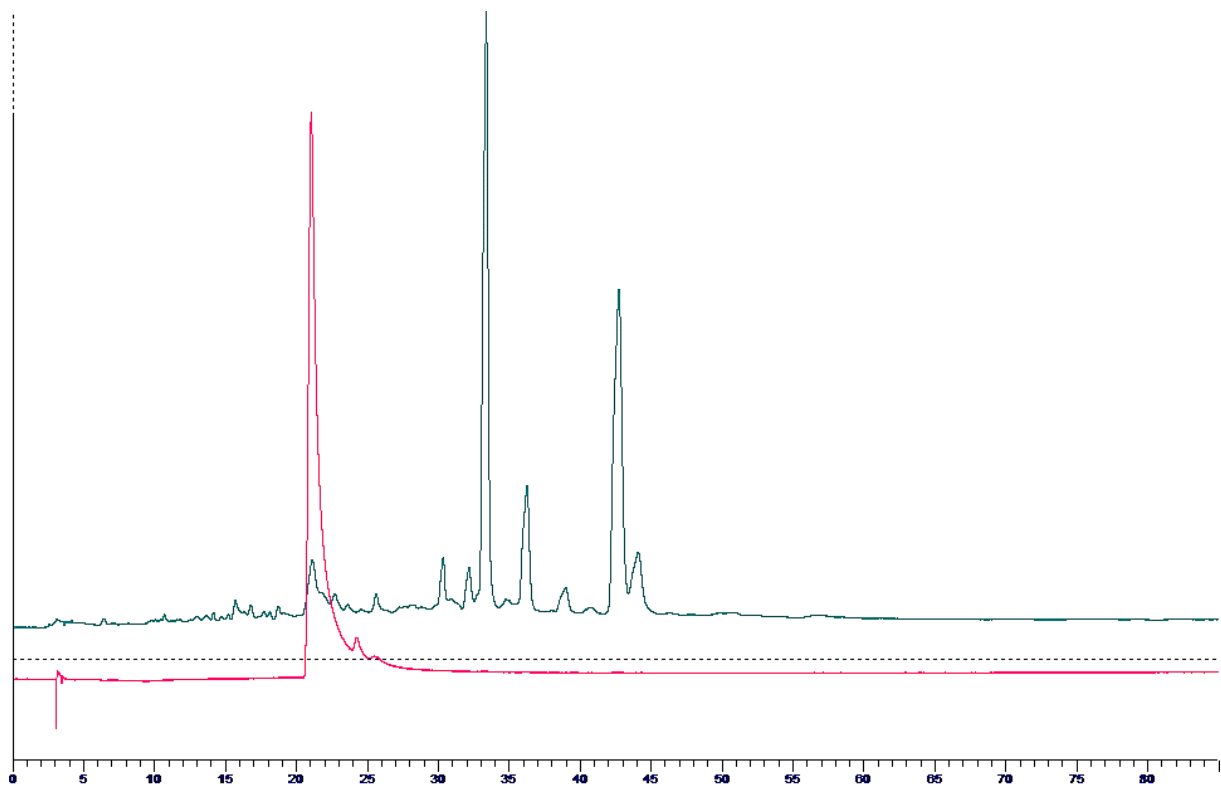


Abbildung 26: Chromatogramm von Fluidextrakt (blau) und Chlorogensäure (pink)

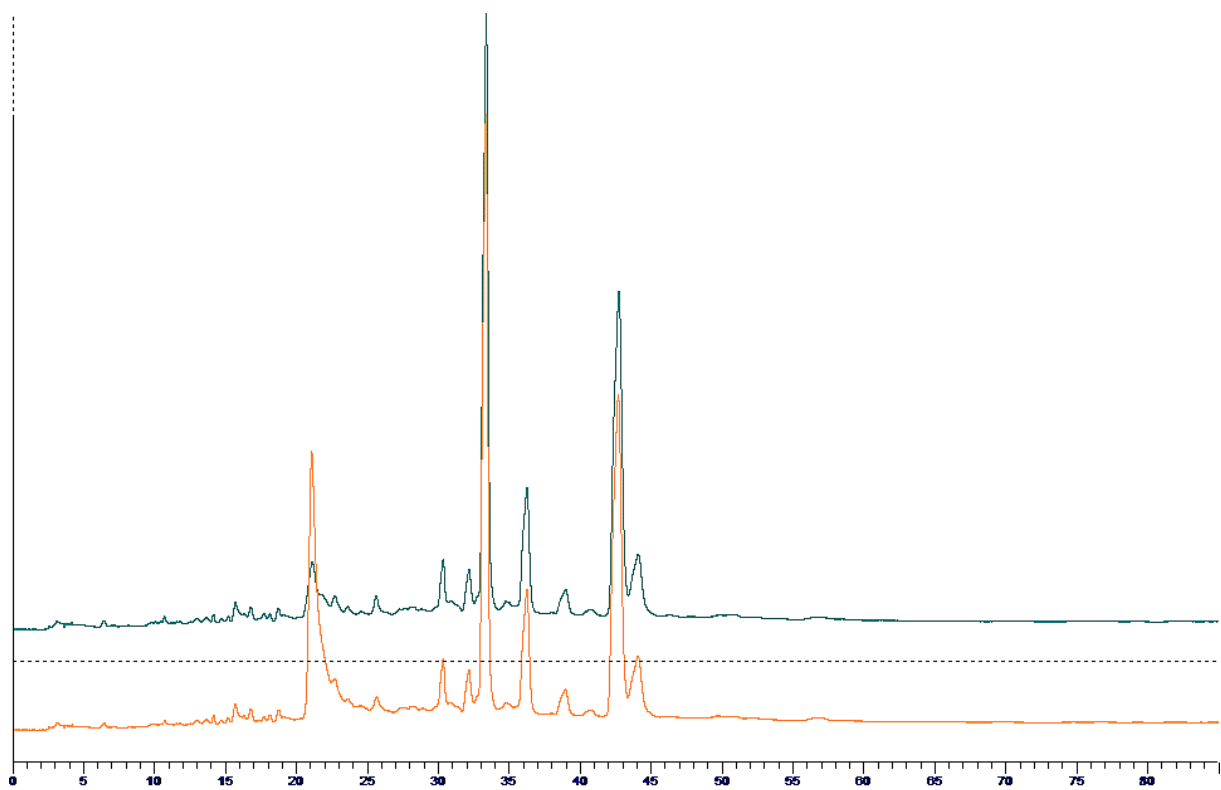


Abbildung 27: Chromatogramm Fluidextrakt (blau) und Fluidextrakt+Chlorogensäure (orange)

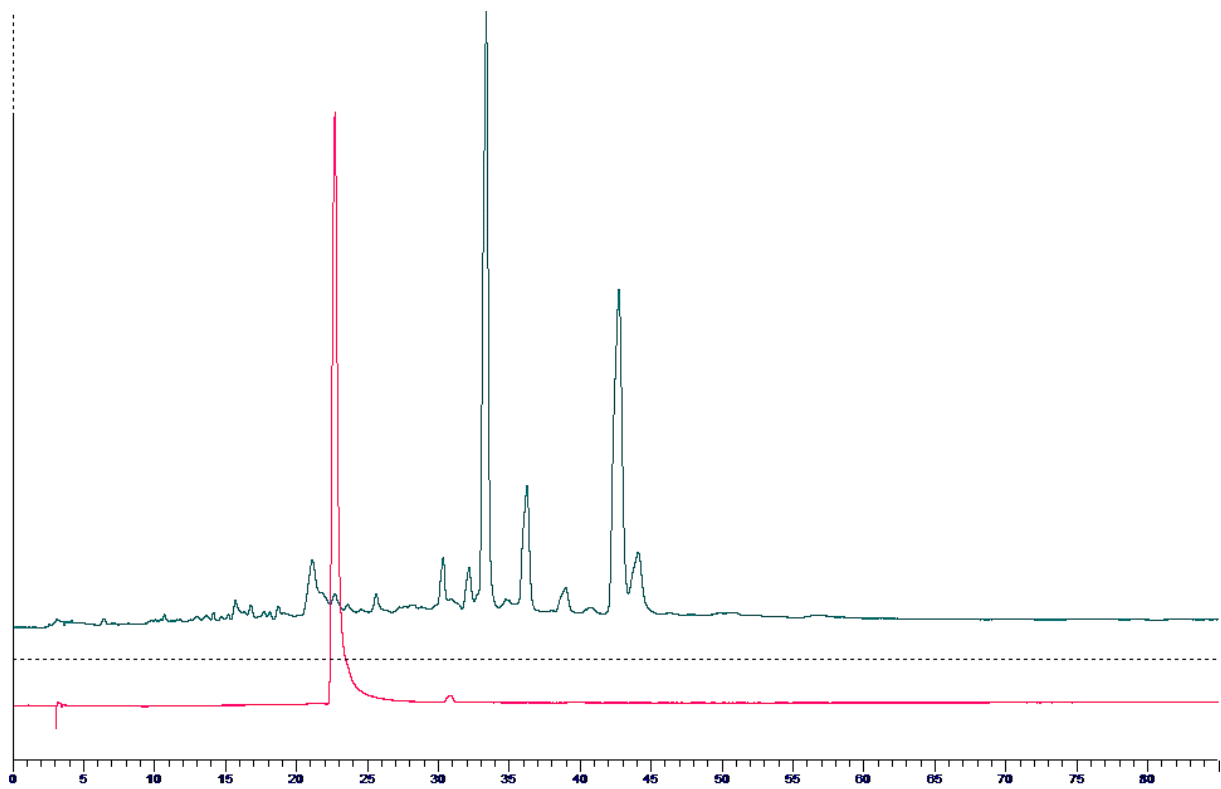


Abbildung 28: Chromatogramm von Fluidextrakt (blau) und Kaffeesäure (pink)

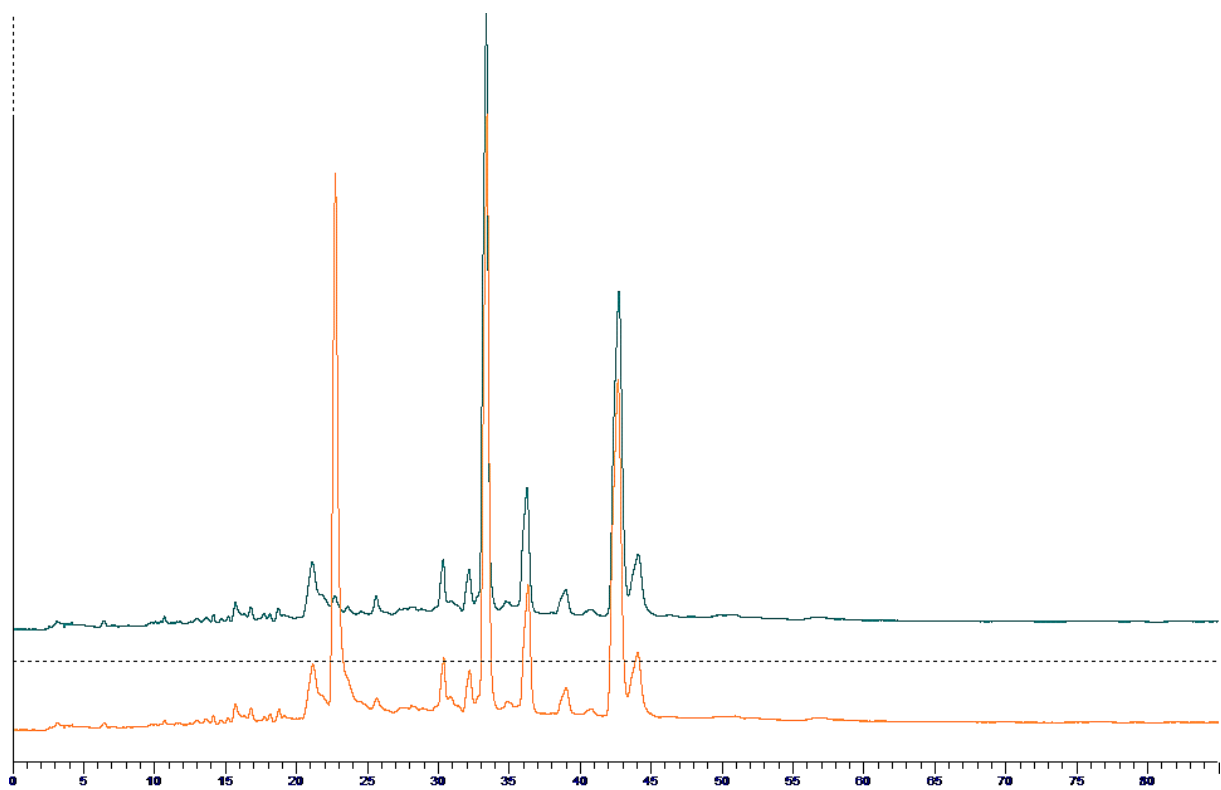


Abbildung 29: Chromatogramm Fluidextrakt (blau) und Fluidextrakt+Kaffeesäure (orange)