

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Ausarbeitung eines Monographievorschlags „Epilobii
angustifolii herba“ für das Österreichische Arzneibuch“

verfasst von / submitted by

Barbara Zsulits BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2023/Vienna 2023

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ.- Doz. Mag. Dr. Reinhard Länger

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
3	Material und Methoden	9
3.1	Material	9
3.1.1	Material aus eigener Aufsammlung	9
3.1.2	Material aus Handelsmustern	10
3.1.3	Verwendete Reinsubstanzen, Reagentien und Lösungsmittel	11
3.1.4	Geräte	12
3.2	Methoden.....	13
3.2.1	Makroskopische Untersuchung.....	13
3.2.2	Mikroskopische Untersuchung.....	13
3.2.3	Trocknungsverlust	13
3.2.4	Asche	13
3.2.5	Dünnschichtchromatographie.....	14
3.2.6	Gehalt	17
4	Ergebnisse	21
4.1	Nachbestimmung der eigenen Aufsammlungen.....	21
4.2	Makroskopische Untersuchung.....	23
4.3	Mikroskopische Untersuchung.....	25
4.4	Trocknungsverlust	45
4.5	Asche	47
4.6	Dünnschichtchromatographie.....	48
4.6.1	Auswahl eines Systems.....	48
4.6.2	Identitätsprüfung.....	51
4.6.3	Reinheitsprüfung	54
4.6.4	Anpassung des Systems an Vorgaben der Ph. Eur. – HPTLC	57
4.7	Gehalt.....	62
4.7.1	Gerbstoffgehalt	62
4.7.2	Extrahierbare Bestandteile	65
5	Diskussion	67
6	Literaturverzeichnis	74
7	Abbildungsverzeichnis	76
8	Tabellenverzeichnis.....	78

Abkürzungsverzeichnis

BPH
DC
DHT
EMA
HMPC
HPTLC
ROS
Ph.Eur.

Benigne Prostatahyperplasie
Dünnschichtchromatographie
5 α - Dihydrotestosteron
European Medicines Agency
Herbal Medicinal Products Committee
High Performance Thin Layer Chromatography
Reactive Oxygen Species
Pharmacopoe Europaea

1 Zusammenfassung

Die Arzneidroge *Epilobii angustifolii herba* wird seit mehreren Jahrzehnten in österreichischen Apotheken als Teedroge abgegeben. Der Einsatz bei benigner Prostatahyperplasie hat sich in der Praxis bewährt. Nachdem der Ausschuss für pflanzliche Arzneimittel bei der Europäischen Arzneimittelagentur eine EU-Pflanzenmonographie zur traditionellen medizinischen Verwendung von *Epilobii herba* verabschiedet hat, erschien es erforderlich auch eine verbindliche Qualitätsreferenz zu definieren. Deshalb sollte im Rahmen dieser Masterarbeit ein Monographievorschlag für das Österreichische Arzneibuch für *Epilobii angustifolii herba* erarbeitet werden.

Zur Erarbeitung bzw. Überprüfung von Kriterien zur Prüfung der Identität wurden eindeutig identifizierte Exemplare von *Epilobium angustifolium*, *Epilobium dodonaei* (Sektion *Chamenaerion*), *Epilobium hirsutum* und weiteren Vertretern der Kleinblütigen Arten aus eigenen Aufsammlungen herangezogen. Um realitätsnahe Kriterien für die Reinheitsprüfung auszuarbeiten wurden auch sieben Handelsmuster in die Untersuchungen einbezogen.

Auf Basis der authentifizierten Aufsammlungen wurden Vorschläge für die makroskopische und mikroskopische Identifizierung erarbeitet. Vor allem die Verteilung der raphidenbündelführenden Idioblasten streng entlang der Leitbündel der Blätter erlaubt eine eindeutige Identifizierung von *Epilobium angustifolium*.

Auch der chromatographische Fingerprint der Flavonoide von *Epilobium angustifolium* unterscheidet sich eindeutig von allen anderen Arten der Gattung *Epilobium*.

Die Festlegung der Grenzwerte für die Reinheitsprüfungen Trocknungsverlust und Asche erfolgte mit Handelsmustern von *Epilobii angustifolii herba*. Die vorgeschlagenen Werte von 10,0% für den Trocknungsverlust und 8% für die Asche entsprechen den üblichen Werten für pflanzliche Drogen im Europäischen Arzneibuch.

Die Bestimmung des Gerbstoffgehalts nach der Methode des Europäischen Arzneibuchs ergab Werte zwischen ca. 2% und 8%. Da die Methode komplex ist und spezifische Reagentien erfordert, wurde auch die Menge der extrahierbaren Bestandteile bestimmt. Die ermittelten Werte korrelieren sehr gut mit dem Gerbstoffgehalt, weshalb für die ÖAB Monographie die wesentlich einfacher durchzuführende Prüfung der extrahierbaren Bestandteile mit einem Mindestwert von 27,0% als Ersatz für einen Assay vorgeschlagen wurde.

Der Monographievorschlag wurde von der Arzneibuchkommission angenommen und als Monographie ÖAB 2021/217 im ÖAB 2021 publiziert.

Abstract

Austrian pharmacies have been selling the medicinal drug *Epilobii angustifolii herba* for several decades. The drug has been successfully used for benign prostatic hyperplasia. After the Committee on Herbal Medicinal Products of the European Medicines Agency adopted an EU-herbal monograph for the traditional medicinal use of *Epilobii angustifolii herba*, it seemed essential to define binding quality standards. This Master Thesis suggested a monograph on *Epilobium angustifolium* for the Austrian Pharmacopoeia.

To develop the factors for the identity tests unambiguously identified specimens of *Epilobium angustifolium*, *Epilobium dodonaei* (sectio *Chamenaerion*), *Epilobium hirsutum* and further representatives of the smallflowered species from own collections were used. To generate realistic criteria for purity tests seven commercial samples have also been investigated.

On the base of the authenticated specimens from own collections suggestions for the macroscopic and microscopic identification were elaborated. Particularly the location of the idioblasts filled with bundles of acicular crystals is characteristic for the microscopic identification of *Epilobium angustifolium*. They are strictly arranged along the vascular bundles of the leaves and never occur in cells between them.

The chromatographic pattern of flavonoids of *Epilobium angustifolium* also differs from all the other *Epilobium* species and allows an unambiguous identification.

The threshold values were specified with 10% for the loss on drying and 8% for ash content using the commercial samples. These are common levels in plant materials according to the European Pharmacopoeia.

The content of tannins was determined according to the European Pharmacopoeia and resulted in an amount of 2% to 8%. Because the analytical method is complex and requires specific chemicals, the amount of extractable matter as an alternative method also was investigated. A very close correlation between the results of the two methods allowed the suggestion to replace the assay with the significant easier method extractable matter. For the Austrian Pharmacopoeia an amount of 27% of extractable matter was proposed.

The draft monograph was accepted by the Austrian Pharmacopoeia Commission and published as monograph ÖAB 2021/217 in the ÖAB 2021.

2 Einleitung

Die Gattung *Epilobium* gehört zur Familie der Onagraceae, den Nachtkerzengewächsen. Zur selben Familie werden auch *Ludwigia* (Heusenkraut), *Oenothera* (die Nachtkerzenarten) und *Circaea* (Hexenkraut), mit bei uns heimischen Arten, sowie auch die oft als Zierpflanzen anzutreffenden Fuchsien (*Fuchsia spp.*) und Sommerazaleen (*Godetia spp.*) gezählt [1].

Epilobium ist weltweit verbreitet mit etwa 250 Arten, wobei 27 davon in Europa und 17 in Österreich vorkommen [17].

Die Flora Europaea gliedert die Gattung *Epilobium* in zwei Sektionen. Die Sektion *Chamenaerion*, die Großblütigen Weidenröschenarten, mit stets wechselständig angeordneten Blättern, leicht zygomorphen Blüten, vierteiliger Narbe und einzeln vorkommenden Pollenkörnern. Vertreten wird die Sektion *Chamenaerion* durch *Epilobium dodonaei*, *Epilobium fleischeri*, *Epilobium angustifolium*, welche in Österreich heimisch sind, und das nordische *Epilobium latifolium* [18].

Die zweite Sektion *Epilobium*, oder die Kleinblütigen Arten, mit 24 in Europa beheimateten Spezies, ist gekennzeichnet durch zumindest teilweise gegenständig oder in Dreierwirteln angeordneten Laubblättern, radiärsymmetrischer Blüte und in Tetraden gruppierten Pollenkörner. Dazu zählen *Epilobium hirsutum*, *Epilobium montanum*, *Epilobium collinum* oder *Epilobium palustre*, um einige zu nennen [1].

Sowohl die Sektion *Epilobium* als auch die Sektion der Großblütigen Arten kann noch weiter in Subsektionen unterteilt werden: *Chamenaerion* in Subsektion *Rosmarinifolium* und *Leiostylae*, *Epilobium* in die Abteilungen *Schizostigma* und *Synstigma* [17, 18].

Die Vertreter der *Synstigma* sind nur mit entsprechender Erfahrung eindeutig auseinander zu halten, wohingegen die Großblütigen Arten keine großen Ansprüche an die botanischen Kenntnisse des Sammlers stellen. Die Neigung zur Bastardisierung, besonders innerhalb der Sektion *Epilobium*, erschwert eine Identifizierung der Vertreter dieser Sektion zusätzlich.

In Tabelle 1 sind die allgemeinen morphologischen Merkmale der Gattung *Epilobium* zusammengefasst, Tabelle 2 zeigt die wesentlichen Unterscheidungsmerkmale der Untersektionen mit den dazugehörigen einheimischen Arten.

Tabelle 1: Morphologische Merkmale *Epilobium spp.* [1, 17]

Habitus:	Höhe ca. 0,05-1,5 m, ein- bis mehrjährig, meist auch vegetative Vermehrung möglich, Blätter entweder zumindest am Grund gegenständig oder aber an der ganzen Pflanze wechselständig
Blatt:	Blattform variiert von linealisch bis eiförmig, Blatt sitzend bis deutlich gestielt, Blattrand schwach bis stark gezähnt oder ganzrandig, deutlich netznervig mit Ausnahme von <i>E. dodonaei</i> , <i>E. anagallidifolium</i> , <i>E. nutans</i> und <i>E. palustre</i> , Hauptnerv und größere Seitennerven an der Blattoberseite flach bis eingesenkt und an der Unterseite stark vorgewölbt

Stängel:	Rund bis kantig, glatt oder behaart
Blüte:	Einzel in den Achseln, 0,5-2,5 cm breit, leuchtend purpurrot, rosa oder weiß, radiärsymmetrisch oder leicht zygomorph, einem sich zur Fruchtreife stark verlängernden, unterständigen Fruchtknoten aufsitzend, vier Kelchblätter, vier Kronblätter (genagelt oder nicht, ausgerandet oder nicht), acht Staubblätter, keulige oder vierteilige Narbe
Frucht und Samen:	Frucht ist eine vielsamige, sich loculicid öffnende Kapsel, vierkantig, 2-10 cm lang; Samen zahlreich, 0,5-1 mm lang, mit oder ohne Anhängsel an der Basis, oberseits mit einem Büschel aus langen Flughaaren besetzt, gelblich braun bis braun

Tabelle 2: Unterscheidungsmerkmale innerhalb der Subsectiones und heimische Vertreter [1]

Sectio	Subsectio	Charakteristika	Vertreter
Chamaenerion	Rosmarinifolium	Griffel im unteren Teil behaart, Samen papillös	<i>E. dodonaei</i> Vill. <i>E. fleischeri</i> Hochst.
	Leiostyle	Griffel im unteren Teil behaart oder kahl, Samen glatt	<i>E. angustifolium</i> L.
Epilobium	Schizostigma	Vierteilige Narbe	<i>E. hirsutum</i> L. <i>E. parviflorum</i> Schreb. <i>E. montanum</i> L. <i>E. collinum</i> C.C. Gmelin <i>E. lanceolatum</i> Seb. & Mauri
	Synstigma	Narbe kopfig oder keulig	<i>E. alpestre</i> (Jacqu.) Krockner <i>E. tetragonum</i> L. subsp. <i>tetragonum</i> <i>E. tetragonum</i> subsp. <i>lamyi</i> (F. W. Schultz) Nyman <i>E. obscurum</i> Schreber <i>E. roseum</i> Schreber <i>E. palustre</i> L. <i>E. nutans</i> F. W. Schultz <i>E. anagallidifolium</i> Lam. <i>E. alsinifolium</i> Vill. <i>E. adenocaulon</i> Hauskn.

Als Hauptinhaltsstoffe der Gattung *Epilobium* spp. können Flavonoide, Phenolcarbonsäuren und Gerbstoffe genannt werden. Für den Gehalt an Polyphenolen werden in der Literatur sehr unterschiedliche Zahlen genannt. Dieser ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie Klima, Bodenverhältnisse, Zeitpunkt der Sammlung, Art, verwendete Pflanzenteile oder dem Extraktionsprozess [22].

Bei den in *Epilobium angustifolium* vorkommenden Gerbstoffen handelt es sich um Gallotannine. Diese stellen Ester eines Zuckers (Alkoholkomponente) mit einem oder mehreren Molekülen Gallussäure dar, weshalb sie auch hydrolysiert werden können. Sind durch Anknüpfung von Digallussäureresten in einem Gerbstoff mehr Gallussäurereste als Hydroxylgruppen vorhanden, spricht man von Tanninen. Ellagitannine sind Gallotannine, in welchen die Ellagsäure, Hexahydroxydiphenylsäure, die Säurekomponente darstellt [22].

Ein Vertreter der Ellagitannine ist das Tellimagrandin I, welches auch das Monomer der in *Epilobium angustifolium* enthaltenen Oenotheine darstellt. In der Literatur werden die Oenotheine häufig als wirksamkeitsbestimmend genannt. Oenothein B, das mit einem Anteil von 4-14% die Hauptkomponente der enthaltenen Polyphenole ist, besteht aus zwei Molekülen Tellimagrandin I, welche über die Hexahydroxydiphenoylgruppen mit jeweils der Gallussäure am Glucopyranoserings des zweiten Moleküls verknüpft sind. Oenothein A ist ein Trimer desselben Grundmoleküls. Weiters konnten auch höher polymerisierte Tellimagrandin - Oligomere nachgewiesen werden. Mit 4-14% stellen Gerbstoffe die Wirkstoffkomponente mit dem größten Anteil dar und werden deshalb zur quantitativen Bestimmung vorgeschlagen [19, 26, 28].

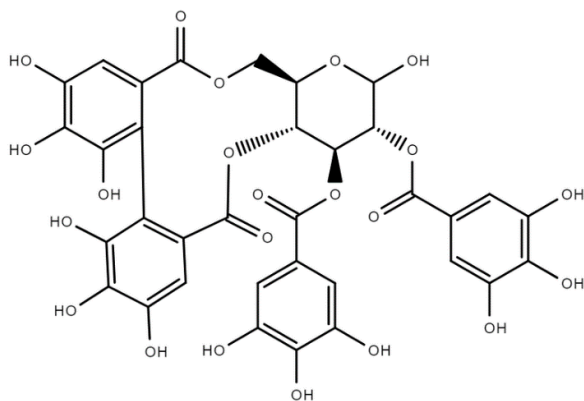


Abbildung 1: Tellimagrandin I (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tellimagrandin_I.png)

In den oberirdischen Teilen von *Epilobium angustifolium* beträgt der Gehalt an Flavonoiden ca. 0,65 bis 1,12%. Hauptsächlich handelt es sich dabei um die Aglyka der Flavonole Quercetin, Kämpferol und Myricetin, sowie Glycoside davon. Beachtenswert ist dabei, dass sich die meisten Kleinblütigen Arten nur wenig über den Gehalt an den einzelnen Komponenten unterscheiden lassen. In *Epilobium angustifolium* hingegen kann man deutliche quantitative Unterschiede zu den anderen Arten feststellen. Dieser Umstand erlaubt es, das Schmalblättrige Weidenröschen über den jeweiligen Gehalt an den verschiedenen Flavonolen

von allen anderen Weidenröschenarten zu differenzieren. Zu erwähnen ist hier auch Quercetin-3-O- β -D-Glucuronid, Kämpferol-3-O- β -D-Glucuronid und Myricetin-3-O- β -D-Glucuronid, welche in keiner anderen Art zu finden sind. Während in *Epilobium angustifolium* das Quercetin das Hauptaglykon ist, dominiert in den Kleinblütigen Arten Myricetin [13, 26].

Aus den Blättern des Weidenröschens konnten außerdem noch Triterpene (u.a. Ursolsäure, Oleanolsäure und ihre 2 α -Hydroxyderivate) mit einem Gehalt von ca. 1,3 bis 1,9% isoliert werden, 0,4% Sterole, berechnet als β -Sitosterin, verschiedene Fettsäuren (Linolen- und Palmitinsäure), aus der Frischpflanze Ascorbinsäure und aus den Wurzeln Schleimstoffe und Pektine [13].

Schriftlich erwähnt wird das Weidenröschen zum ersten Mal in Leonard Fuchs' (1501-1566) „New Kreuterbuch“. Er beschreibt eine Pflanze namens Lysimachia, der auch eine Illustration beigelegt ist, welche eindeutig eine Epilobiumart, wahrscheinlich *Epilobium hirsutum*, zeigt [21].

Das Weidenröschen wird oft mit dem Namen Maria Treben in Verbindung gebracht. Wenn ihre Werke auch wissenschaftlich umstritten sind, gewann die Pflanze, seit die österreichische Kräuterkundige sie in den 1970ern in ihrer Broschüre „Gesundheit aus der Apotheke Gottes“ erwähnte, immer mehr an Popularität. Nachdem die Nachfrage in den Apotheken gestiegen war, begann sich auch die Wissenschaft für das Kraut zu interessieren [25].

Maria Treben beschreibt in ihrer Broschüre, dass sie anlässlich des Todes ihres Schwiegervaters, der angeblich an „Prostatahyperplasie“ verstarb, von einem Nachbarn auf die Heilwirkung des Weidenröschens aufmerksam gemacht worden wäre. „Hätte der Schwiegervater von diesem Tee getrunken, wäre er heute noch am Leben“, war dieser überzeugt. Treben nennt später nicht nur Prostatabeschwerden als Indikation, sondern auch Blasen- und Nierenerkrankungen [25].

Allerdings finden in ihrer Schrift nicht alle Arten Anwendung. Sie führt dabei *E. parviflorum*, *E. roseum*, *E. montanum*, *E. obscurum*, *E. lanceolatum*, *E. collinum*, *E. palustre*, *E. anagallidifolium* und auch *E. fleischeri* als heilkräftig an. *E. hirsutum* besitzt laut Treben keine Wirkung und *E. angustifolium* darf nach der Kräuterkundigen keine Anwendung bei den genannten Indikationen finden, was sie durch den Namen „Unholdenkraut“ für das Waldweidenröschen (*Epilobium angustifolium*) bestätigt sieht [25].

In Nordamerika wurde das Weidenröschen 1854 erstmals als Tonikum, als entzündungslindernd und auch -hemmend beschrieben. Daraufhin wurden immer mehr Indikationen genannt und die Anwendung von *E. angustifolium* immer beliebter, bis das Interesse auch wieder abebbte und die Heilpflanze Anfang des 20. Jahrhunderts in Vergessenheit geriet [11].

Eine weitere Quelle zur Anwendung von *E. angustifolium* stellt das Buch „Medicinal Plants of Siberia“ von Valentina Minaeva dar. Es wurde 1970 in Russland erstmals herausgegeben und beschreibt die Verwendung des Dekokts oder der Tinktur bei Stoffwechselerkrankungen, gastrointestinalen Beschwerden, Magengeschwüren und Entzündungen der oberen Atemwege. Weiters wird die topische Applikation als Puder bei schlecht heilenden Wunden genannt. Aus der Tibetischen Medizin stammend erwähnt Minaeva eine antipyretische und

sedative Wirkung. Sie bezieht sich damit auf zwei Wissenschaftler, die in den 1930igern Feldforschungen in buddhistischen Regionen nahe der mongolischen Grenze betrieben und dabei auch auf das Schmalblättrige Weidenröschen gestoßen sind [11].

Epilobii herba fand wegen des großen Interesses bereits 1984 Eingang in die erste Ausgabe der „Teedrogen“ von Wichtl, danach auch in andere Standardwerke der Phytotherapie. Als Indikationen werden Benigne Prostata Hyperplasie (BPH) und Prostatitis genannt [27].

Der Ausschuss für pflanzliche Arzneimittel (HMPC) der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) hat eine EU-Pflanzenmonographie zur traditionellen medizinischen Verwendung des Tees aus *Epilobium*-Arten zur Linderung von Beschwerden der ableitenden Harnwege bei benigner Prostatahyperplasie publiziert [7].

Die Entstehung einer benignen Prostatahyperplasie (BPH) wird von den Androgenen Testosteron und Dihydrotestosteron beeinflusst. Fehlen diese Hormone aus natürlichen oder krankheitsinduzierten Gründen, kommt es nicht zur Proliferation von prostatischem Gewebe. Die Enzyme 5- α -Reduktase und Aromatase katalysieren wichtige Schritte bei der Biosynthese der Androgene. Oenothain A und Oenothain B inhibieren diese beiden Proteine *in vitro*. Histologische Untersuchungen ergaben, dass es im Zuge einer BPH zu einer chronischen Entzündung des Prostatagewebes kommt. Das Fehlen von bakteriellen oder viralen Ursachen lässt eine autoimmun verursachte Entzündung vermuten [4, 11].

Für verschiedene Extrakte aus den oberirdischen Teilen von *Epilobium spp.* konnte in zahlreichen Studien eine antioxidative und antiinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden. Diese Aktivität ergibt sich dabei einerseits direkt aus den Radikalfängereigenschaften der Polyphenole, welche sowohl Freie Radikale abfangen und Metallionen komplexieren können, als auch aus einer Inhibierung der Produktion von ROS durch stimulierte Neutrophile [19].

Je nach Extraktionsprozess und verwendetem Lösungsmittel wurden unterschiedliche Ergebnisse erhalten.

Es konnte einerseits eine Inhibierung der Lipoxygenase durch wässrige Extrakte aus *E. angustifolium*, *E. hirsutum* und *E. parviflorum* nachgewiesen werden, die zu einer verminderten Leukotrien B₄-Freisetzung führten, wobei eine Hemmung der Cyclooxygenasen nur in geringem Ausmaß stattfand [26].

Andererseits wurde auch eine 10-fach höhere Hemmung der Prostaglandinsynthese für Myricetin-3-O- β -D-Glucuronid aus einem wässrigen *E. angustifolium*-Blätterextrakt gegenüber Indomethacin festgestellt. Dieses Flavonoid ist ausschließlich in *Epilobium angustifolium* in jedoch nur geringen Mengen enthalten [9, 26].

Mehr als die Flavonoide scheint Oenothain B bzw. auch dessen Metabolite (Urolithine) an der entzündungshemmenden Wirkung beteiligt zu sein, die sich hauptsächlich aus einer Hemmung von COX-1 und COX-2, der verminderten Biosynthese und Freisetzung von Prostaglandinen und LTB₄ als auch einer Inhibierung von NF- κ B zusammensetzt [26].

Eine antiandrogene Wirkung konnte auch im Tierversuchsmodell nachgewiesen werden. Bei mit wässrigen Extrakten aus *Epilobium angustifolium* behandelten Ratten kam es bei der unkastrierten Gruppe zu einer Abnahme des Gewichtes der Samenbläschen [4].

Eine andere Studie beschäftigte sich mit der Wirkung wässriger Extrakte aus *Epilobium angustifolium* und Oenothain B als Reinsubstanz auf Prostatakrebszellen. Verwendet wurden LNCaP Zellen, welche hormonabhängig wachsen und DU-145 Zellen, welche hormonunabhängig wachsen. Die hormonabhängige Kultur wurde in ihrem Wachstum signifikant gehemmt, wohingegen die Wirkung auf die hormonunabhängigen Zellen nur schwach war. Die Ergebnisse für den *Epilobium angustifolium*- Extrakt sind analog zu denen von Oenothain B. Der Effekt basiert laut den Autoren auf einer Induktion der Apoptose und auf einer Hemmung der Histonacetyltransferase. Weiters wird die proliferative Wirkung von DHT aufgrund einer Hemmung der Translokation des cytosolischen Androgenrezeptors in den Zellkern reduziert. Der antitumorale Effekt konnte im Mausmodell bestätigt werden [15, 23].

In vitro Untersuchungen oder Tiermodelle können nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen werden und bedürfen noch weiterer Studien, aber in der Volksmedizin wird das Weidenröschen auch ohne Bestätigung durch die Wissenschaft verwendet.

Die Ergebnisse einer ersten randomisierten doppelblinden klinischen Prüfung mit einem Nahrungsergänzungsmittel werden von den Studienautoren positiv bewertet. Allerdings ist das Extrakt nur unzureichend charakterisiert und das Studiendesign entspricht nicht aktuellen Kriterien der Arzneimittelzulassung. Deshalb hatte diese Studie auch keinen Einfluss auf die Aktualisierung der EU-Pflanzenmonographie zu *Epilobium* [6].

Arzneipflanzen und deren Zubereitungen spielen gerade in der Urologie eine bedeutende Rolle. Schilcher berichtet, dass es sich vor 2004 bei 80% der in Deutschland bei Prostatabeschwerden verordneten Mittel um pflanzliche Urologika handelte. Danach wurden nicht- verschreibungspflichtige Arzneimittel nicht mehr von den Krankenkassen ersetzt, weshalb Daten zum Vergleich fehlen [20].

Eine Therapie der benignen Prostatahyperplasie (BPH) mit Phytopharmaka ist vor allem im frühen Erkrankungsstadium und bei vorwiegend irritativen Beschwerden angezeigt. Die Therapie mit synthetischen Pharmaka zeigt hier oftmals nicht den gewünschten Erfolg und ist mit häufigeren Nebenwirkungen verbunden. Gerade die BPH ist eines der Haupteinsatzgebiete für pflanzliche Heilmittel. Infrage kommen die Brennnesselwurzel, Kürbissamen, die Afrikanische Pflaumenbaumrinde, Roggenpollenextrakt, Sägepalmenfrüchte und das Weidenröschen [16, 20].

Laut Assessment Report der European Medicines Agency (EMA) ist gegen eine Verwendung von Zubereitungen aus dem Schmalblättrigen und auch dem Kleinblütigen Weidenröschen in in der Volksmedizin üblichen Dosierungen aus toxikologischer Sicht nichts einzuwenden [7].

Um eine definierte Qualität dieser Droge gewährleisten zu können, ist es notwendig, Kriterien für diese festzulegen. Ziel dieser Masterarbeit war es, einen Monographievorschlag für das Österreichische Arzneibuch zu erarbeiten, um einen verbindlichen Qualitätsstandard für *Epilobii angustifolii herba* zu schaffen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Material aus eigener Aufsammlung

Gesammelt wurden die oberirdischen Teile verschiedener *Epilobium*arten zur Hauptblütezeit von Juli bis September. Sammelgebiete waren das nördliche Burgenland und das Walviertel. Die Pflanzen wurden mit Hilfe der „Exkursionsflora Österreichs“ bestimmt. Nach dem Sammeln wurde das Material luftgetrocknet und in lichtdichten Papiersäcken bis zur Verwendung aufbewahrt. Tabelle 3 gibt einen Überblick der für diese Arbeit gesammelten Muster.

Die Proben 19107777-015 (*E. montanum* L.), 19107777-018, (*E. montanum* L.), 19107777-019 (*E. parviflorum* SCHREB.) und 19107777-020 (*E. tetragonum* L.) wurden gemischt, gemeinsam vermahlen und als „Kleinblütiger Mix“ untersucht.

Tabelle 3: Untersuchungsmaterial, eigene Aufsammlungen

Droge	Fundort	Finder	Probennummer
<i>Epilobium hirsutum</i> L.	Österreich, Waldhausen	Dr. Reinhard Länger	19107777-006
<i>Epilobium angustifolium</i> L.	Österreich, Nähe Moniholz	Dr. Reinhard Länger	19107777-007
<i>Epilobium dodonaei</i> VILL.	Österreich, Obernondorf	Dr. Reinhard Länger	19107777-008
<i>Epilobium angustifolium</i> L.	Österreich, Allentsteig	Dr. Reinhard Länger	19107777-009
<i>Epilobium hirsutum</i> L., geschnitten	Österreich, Hornstein, Industriegebiet, Nähe Ortsbach	Barbara Zsulits	19107777-010
<i>Epilobium angustifolium</i> L.	Österreich, Hornstein, Blaues Kreuz	Barbara Zsulits	19107777-011
<i>Epilobium angustifolium</i> L.	Österreich, Hornstein, Leithagebirge	Barbara Zsulits	19107777-012
<i>Epilobium angustifolium</i> L.	Österreich, Hornstein, Leithagebirge	Barbara Zsulits	19107777-013
<i>Epilobium angustifolium</i> L.	Österreich, Hornstein, Am Kreuzberg	Barbara Zsulits	19107777-014
<i>Epilobium montanum</i> L.	Österreich, Hornstein, Sonnenberg	Barbara Zsulits	19107777-015
<i>Epilobium dodonaei</i> VILL.	Österreich, Hornstein, Hubertuskapelle	Barbara Zsulits	19107777-016
<i>Epilobium dodonaei</i> VILL.	Österreich, Niederösterreich, Pernitz Ortsausfahrt	Barbara Zsulits	19107777-017
<i>Epilobium montanum</i> L.	Österreich, Hornstein, Lindenallee	Barbara Zsulits	19107777-018

<i>Epilobium parviflorum</i> SCHREB.	Österreich, Hornstein, Leithagebirge	Barbara Zsulits	19107777-019
<i>Epilobium tetragonum</i> L.	Österreich, Hornstein Ortsgebiet	Barbara Zsulits	19107777-020

3.1.2 Material aus Handelsmustern

Es wurden fünf Handelsmuster von *Epilobium angustifolium* und ein Muster Herba Epilobii Kleinblütig von der Firma Kottas bezogen, bzw. eine Probe Herba Epilobii Kleinblütig von der Firma Kwizda. Bei den Handelsmustern handelt es sich um die Schnittdroge.

Tabelle 4: Drogenmaterial Fa. Kottas

Droge	Ch.- Nr.	Herkunftsland	Probennummer
<i>Epilobium angustifolium</i> L., geschnitten	M19101682	Tschechische Republik	19107777-001
<i>Epilobium angustifolium</i> L., geschnitten	M19101684	Polen	19107777-002
<i>Epilobium angustifolium</i> L., geschnitten	M19101683	Ungarn	19107777-003
<i>Epilobium angustifolium</i> L., geschnitten	W19101461	Österreich	19107777-004
<i>Epilobium angustifolium</i> L., geschnitten	M18101461	Österreich	19107777-005
Herba Epilobii Kleinblütig, geschnitten	W18201687	Polen	19107777-021

Tabelle 5: Drogenmaterial Fa. Kwizda

Droge	Ch.- Nr.	Herkunftsland	Probennummer
Herba Epilobii Kleinblütig, geschnitten	847085	Bulgarien	19150615-001

3.1.3 Verwendete Reinsubstanzen, Reagentien und Lösungsmittel

Tabelle 6: Reinsubstanzen, Reagentien und Lösungsmittel, die verwendet wurden

Name	Hersteller	Qualität	Charge	Art.Nr.:
Ameisensäure	VWR	p.A., Reagens PharmEu, 98-100%	K48348964638	1.00264.1000
Chloralhydrat 80% in wäßriger Lösung	VWR	Reagens PharmEu	666340	87804
Chlorogensäure	Roth	Rotichrom TLC	409282790	
Ethylacetat	VWR	p.A., Reagens PharmEu	K49175723726 K50257823824	1.09623.1000
Glycerin	VWR	Für die Fluoreszenzmikroskopie	Z0399395630	1.04095.0250
Hautpulver	EDQM	CRS	Batch 4.12	H0500000
Hyperosid	Sigma-Aldrich		HWI00268-2	0018-05-85
			HWI01235	0018-05-85
	Roth	Rotichrom TLC	4092884403	
			200295844	
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich	EuAB	A1411533032	
Methanol	VWR	HPLC gradient grade, LiChrosolv	10994607	1.06007.2500
Methanol	VWR		I1043407933	
Molybdat-Wolframat-Reagens	VWR	Reagens PharmEu (1065000)	657762	87893
Natriumcarbonat decahydrat	VWR	p.A., EMSURE® PharmEu	A1287191914	1.063911000
Naturstoffreagens	VWR	Zur Synthese	S7051836553	8.41636.0005
Naturstoffreagens	VWR	Zur Synthese	S7390936727	8.41636.0005
PEG-4000	VWR	Zur Synthese	S6763885410	8.07485.1000
			26602.290	
Pyrogallol	VWR	p.A., Reagens PharmEu	K49101112905	1.00612.0050
Quercitrin	Phytolab		14515	89346
Rutin	Phytolab		978	89270
			12340	89270
Wasser	im Haus	HQ		

3.1.4 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Interne Gerätenr.
Analysenwaage AT261 Delta Range	Mettler Toledo	WAG-XC 017, WAG-XC 005
Automatic TLC Sampler	CAMAG	-
Derivatizer	CAMAG	-
Drogenmühle	Retsch	VOR-XT 001
Handy Step elektronische Pipette	Brand	PIP-XT 003, PIP-XT 018, PIP-XT 019
Kühler	Störk	KG-XT 004
Küvetten 1 cm Suprasil Quarz 110-QS	Hellma Analytics	-
LaborwaagePB503-S/PH	Mettler Toledo	WAG-XC 011
Messokular	Leica	SONS-XC 067
Mikroskop	Leica DM 2500	MIK-XT 003
Muffelofen M104	Heraeus Thermo	WARM-XT 001
Rotavapor	Büchi	-
Rüttler	Köttermann 4010	-
Schwingmühle	Retsch	VOR-XC 001
Serienwasserbad	GFL	-
Stereolupe	Nikon SMZ 1000	MIK-XT 004
Specord 210 Plus Spektralphotometer	Analytik Jena	SPEC-XC 018
TLC-Visualizer	CAMAG	-
Trockenschrank Venticell	MMM	WARM-XT 004
Vakuumpumpe	Büchi	SONS-XT 002

3.2 Methoden

3.2.1 Makroskopische Untersuchung

Die Identität der Proben aus eigener Aufsammlung wurde mit der Stereolupe Nikon SMZ 1000 bei 8-facher Vergrößerung unter Zuhilfenahme der „Exkursionsflora von Österreich“ verifiziert und charakterisiert. Die Beschreibung der Handelsmuster erfolgte ebenfalls mit der Stereolupe [1].

3.2.2 Mikroskopische Untersuchung

Die zu untersuchenden Proben wurden mit Chloralhydrat *R* aufgekocht, mit einem Tropfen Glycerin versetzt und anschließend unter dem Mikroskop (Leica DM 2500) betrachtet.

Von *Epilobium angustifolium*, *Epilobium hirsutum* und *Epilobium dodonaei* wurden Flächenpräparate und Querschnitte vom Blatt, dem Spross, dem Fruchtknoten und der Kapsel gemacht. Die Blütenorgane Kelch, Kronblatt und Narbe wurden in Aufsicht betrachtet, weiters der Pollen und die Oberfläche der Samen.

Um charakteristische Merkmale zu ermitteln, welche zur Abgrenzung von *Epilobium angustifolium* in der Pulverdroge gegenüber anderer Arten geeignet sind, wurden Präparate von den pulverisierten Proben der Kleinblütigen Arten gemacht (Probennummer 19107777-021, 19160615-001 und „Kleinblütiger Mix“).

Bei den Flächenpräparaten der Blätter von *Epilobium angustifolium* wurde die Länge der Deckhaare vermessen, wobei eine Krümmung der Deckhaare berücksichtigt wurde. Die Pollenkörner wurden von Exine zu Exine vermessen und der größtmögliche Durchmesser ermittelt. Es wurden 29 Pollen und 23 Deckhaare vermessen.

Die Beobachtungen wurden mit bestehender Literatur verglichen [17, 18, 28].

3.2.3 Trocknungsverlust

Bestimmung des Trocknungsverlustes nach Ph. Eur. 2.2.32 [6].

Der Trocknungsverlust wurde mit den Proben 19107777-001, 19107777-002, 19107777-004 und 19107777-005 (*Epilobium angustifolium* Handelsmuster) als Dreifachbestimmung durchgeführt. Das Mahlen der Proben erfolgte in der Drogenmühle (Retsch). Gesiebt wurde durch Sieb 710 nach Ph. Eur. 2.1.4 [6].

Die Wägegläschen wurden bis zur Massekonstanz im Trockenschrank Venticell bei 105°C getrocknet.

Es wurden je 1,000 g der Proben 19107777-001, 19107777-002, 19107777-004, 19107777-005 eingewogen und anschließend im Trockenschrank bei 105°C für 2 Stunden getrocknet, danach im Exsikkator erkalten gelassen.

3.2.4 Asche

Die Bestimmung der Asche erfolgte nach Ph. Eur. 2.4.16 [6].

Die Asche wurde ebenfalls von den Handelsmustern 19107777-001, 19107777-002, 19107777-004 und 19107777-005 von *Epilobium angustifolium* als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Tiegel wurden im Muffelofen (Heraeus Thermo) bei 600°C zur Massekonstanz geglüht und anschließend im Exsikkator erkalten gelassen.

Die massekonstanten Tiegel wurden mit 1,00 g der pulverisierten, getrockneten Probe am Bunsenbrenner erhitzt bis keine Rauchentwicklung mehr sichtbar war.

Anschließend wurden sie im Muffelofen (Heraeus Thermo) bei 600°C 1 h geglüht und im Exsikkator erkalten gelassen.

3.2.5 Dünnschichtchromatographie

System

Da die Droge Herba Epilobii bereits im Handel ist und auch Qualitätsprüfungen unterzogen wird, wurde versucht sich an bereits bestehenden Systemen zu orientieren und die Stoffgruppe der Flavonoide für den dünnschichtchromatographischen Fingerprint ausgewählt. Als Grundlage für die Herstellung der Untersuchungslösung, Auswahl geeigneter Referenzsubstanzen und Fließmittelmischungen dienten die Angaben in Wichtls „Teedrogen und Phytopharmaka“ [28], welcher sich auf Arbeiten Hiermanns bezieht [9].

Die Angaben wurden geprüft und geringfügigen Änderungen unterzogen.

Untersuchungslösung

Die Herstellung der Untersuchungslösung wurde übernommen:

Die Drogen wurden mit der Drogenmühle (Retsch) gemahlen und mit dem Sieb 355 gesiebt. Anschließend wurden 0,5 g Droge am Wasserbad bei 40°C für 20 min mit 50 ml Methanol/Wasser (1:1) extrahiert.

Der Extrakt wurde kurz unter fließendem Wasser abgekühlt und durch einen Faltenfilter Whatman 597 1/2, DM: 150 mm filtriert.

Nach Eindampfen am Rotavapor, Wasserbad 65°C, Druck begonnen bei 330 mbar (entspr. Methanol als Lösungsmittel, lt. Tabelle Handbuch Vakuumpumpe), schrittweise gesenkt auf 90 mbar, wurde der Trockenrückstand in je 2,5 ml Methanol und 2,5 ml Wasser aufgenommen.

Die Untersuchungslösung wurde durch einen 0,45 PVDF Aerodisc Lc Filter mit Hilfe von 5 ml-Einmalspritzen Luer Solo filtriert.

Referenzsubstanzen

Die Auswahl der Referenzsubstanzen wurde ebenfalls übernommen:

Je 5 mg Rutin, 5 mg Hyperosid und 5 mg Quercitrin wurden in 5 ml Methanol gelöst.

Stationäre Phase

Als Stationäre Phase wurden HPTLC KG60 F₂₅₄ (20 cm x 10 cm) Platten verwendet.

Mobile Phase

Das für Flavonoiddrogen typische Fließmittel wurde übernommen:

10 ml:	Ethylacetat	68 Teile	8,10 ml
	Ameisensäure conc.	8 Teile	0,95 ml
	Wasser	8 Teile	0,95 ml

20 ml:	Ethylacetat	68 Teile	16,20 ml
	Ameisensäure conc.	8 Teile	1,90 ml
	Wasser	8 Teile	1,90 ml

Für die Chromatographien ohne Kammersättigung (lt. Wichtl) wurden 10 ml Fließmittel verwendet, für die Chromatographien mit Kammersättigung 20 ml.

Kammersättigung

Eine Entwicklung mit Kammersättigung wurde mit der Entwicklung ohne Kammersättigung verglichen.

Für die Kammersättigung wurde eine Fiterpapiereinlage mit Fließmittel benetzt an die hintere Wand der mit dem Fließmittel befüllten Trogkammer gelehnt und eine Stunde belassen.

Auftragemenge

Unterschiedliche Auftragemengen von Untersuchungslösung und Referenzlösung wurden untersucht.

Auf HPTLC KG60 F₂₅₄ Platten wurden unterschiedliche Mengen Untersuchungslösung und Referenzlösung bandförmig (10 mm) aufgetragen. Ebenfalls wurden Unterschiede zwischen einer Auftragung per Hand und einer Auftragung durch das CAMAG Auftragegerät (Automatic TLC Sampler) untersucht. Die Platten wurden bei Raumtemperatur über eine Laufstrecke von 8 cm entwickelt.

Trocknung

Eine Trocknung unter Heißluft wurde mit der Trocknung bei Raumtemperatur verglichen.

Derivatisierung

Die Derivatisierung der Proben mit einer Lösung von Diphenylboryloxyethylamin (10 g/l) und danach mit einer Lösung von Macrogol 400 (50 g/l) wurde übernommen.

Das Aufsprühen der Detektionreagenzien erfolgte mit dem CAMAG Derivatizer. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Platten bei UV₃₆₆, UV₂₅₄ und bei Tageslicht mit dem CAMAG Visualizer betrachtet.

Untersucht wurden alle Handelsdrogen von *Epilobium angustifolium* (19107777-001, 19107777-002, 19107777-003, 19107777-004, 19107777-005), die *Epilobium angustifolium* Proben aus eigener Aufsammlung (19107777-007, 19107777-009, 19107777-010, 19107777-012), zum Vergleich Proben von *Epilobium hirsutum* (19107777-006, 19107777-010), *Epilobium dodonaei* (19107777-008, 19107777-016, 19107777-017) und die Handelsdrogen Herba Epilobii kleinblütig (19107777-020, 19150615-001) bzw. auch der „Kleinblütige Mix“ aus eigener Aufsammlung.

Anpassung des Systems an Vorgaben der Ph. Eur. – HPTLC

Monographien, welche für nationale Arzneibücher neu erstellt werden, sollen den Vorgaben durch die Ph. Eur. entsprechen. Diese sieht als eine geeignete Methode zur Identitäts- und eventuell auch Reinheitsprüfung die High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) anstelle einer Thin Layer Chromatography (TLC) vor.

Die Unterschiede bestehen im Wesentlichen in der Verwendung von HPTLC-Platten, welche nach dem Auftragen der Substanzen durch ein geeignetes Auftragegerät mit einer gesättigten Lösung von Magnesiumchlorid konditioniert werden. Die Auftragung der

Detektionsreagenzien und Sichtbarmachung der Banden hat ebenfalls mit einem geeignetem Gerät zu erfolgen.

Weiters wird außer der Untersuchungslösung und der Referenzlösung ein Intensitätsmarker mitchromatographiert und die systemspezifische Eignung muss festgestellt werden. Als Intensitätsmarker dienen unterschiedliche bekannte Konzentrationen einer Referenzsubstanz. Die systemspezifische Eignung ist gegeben, wenn zwei Substanzen mit ähnlichen Rf-Werten unter den spezifischen Bedingungen des Systems gerade noch als getrennt erfasst werden können [6].

Für den Intensitätsmarker der Monographie *Epilobii angustifolii herba* wurde 2,5 ml Referenzlösung (je 5 mg Hyperosid und 5 mg Quercitrin in 5 ml Methanol) mit Methanol zu 10,0 ml verdünnt und mitentwickelt.

Die Eignung des Systems wurde mit einer Lösung von 2,5 mg Hyperosid und 3 mg Chlorogensäure in Methanol auf 10,0 ml festgestellt.

Unterschiede zwischen den Ergebnissen bei einer Konditionierung der Platten bzw. wenn diese nicht konditioniert werden, wurden untersucht.

Ob sich die Reduktion der Kammersättigungszeit von 60 min auf 20 min auf das Ergebnis auswirkt wurde ebenfalls ermittelt.

Dazu wurden die Proben 19107777-001, 19107777-002, 19107777-004 und 19107777-005 auf jeweils konditionierten bzw. nicht konditionierten Platten chromatographiert.

Feststellung einer Verunreinigung mit Kleinblütigen Arten

Um die Möglichkeit der Prüfung auf eine Verunreinigung von *Epilobium angustifolium* durch Kleinblütige Arten mittels DC zu überprüfen, wurden Probenmischungen hergestellt. Gemischt wurden das Handelsmuster *Herba Epilobii* Kleinblütig (19107777-021) und ein Handelsmuster von *Epilobium angustifolium* (19107777-004). Es wurden drei Mischungen hergestellt.

M1:	19107777-021 50%	19107777-004 50%
M2:	19107777-021 30%	19107777-004 70%
M3:	19107777-021 10%	19107777-004 90%

Neben den Mischungen wurden noch die beiden Proben 100% chromatographiert.

3.2.6 Gehalt

Für die Bestimmung des Gehalts wurden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen. Da man aus zahlreichen Studien weiß, dass Gerbstoffe in *Epilobium angustifolium* enthalten sind, liegt die Bestimmung des Gerbstoffgehaltes nahe.

Die andere Möglichkeit ist die Bestimmung der Extrahierbaren Anteile. Sie wird in der Ph. Eur. bei z.B. der Löwenzahnwurzel oder auch der Afrikanischen Pflaumenbaumrinde verwendet [6].

Gerbstoffgehalt

Der Gerbstoffgehalt wurde nach Ph. Eur. 2.8.14 ermittelt [6].

Die Droge wurde in der Drogenmühle (Retsch) gemahlen und mit dem Sieb 355 nach Ph. Eur. 2.1.4 gesiebt [6].

Leere Küvetten wurden im Spektrophotometer vermessen und drei mit $A = 0,05982$, $A = 0,05936$ und $A = 0,05858$ ausgewählt.

Bei der Hautpulvermethode werden die Gerbstoffe, die sich in einer Lösung befinden, an Hautpulver adsorbiert und so aus der Lösung entfernt. Die übrigen Polyphenole reduzieren das Molybdat-Wolframatreagens in alkalischem Milieu zu Molybdänblau und Wolframblau. Die Produkte dieser Farbreaktion können bei 760 nm mit einem Spektrophotometer vermessen werden.

Für Messlösung A_2 werden die löslichen Gerbstoffe mit Hautpulver abgetrennt und die erhaltene Lösung bei 760 nm vermessen.

Für die Messlösung A_1 werden die Gerbstoffe nicht mit Hautpulver abgetrennt und die erhaltene Absorption kann mit dem Gesamtgehalt der Lösung an Polyphenolen in Beziehung gesetzt werden. Die Differenz aus Gesamtpolyphenolgehalt und Gehalt an nicht adsorbierbaren Polyphenolen entspricht dem Gerbstoffgehalt.

Als Referenz dient Pyrogallol und die Gerbstoffe werden als Pyrogallol berechnet [6, 22].

Dazu muss Messlösung A_3 als Referenzlösung hergestellt werden.

Für die Ermittlung der Einwaage, mit welcher sich die Absorption im linearen Bereich befindet, wurden, ausgehend von für gerbstoffhaltige Pflanzendrogen typischen Mengen, Messungen durchgeführt.

Eine Menge von 0,500 g bzw. 1,000 g der gepulverten Droge (355) wurde mit 150 ml Wasser *R* versetzt und im Wasserbad 30 min erhitzt. Der Auszug wurde unter fließendem Wasser gekühlt, quantitativ in einen Messkolben überführt und auf 250 ml aufgefüllt. Nach dem Absetzen fester Bestandteile wurde die Flüssigkeit filtriert, wobei die ersten 50 ml verworfen wurden.

- Herstellung Messlösung A_1 : 5 ml des Filtrats wurden mit Wasser *R* zu 25,0 ml verdünnt. 2,0 ml dieser Lösung wurden mit Molybdat-Wolframat-Reagens und 10,0 ml Wasser *R* versetzt und mit einer Lösung von Natriumcarbonat *R* (290 g/l) auf 25,0 ml ergänzt. Die Absorption wurde nach 30 min gegen Wasser als Kompensationsflüssigkeit mit dem Specord 210 Plus Spektralphotometer (Analytik Jena) bei 760 nm vermessen.

- Herstellung Messlösung A₂: 10,0 ml Filtrat wurden mit 0,10 g Hautpulver CRS versetzt, 60 min lang am Rüttler (Köttermann 4010) kräftig geschüttelt und anschließend filtriert. Mit 5,0 ml des erhaltenen Filtrats wurde wie mit Messlösung A₁ weiterverfahren.
- Herstellung Messlösung A₃: 50,0 mg Pyrogallol wurden mit Wasser R zu 100,0 ml gelöst. Mit 5,0 ml davon wurde weiterverfahren wie mit Messlösung A₁.

Alle Arbeitsschritte wurden unter Lichtschutz durchgeführt.

Mit der Formel $\frac{62,5 \times (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$ kann der Gerbstoffgehalt in Gramm berechnet werden [6].

Die Proben 19107777-001, 19107777-002, 19107777-004 und 19107777-005 als *Epilobium angustifolium* Handelsmuster, 19107777-012, 19107777-009a und 19107777-009b *Epilobium angustifolium*, 19107777-006 und 19107777-010 *Epilobium hirsutum* und 19107777-017 *Epilobium dodonaei* aus eigenen Aufsammlungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt, ebenso die Handelsmuster von Herba Epilobii Kleinblütig.

Extrahierbare Bestandteile

Im Allgemeinen Teil des Österreichischen Arzneibuchs werden bei den speziellen Prüfungsverfahren für Drogen und Arzneizubereitungen unter Punkt 2 Ermittlung des Extraktgehaltes zwei Extraktionsmöglichkeiten beschrieben. Diese beiden Methoden entsprechen den nachfolgend beschriebenen Methoden 1 und 2 [14].

Mit der Probe 19107777-001 wurden beide Varianten des ÖAB19 durchgeführt und eine adaptierte Version der Gehaltsbestimmung für Ononidis radix nach Ph. Eur. 2019.

1. Methode 1 ÖAB: In einem 50 ml Schliffenmeyerkolben wurden 2,00 g der gepulverten Probe (355) mit 20,0 ml Methanol/ Wasser (1:1) versetzt und 24 h unter häufigem Schütteln bei Raumtemperatur mazerieren gelassen.
2. Methode 2 ÖAB: In einem 50 ml Rundkolben wurden 2,00 g Probe mit 20,0 ml Methanol/ Wasser (1:1) versetzt, tariert und 1 h unter Rückfluss am Wasserbad (Serienwasserbad von GFL) erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Flüssigkeit in etwa ersetzt.
3. Methode 3: In einem 50 ml Schliffenmeyerkolben wurden 2,00 g mit 20 ml Methanol/ Wasser (1:1) versetzt und unter Rühren 2 h mazerieren gelassen. Nach dem Absetzen der Feststoffe weiter mit 1.-3..

- 1.-3. Extrakt durch einen Faltenfilter (Whatman, 125 mm) in einen Erlenmeyerkolben filtrieren. 4,00 ml werden in ein austariertes Wägegläschen (50 mm Durchmesser) überführt und am Wasserbad (Serienwasserbad von GFL) zur Trockene eingedampft. Anschließend 3 h im Trockenschrank bei 105° C trocknen und im Exsikkator abkühlen lassen.

Für die Auswahl der Methode wurden alle drei Varianten mit 19107777-001 durchgeführt.

Die Bestimmung der Extrahierbaren Bestandteile wurde mit folgenden Proben als Doppelbestimmungen durchgeführt: 19107777-001, 19107777-002, 19107777-004, 19107777-005 als *Epilobium angustifolium* Handelsdrogen. Die Proben 19107777-009 und 19107777-012 als *Epilobium angustifolium* aus eigenen Aufsammlungen als Einzelbestimmungen, wobei bei 19107777-009 die oberen (a) und die unteren (b) Anteile der oberirdischen Teile der Pflanze getrennt analysiert wurden. Weiters 19107777-021 und 19150615-001 als Handelsmuster der Kleinblütigen Weidenröschenarten wieder als Doppelbestimmung. 19107777-006 und 19107777-010 *Epilobium hirsutum*, 19107777-017 *Epilobium dodonaei* wurden als Einzelbestimmungen durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Nachbestimmung der eigenen Aufsammlungen

Die getrockneten Exemplare aus eigener Aufsammlung wurden mit Hilfe der „Exkursionsflora von Österreich“ nachbestimmt [1].

19107777-006: Laubblätter gegenständig; 8-10 cm lang; halbstengelumfassend sitzend; scharf, dicht gezahnt
Stengel zottig behaart, Haare abstehend, 1-5 mm lang,
Stengel stielrund
Krone 12-15 mm Durchmesser; radiärsymmetrisch; purpurrot;
Blütenknospen aufrecht; Kelchblätter bespitzt; Kronblätter ausgerandet;
Griffel und Staubblätter aufrecht; Narbe vierspaltig
Same 1,0-1,2 mm lang

Ergebnis: *Epilobium hirsutum* L.

19107777-010: Laubblätter gegenständig; 6-9 cm lang; halbstengelumfassend sitzend, ca. 1 mm herablaufend; scharf, dicht gezahnt
Stengel zottig behaart, Haare abstehend, 1-5 mm lang,
Stengel stielrund
Krone 12-13 mm Durchmesser; radiärsymmetrisch; purpurrot;
Blütenknospen aufrecht; Kelchblätter bespitzt; Kronblätter ausgerandet;
Griffel und Staubblätter aufrecht; Narbe vierspaltig
Same 1,0-1,1 mm lang

Ergebnis: *Epilobium hirsutum* L.

19107777-017: Laubblätter wechselständig; 1,5-3,0 mm breit; linealisch; beidseits grün, nur Mittelnerv deutlich erkennbar; Ober- und Unterseite dicht anliegend behaart; ganzrandig
Krone 19-22 mm Durchmesser; radiärsymmetrisch; purpurrot;
Kronblätter verjüngen sich zum Grund, sind aber nicht genagelt;
Kelchblätter und Achsenbecher aussen dicht anliegend behaart;
Kronblätter nicht ausgerandet; Griffel und Staubblätter leicht abwärts gebogen; Griffel fast so lang wie Staubblätter, im unteren Drittel zottig behaart

Ergebnis: *Epilobium dodonaei* VILL.

19107777-008: Laubblätter wechselständig; 4-9 mm breit; lineal-lanzettlich; beidseits grün; Mittelnerv deutlich, Seitenerven erkennbar; beidseits dicht angedrückt behaart; schwach und entfernt gezahnt
Krone 14-17 mm Durchmesser; radiärsymmetrisch; purpurrot;
Kronblätter nicht ausgerandet, genagelt; Kelchblätter und Achsenbecher aussen dicht anliegend behaart; Griffel fast so lang wie Staubblätter, im unteren Drittel zottig behaart; Narbe vierspaltig

Ergebnis: *Epilobium dodonaei* VILL.

- 19107777-016: Laubblätter wechselständig; 1-4 mm breit; linealisch; beidseits grün, nur Mittelnerv deutlich erkennbar; Ober-und Unterseite dicht anliegend behaart; schwach und entfernt gezähnt
Krone 17-20 mm Durchmesser; radiärsymmetrisch; hell purpur; Kronblätter verjüngen sich zum Grund, sind aber sitzend; Kelchblätter und Achsenbecher aussen dicht anliegend behaart; Kronblätter nicht ausgerandet; Griffel und Staubblätter leicht abwärts gebogen; Griffel fast so lang wie Staubblätter, im unteren Drittel zottig behaart
Ergebnis: *Epilobium dodonaei* VILL.
- 19107777-007: Laubblätter wechselständig; 10 mm breit; lanzettlich; Rand nach unten zurückgerollt; beidseits grün, Seitennerven deutlich erkennbar;
Krone 20-21 mm Durchmesser; radiärsymmetrisch; sowohl Blüte, als auch gesamte obere Stängelanteile purpur; Kronblätter genagelt und nicht ausgerandet; Blüten in Trauben angeordnet
Ergebnis: *Epilobium angustifolium* L.
- 19107777-009: Laubblätter wechselständig; 12-17 mm breit; lanzettlich; Rand nach unten zurückgerollt; beidseits grün, Seitennerven deutlich erkennbar;
Krone 17-19 mm Durchmesser; radiärsymmetrisch; sowohl Blüte, als auch gesamte obere Stängelanteile purpur; Kronblätter genagelt und nicht ausgerandet; Blüten in Trauben angeordnet
Ergebnis: *Epilobium angustifolium* L.
- 19107777-011: Laubblätter wechselständig; 12-18 mm breit; lanzettlich; Rand leicht nach unten zurückgerollt; beidseits grün, Seitennerven deutlich erkennbar;
Krone 15-19 mm Durchmesser; radiärsymmetrisch; Blüte purpur; Kronblätter genagelt und nicht ausgerandet; Blüten in Trauben angeordnet
Ergebnis: *Epilobium angustifolium* L.
- 19107777-012: Laubblätter wechselständig; 12-18 mm breit; lanzettlich; Rand nach unten zurückgerollt; beidseits grün, Seitennerven deutlich erkennbar;
Krone fehlt; Stengel und Frucht rötlich; Früchte in Trauben angeordnet
Ergebnis: *Epilobium angustifolium* L.
- 19107777-013: Laubblätter wechselständig; 10-14 mm breit; lanzettlich; Rand leicht nach unten zurückgerollt; beidseits grün, Seitennerven deutlich erkennbar;
Krone 9-13 mm Durchmesser; radiärsymmetrisch; Blüte purpur; Kronblätter genagelt und nicht ausgerandet; Krone hell purpur; Stängel rötlich; Blüten in Trauben angeordnet
Ergebnis: *Epilobium angustifolium* L.
- 19107777-014: Laubblätter wechselständig; 8-15 mm breit; lanzettlich; Rand leicht nach unten zurückgerollt; beidseits grün, Seitennerven deutlich erkennbar;

Krone 10-17 mm Durchmesser; radiärsymmetrisch; Krone purpur;
Kronblätter genagelt und nicht ausgerandet; obere Stängelteile rötlich;
Blüten in Trauben angeordnet

Ergebnis: *Epilobium angustifolium* L.

Die Kleinblütigen Arten lassen sich von *Epilobium angustifolium*, *Epilobium dodonaei* und *Epilobium hirsutum* in der Totodroge makroskopisch zwar gut abgrenzen, sie sicher untereinander zu unterscheiden, ist jedoch schwierig. Da die Einzelpflanzen zu einer Probe vereinigt und untersucht wurden, wird auch nicht näher auf eine Differenzierung dieser eingegangen.

4.2 Makroskopische Untersuchung

In der Herba-Droge sind Blätter, Stängel, Blüten- bzw. Fruchstiele, die Blüte mit ihren Organen (Kelch, Krone, Staubblätter, Griffel und Narbe), der unterständige Fruchtknoten, die Kapsel und auch Samen enthalten (Abb. 2).



Abbildung 2: 19107777-005, *Epilobium angustifolium* Handelsdroge unter der Lupe; a: Blatt, b: Stängel, c: Blüte, d: Fruchtknoten, e: Kapsel

Zur Unterscheidung geeignete Merkmale finden sich vor allem am Blatt. Charakteristisch für *Epilobium angustifolium* ist der nach unten umgerollte Blattrand und die in stumpfem, fast rechtem Winkel vom deutlich erkennbaren Mittelnerv abgehenden Seitennerven, die in einen Randnerv zusammenlaufen. Die netzige Nervatur dazwischen ist heller als der Interkostalbereich. Das Blatt ist spröde und fast kahl, der Blattrand nicht oder nur entfernt leicht gezähnt. Da in der Droge häufig auch Samen mit deren Flughaaren enthalten sind, wird mitunter ein „wolliger“ Eindruck erweckt.

Auffällig sind die großen purpurnen Blüten, die aber auch in unterschiedlichem Ausmaß in den Handelsmustern enthalten waren, sowie die ebenfalls purpur überlaufenen Stängelanteile, Fruchtknoten und Kapseln.

Tabelle 8: Unterscheidungsmerkmale der Epilobiumarten in der Schnittdroge

	<i>E. angustifolium</i>	<i>E. dodonaei</i>	<i>E. hirsutum</i>	Kleinblütige A.
Blatt	Spreite breiter als 8 mm, Blatt kahl, Seitennerven deutlich und charakteristisch, Unterseite blass-bläulich grün	Spreite max. 5 mm breit, linealisch, Ober- und Unterseite dicht angedrückt behaart, nur Mittelnerv deutlich, beiderseits grün	Spreite bis 21 mm breit, behaart, Blattrand dicht gezahnt, beiderseits grün	Spreitenbreite variabel, aber kleiner als bei <i>E. hirsutum</i> , beiderseits grün
Stängel	oft rötlich überlaufen, Nodien wechselständig	Nodien wechselständig	Nodien gegenständig	Nodien meist gegenständig
Blüte	Kronblätter nicht ausgerandet, genagelt, Narbe 4teilig	Kronblätter nicht ausgerandet, nicht genagelt, 4teilig	Kronblätter ausgerandet, Narbe 4teilig	Kronblätter meist ausgerandet, Narbe 4teilig oder keulig, bei Hybriden auch asymmetrisch 2-3teilig
Frucht	oft rötlich überlaufen	grün	grün	grün

4.3 Mikroskopische Untersuchung

Epilobium angustifolium L.

Blatt: Im Flächenpräparat fallen die zahlreichen Idioblasten mit Raphidenbündel auf, welche stets entlang der Leitbündel angeordnet sind und praktisch nie im Interkostalbereich auftreten (Abb.3).



Abbildung 3: *Epilobium angustifolium* L, Blattoberseite Idioblasten mit Raphidenbündeln; links im Durchlicht, rechts im Polarisationsmikroskop

Die obere Epidermis ist frei von Stomata, die Epidermiszellen sind polygonal bis leicht wellig (Abb. 4).

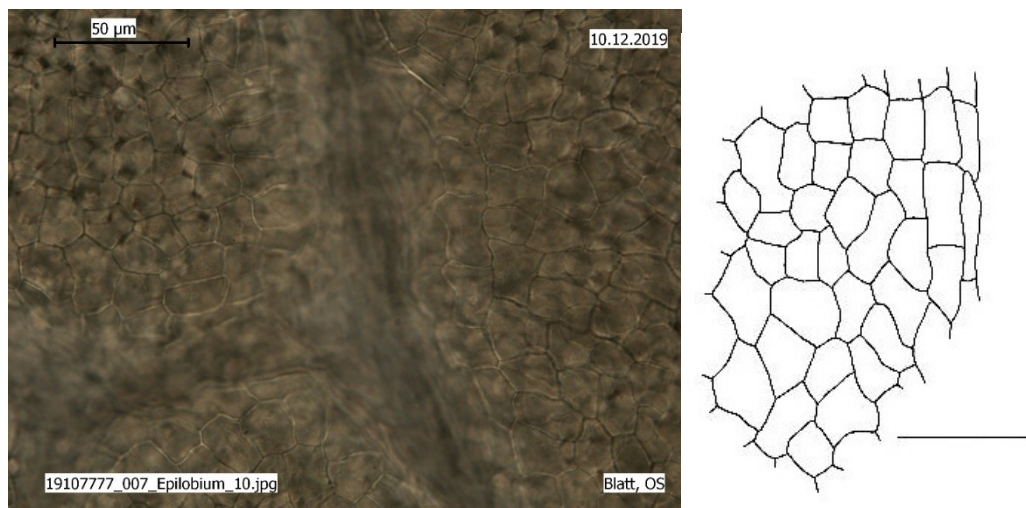


Abbildung 4: *Epilobium angustifolium* L, Blattoberseite mit polygonalen Epidermiszellen

Auf der unteren Epidermis finden sich zahlreiche anomozytische Stomata zwischen welligen Epidermiszellen mit ausgeprägter Cuticularstreifung (Abb. 5).

An den Blattnerven finden sich manchmal einzellige, dünnwandige, gewarzte Deckhaare mit stumpfem Ende. Die Blattnerven und -ränder sind kahl. Drüsenhaare kommen nicht vor.

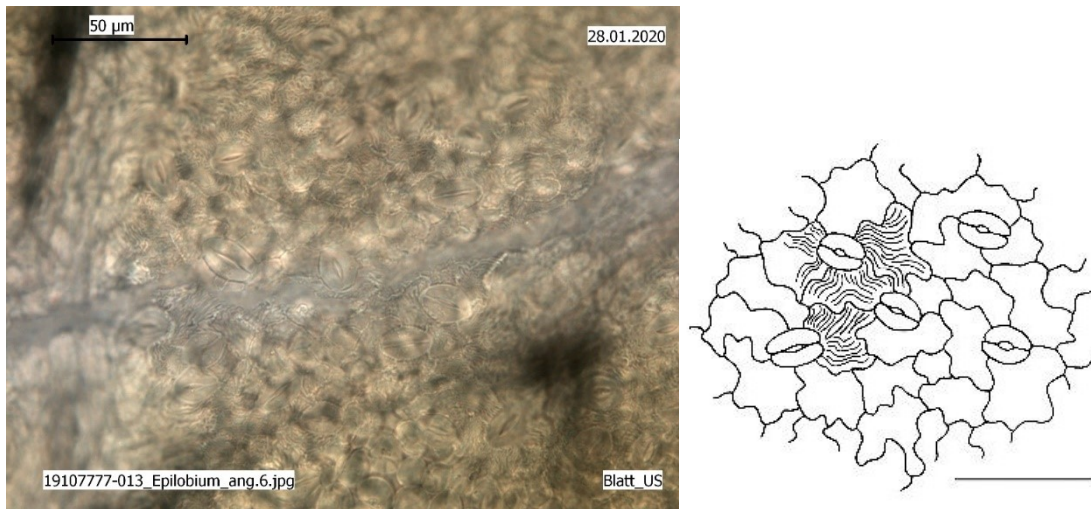


Abbildung 5: *Epilobium angustifolium* L, Blattunterseite mit Stomata und Cuticularstreifung auf welligen Epidermiszellen

Querschnitt: Das Blatt ist bifacial gebaut, die Epidermis dünnwandig, das Palisadenparenchym zweireihig und das Schwammgewebe relativ dicht (Abb. 6).

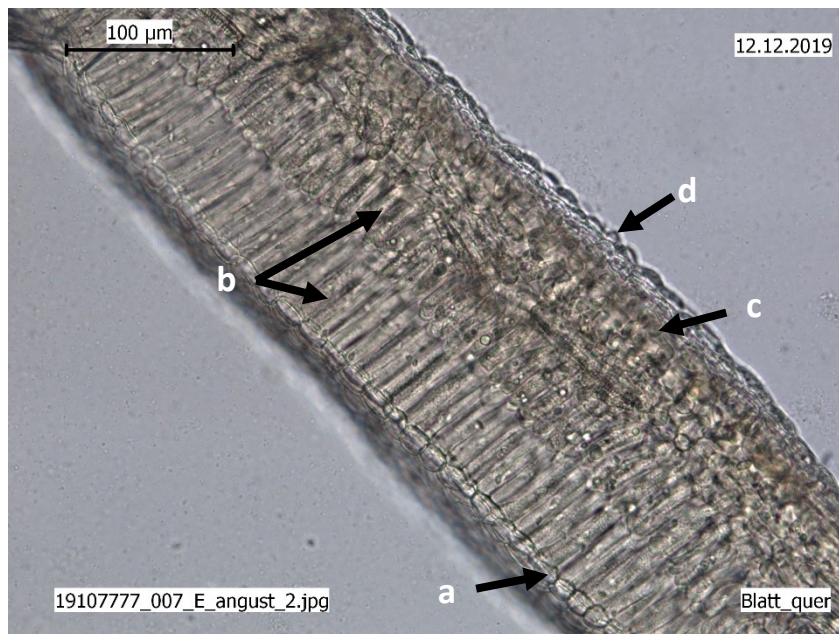


Abbildung 6: *Epilobium angustifolium* L, Blattquerschnitt bifacialer Bau; a: obere Epidermis, b: zweireihiges Palisadenparenchym, c: Schwammparenchym, d: untere Epidermis

Spross: Die unteren Sprosssteile sind mäßig angedrückt behaart oder kahl. Es finden sich die gleichen Deckhaare, wie beim Blatt beschrieben, Drüsenhaare fehlen wiederum. Zur Spitze der Pflanze hin nimmt die Behaarung zu.

Die Epidermiszellen sind länglich polygonal.

Im Querschnitt kann unter der primären Rinde ein fast geschlossener Bastfaserring beobachtet werden, danach Siebteil, Holzteil mit Schrauben- und Tüpfel- bzw. Spangengefäßen (Pulver), interxyläres Phloem und Mark bzw. eine Markhöhle (Abb. 7) [17].

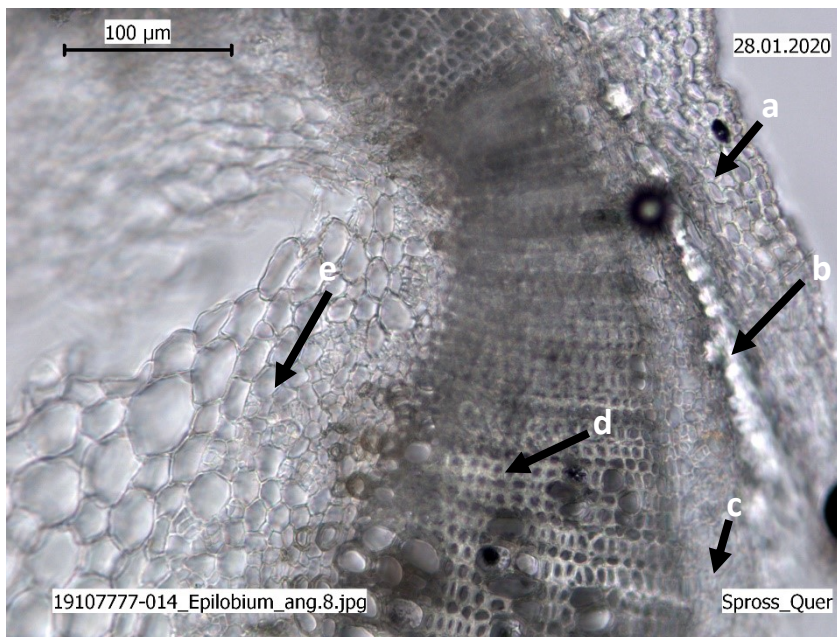


Abbildung 7: *Epilobium angustifolium* L, Sprossquerschnitt; a: primäre Rinde b: Bastfaserring c: Siebteil d: Holzteil e: Mark mit interxylärem Phloem

Blüte: Der Kelch ist außen dicht angedrückt behaart, innen und am Rand kahl, Drüsenhaare fehlen. Epidermiszellen sind länglich und wellig, an den Einbuchtungen knotig verdickt.

Die Cutikularstreifung ist deutlich sichtbar (Abb. 8).

Entlang der Leitbündel sind wieder Raphiden angeordnet.



Abbildung 8: *Epilobium angustifolium* L., Aufsicht Kelchblattunterseite mit Deckhaaren

Die Kronblätter sind dünn und im aufgehellten Präparat meist farblos. Die Epidermiszellen sind langgestreckt wellig mit knotigen Verdickungen jeweils an den Einbuchtungen. Die Leitbündel mit Schraubengefäßen sind gut sichtbar und wieder von Raphiden begleitet.

Zur Mitte und Basis hin sind die Zellwände weniger wellig, eine Wandfaltung ist meist erkennbar (Abb. 9).

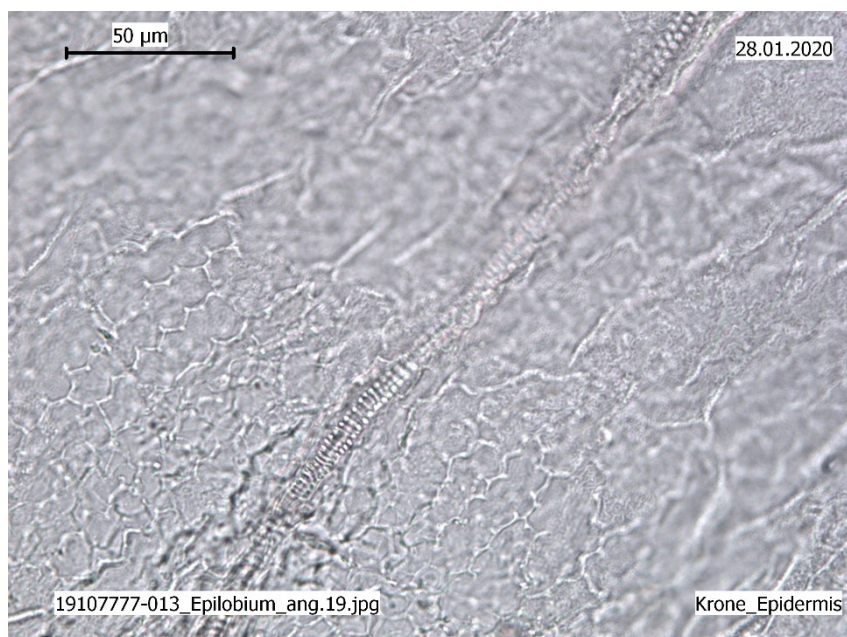


Abbildung 9: *Epilobium angustifolium* L., Aufsicht Kronblatt

Die Antheren sind meist gelblich oder weiß. Die Epidermis ist kahl und weist länglich polygonale Epidermiszellen auf, entlang der Leitbündel finden sich Raphiden.

Die Epidermiszellen der Theken sind isodiametrisch, dünnwandig und erscheinen in der Aufsicht papillös, darunter ist deutlich das Endothecium mit spangenartigen Verdickungen erkennbar. Bei den dunkel umrandeten Strukturen handelt es sich um im Präparat eingeschlossene Luftblasen (Abb. 10).

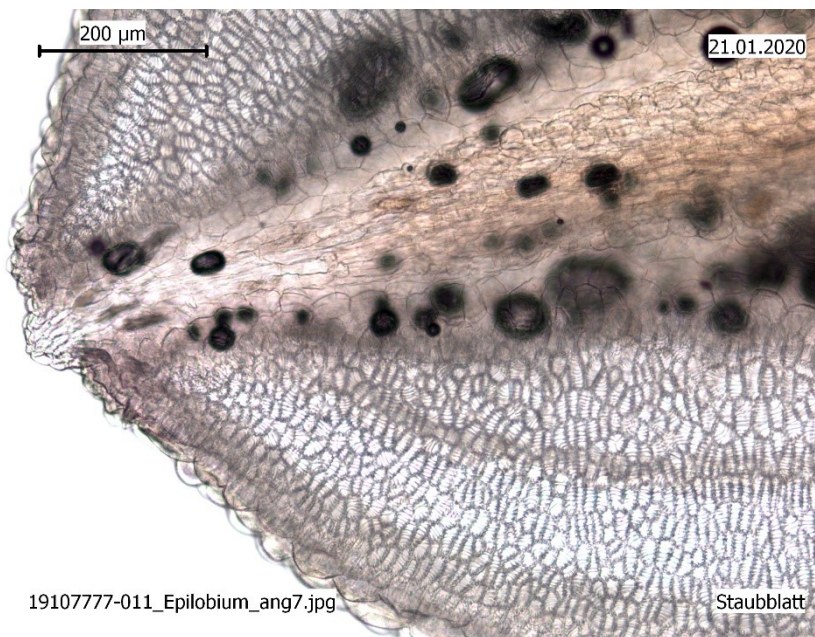


Abbildung 10: *Epilobium angustifolium* L, Staubblatt

An der Narbe haftet oft der charakteristische große triporate Pollen mit glatter Exine. Meist ist er rosa gefärbt, im Pulverpräparat auch farblos. Die Pollenkörner treten einzeln auf (Abb.11).

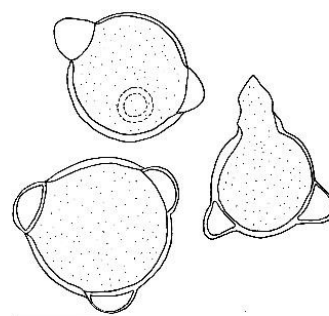


Abbildung 11: *Epilobium angustifolium* L, Pollenkörner einzeln

Am Griffelgrund befindet sich ein Haarkranz aus abstehenden einzelligen Haaren, die Epidermis in der Aufsicht mit länglich polygonalen Zellen ist oft rötlich. An den Leitbündeln sind wieder Raphiden erkennbar, hier handelt es sich bei den dunklen Strukturen um Luftblasen (Abb. 12).



Abbildung 12: *Epilobium angustifolium* L, Aufsicht Narbenbasis

Die Narbeninnenseite ist papillös, medial finden sich (2)3- 4(6) -zellige Haare mit kugeliger oder zumindest runder Endzelle (Abb. 13).

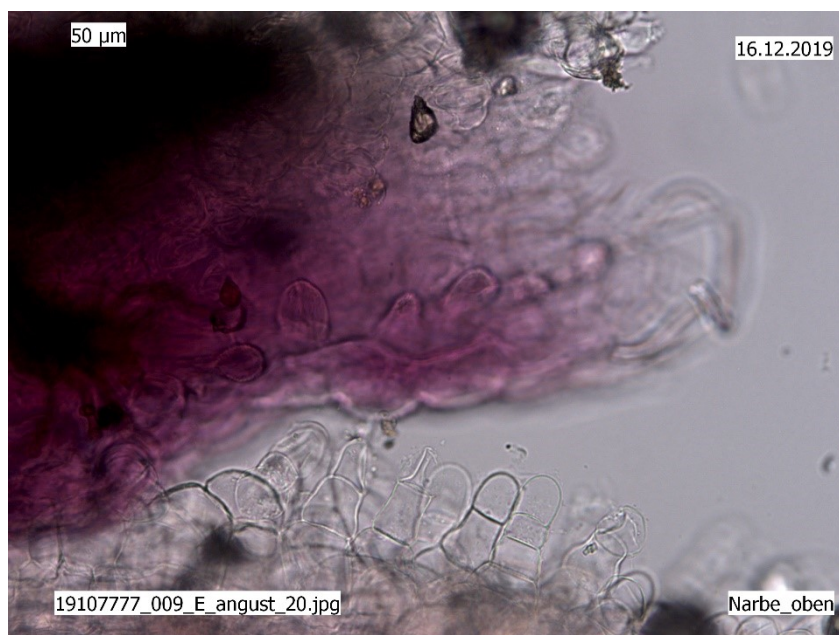


Abbildung 13: *Epilobium angustifolium* L, Aufsicht Narbenschapel innen

Tabelle 9: Durchmesser Pollen und Länge der Deckhaare von *Epilobium angustifolium* L, Einzelmessungen

Nr.:	Durchmesser	Nr.:	Länge
1	85 µm	1	105 µm
2	83 µm	2	85 µm
3	75 µm	3	80 µm
4	95 µm	4	79 µm
5	93 µm	5	81 µm
6	100 µm	6	146 µm
7	80 µm	7	119 µm
8	88 µm	8	110 µm
9	94 µm	9	110 µm
10	105 µm	10	191 µm
11	85 µm	11	130 µm
12	88 µm	12	263 µm
13	99 µm	13	206 µm
14	76 µm	14	244 µm
15	74 µm	15	256 µm
16	89 µm	16	181 µm
17	91 µm	17	194 µm
18	85 µm	18	213 µm
19	94 µm	19	213 µm
20	91 µm	20	144 µm
21	90 µm	21	106 µm
22	69 µm	22	225 µm
23	88 µm	23	169 µm
24	78 µm		
25	65 µm		
26	83 µm		
27	75 µm		
28	95 µm		
29	80 µm		

Der Blütenstiel ist wie der Fruchtknoten dicht angedrückt behaart. An den vier Kanten des Fruchtknotens bzw. der Kapsel befinden sich jeweils ein bikollaterales Gefäßbündel. In der Fruchtwand sind im Tangentialschnitt schlanke langgestreckte Zellen, die darunterliegende Zellschicht um 90° gedreht sichtbar, die besonders im Pulver auffallen (Parkettzellen) (Abb. 14).

Alle Teile sind meist rötlich.

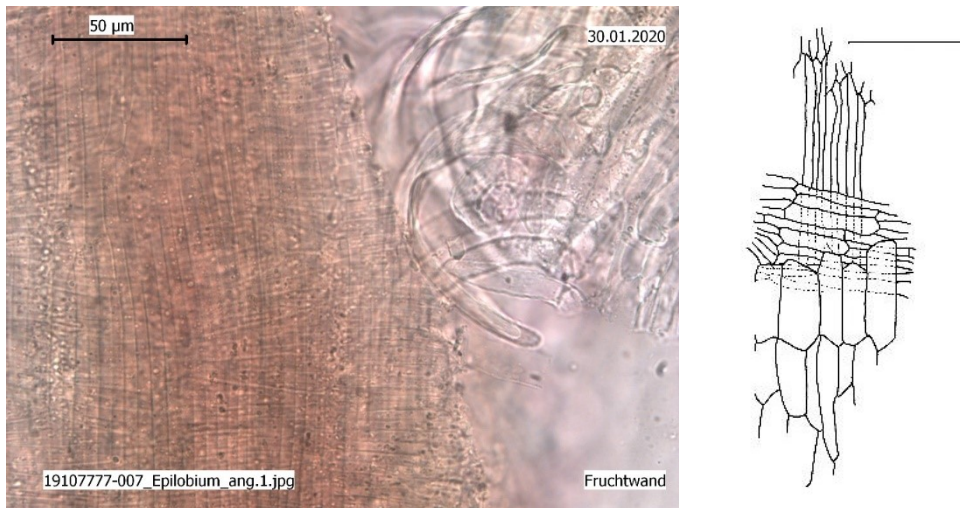


Abbildung 14: *Epilobium angustifolium* L, Fruchtwand tangential

Die Samen sind länglich-oval und hell- bis mittelbraun. Oberseits sitzt ein dichtes Büschel Flughaare. Die Flughaare sind dünnwandig, glatt und sehr lang. Sie lassen sich auch im Pulver als Bruchstücke leicht von den Deckhaaren differenzieren.

Auch im Samen sind Raphidenbündel erkennbar. Die Epidermis der Samenschale ist glatt und besteht aus stets längslang angeordneten länglichen Zellen. Darunter liegt die Kristallzellschicht mit länglichen Zellen, deren Wände perlschnurartig verdickt sind. In diesen Zellen befinden sich mäßig Einzelkristalle. Im Präparat eingeschlossene Luftblasen sind als dunkel umrandete Strukturen sichtbar (Abbildung 15).



Abbildung 15: *Epilobium angustifolium* L, Aufsicht Same

Pulverpräparat Epilobium angustifolium L

Im Pulverpräparat können vor allem Blatteile zur Identifizierung herangezogen werden. Diese finden sich reichlich und tragen die meisten charakteristischen Merkmale.

In Abbildung 16 lassen sich polygonale Epidermiszellen erkennen, es finden sich keine Stomata und keine Haare.



Abbildung 16: *Epilobium angustifolium* L, Blattunterseite im Pulverpräparat

Bei Durchfokussierung zeigt sich deutlich die typische Anordnung der mit Raphidenbündeln gefüllten Idioblasten entlang der Leitbündel (Abbildung 17).

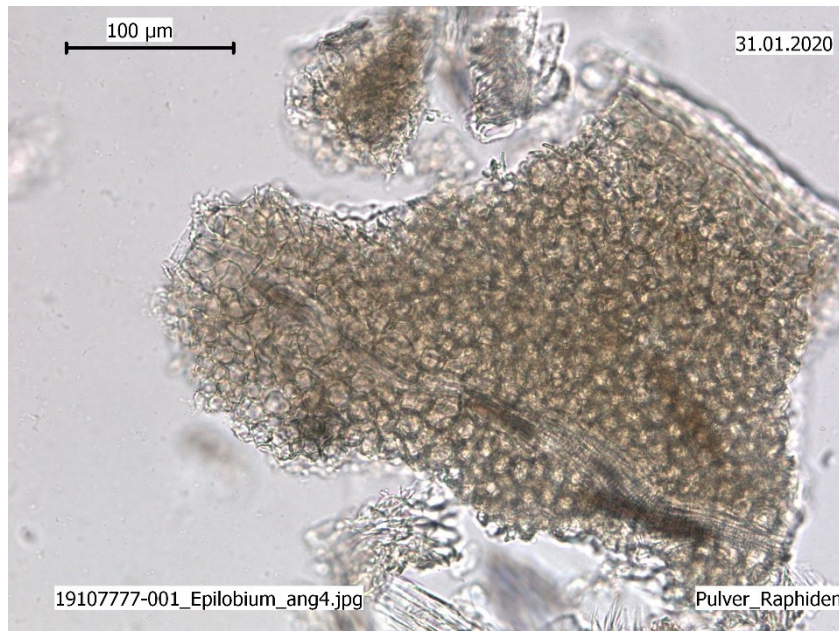


Abbildung 17: Idioblasten entlang der Leitbündel bei *Epilobium angustifolium* L im Pulverpräparat

Weiters sind im Pulverpräparat einzellige Deckhaare neben Bruchstücken der Flughaare, welche von den Samen stammen, sichtbar. Auch finden sich Teile der Testa mit glatten, stets längslang angeordneten Epidermiszellen, welche charakteristisch für das Schmalblättrige Weidenröschen sind. Fragmente der Kronblätter, einzelne Fasern mit Spiral-, Netz- und Tüpfelgefäßen bzw. Übergängen davon und Teile des Endotheciums finden sich häufig, erlauben aber keine sichere Identifizierung.

Epilobium dodonaei Vill

Um die beiden Arten aus der Sectio Chamaenerium voneinander abgrenzen zu können, wurde auch *Epilobium dodonaei* mikroskopisch untersucht bzw. mithilfe von bestehender Literatur verglichen [18].

Die Epidermiszellen der Blattoberseite unterscheiden sich weder in Größe noch Form wesentlich von den Epidermiszellen von *Epilobium angustifolium* L. Auf der oberen Epidermis finden sich polygonal bis gebogene Zellen, die untere Epidermis mit welligen Zellen. Eine den Stomata zulaufende Cuticularstreifung ist deutlich zu erkennen (Abb. 18 und 19).



Abbildung 18: *Epilobium dodonaei* Vill, Blattoberseite mit Stomata und polygonal bis welligen Epidermiszellen

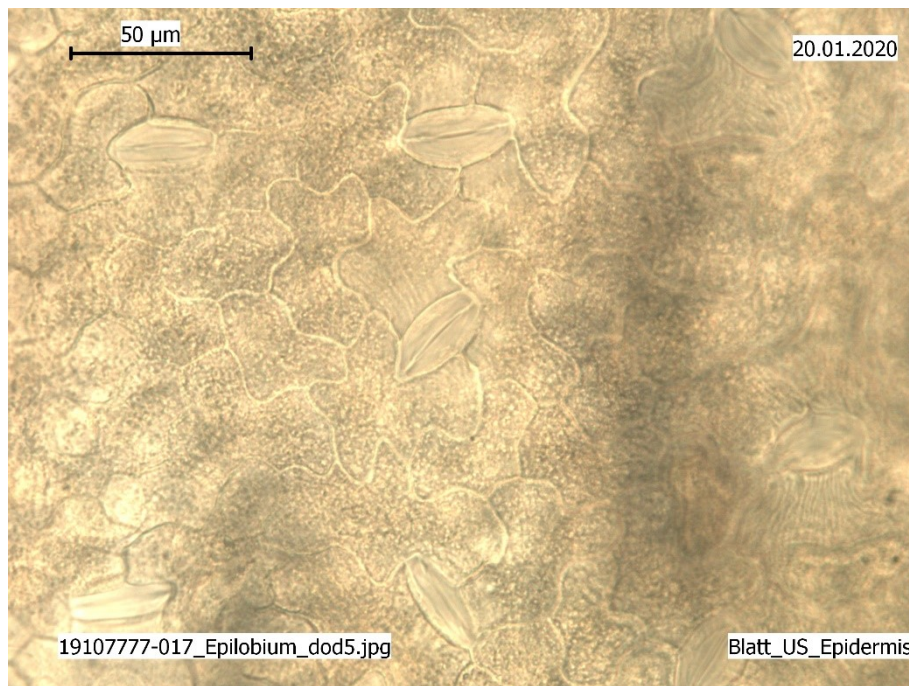


Abbildung 19: *Epilobium dodonaei* Vill, Blattunterseite mit Stomata und welligen Epidermiszellen

Im Unterschied zu *Epilobium angustifolium* kommen bei *Epilobium dodonaei* sowohl auf der Blattober- als auch auf der Blattunterseite anomozytische Stomata vor, auf der Oberseite in höherem Maße [17].

Epilobium dodonaei Vill und *Epilobium fleischeri* Hochst aus der Subsektion *Leiostylae* besitzen im Gegensatz zu allen anderen *Epilobium*-arten einen isolateralen Blattbau. Der Hauptnerv ist stets behaart, am Blattrand und in geringerem Ausmaß auch auf der Blattspreite finden sich ober- und unterseits einzellige, gewarzte Deckhaare mit abgerundeter Spitze (bis 200 µm), welche an der Basis gekrümmt sind. Auch bei *Epilobium dodonaei* Vill kommen keine Drüsenhaare vor.

Im Mesophyll finden sich Idioblasten mit geordneten Raphiden, sowohl quer zur Blattfläche als auch parallel zur Blattfläche orientiert. Dabei handelt es sich vorwiegend um kurze (< 110 µm) oder mittelgroße (120-160 µm) Zellen mit einem hohen Schleimgehalt (Abb. 20 und 21) [17].

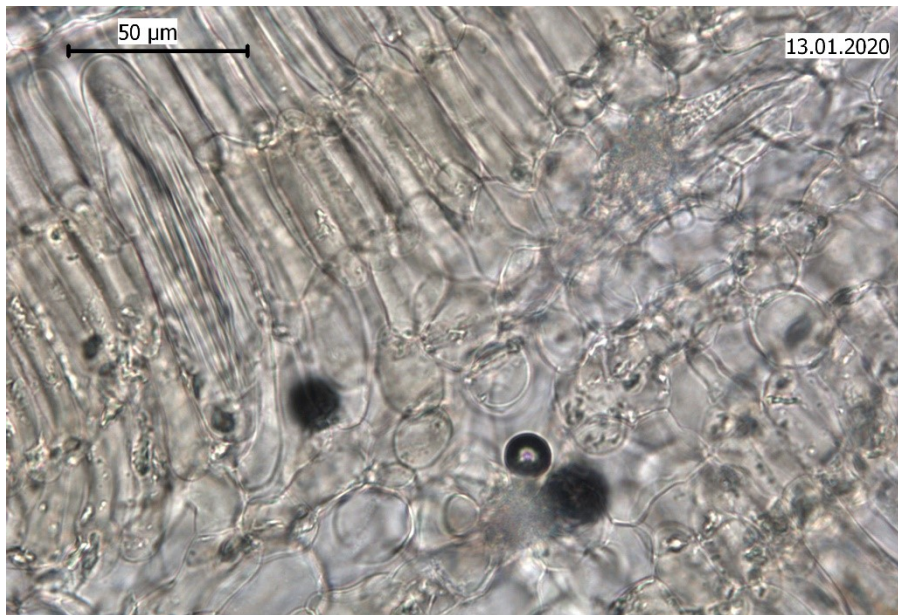


Abbildung 20: *Epilobium dodonaei* Vill, Blatt quer mit raphidenbündelführendem Idioblast quer zur Blattfläche, bei den dunklen Strukturen handelt es sich um Luftblasen

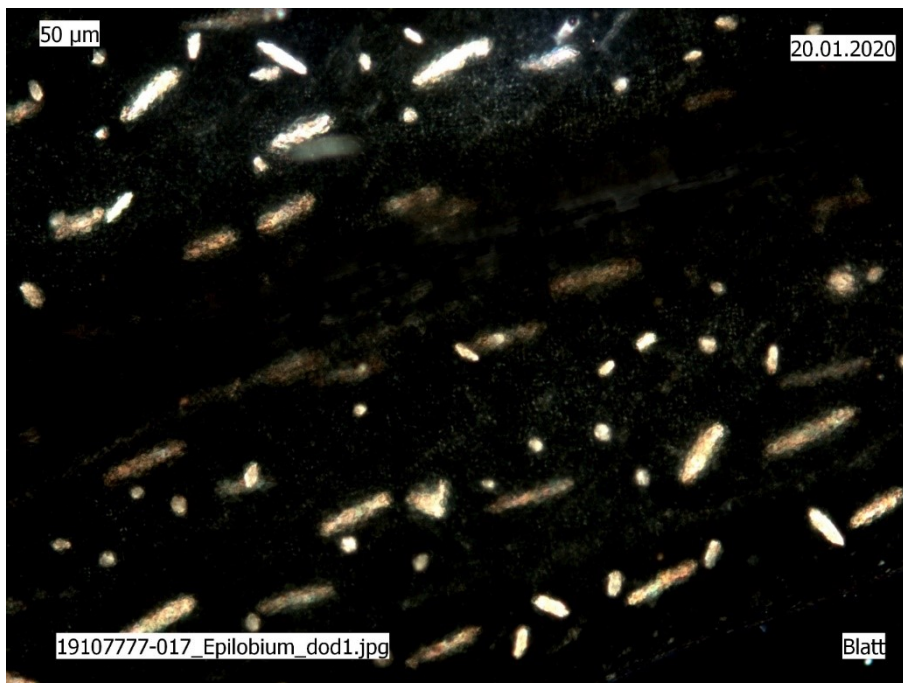


Abbildung 21: *Epilobium dodonaei* Vill, Raphidenbündel im Mesophyll im Polarisationsmikroskop

Ähnlich wie bei *Epilobium angustifolium* L finden sich an der Narbeninnenseite mehrzellige Haare mit runder Endzelle (Abb. 22).

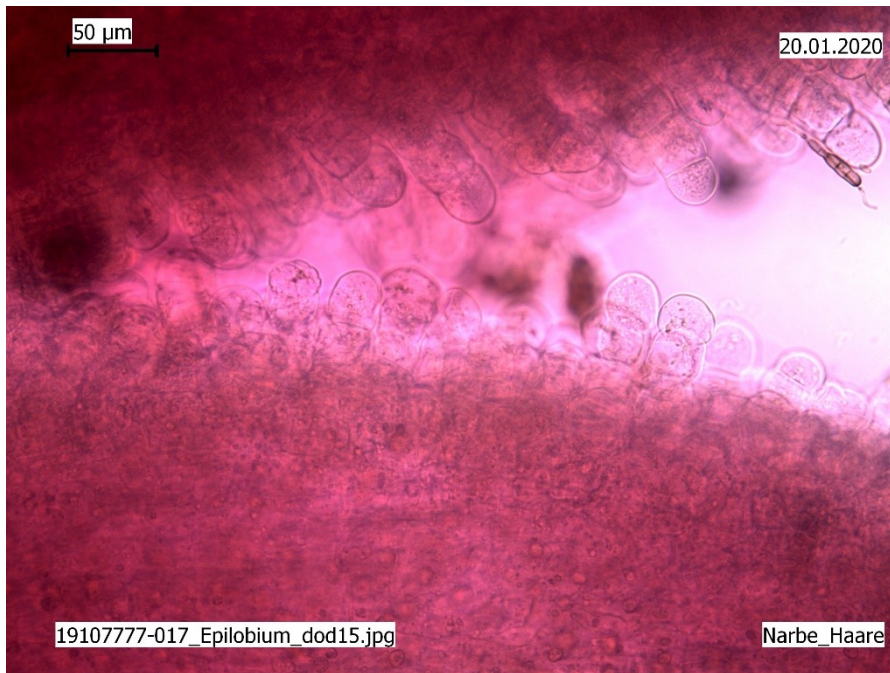


Abbildung 22: *Epilobium dodonaei* Vill, Aufsicht Narbeninnenseite mit mehrzelligen Haaren

Ein weiteres mikroskopisches Unterscheidungsmerkmal ist nach Saukel die Anordnung der Testazellen. Während sie bei *Epilobium angustifolium* L stets längslang angeordnet sind, liegen sie bei *Epilobium dodonaei* Vill ungeordnet vor [18].

Epilobium hirsutum L

Als ein Vertreter der Kleinblütigen Arten unterscheidet sich diese Weidenröschenart makroskopisch, mikroskopisch und phytochemisch von den Vertretern der Sektion *Chamenaerion*, zeigt aber dennoch auch Gemeinsamkeiten mit dieser und nimmt somit eine Sonderstellung in der Sektion *Epilobium* ein [17].

Die bis eineinhalb Meter hohe Pflanze ist hauptsächlich gegenständig beblättert, was der typischen Blattstellung der Sektion *Epilobium* entspricht. Lt. Saukel kommen aber oft schwach zygomorphe Blüten vor, welche ein Merkmal der Sektion *Chamenaerion* sind [17].

Auf allen oberirdischen Teilen finden sich zahlreiche, sehr lange Deckhaare, aber im Gegensatz zu den Großblütigen Arten auch Drüsenhaare. Diese Drüsenhaare sind an der leicht erweiterten Endregion des Haares erkennbar.

Die phytochemischen Besonderheiten werden in 4.6.2 erläutert.

Die Epidermiszellen sind blattober- und unterseits wellig buchtig, es ist keine Kutikularstreifung erkennbar. Die anomozytischen Stomata finden sich auf beiden Seiten, jedoch weitaus weniger auf der Blattoberseite (Abb. 23 und 24).

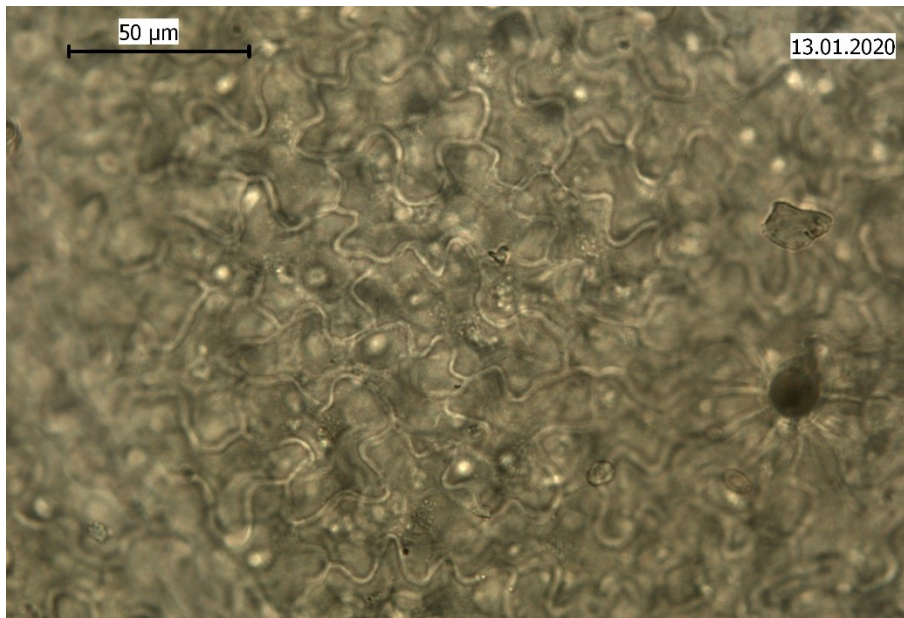


Abbildung 23: *Epilobium hirsutum* L, Blattoberseite mit wellig buchtigen Epidermiszellen und Haarbasis

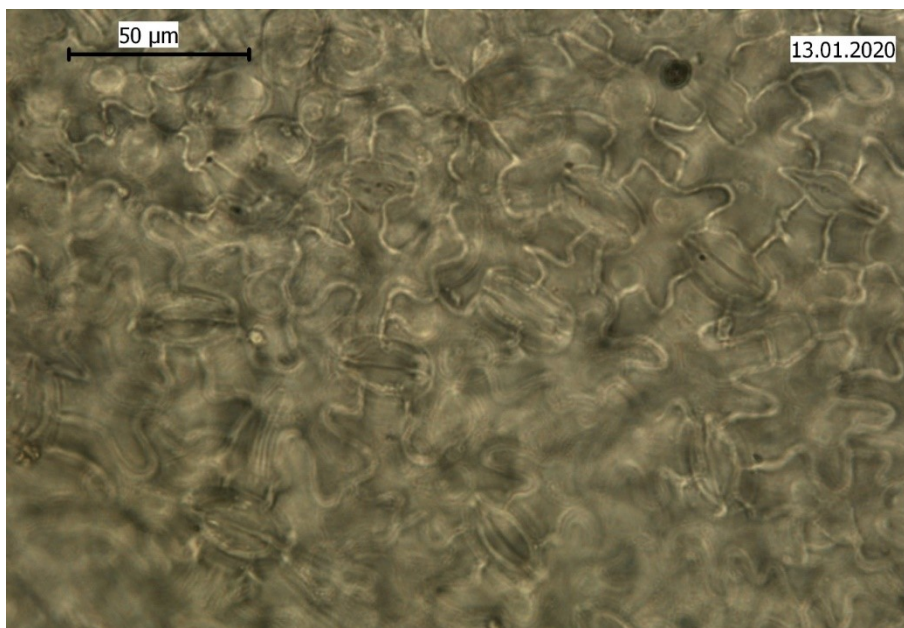


Abbildung 24: *Epilobium hirsutum* L, Blattunterseite mit wellig buchtigen Epidermiszellen und Stomata

Der Blattrand und der Hauptnerv sind relativ stark behaart, die Spreite weniger stark. Es kommen sehr lange (bis 1 mm), einzellige, gerade Deckhaare und gerade abstehende, einzellige Drüsenhaare vor.



Abbildung 25: *Epilobium hirsutum* L., Drüsenhaar auf Kelchblatt

Die mittleren bis langen Idioblasten mit Raphidenbündeln kommen vor allem im Interkostalbereich parallel zur Blattfläche vor (Abb. 26).



Abbildung 26: *Epilobium hirsutum* L., Raphidenbündel im Mesophyll im Polarisationsmikroskop

Auf der Narbeninnenseite befinden sich 2-3 zellige Haare mit spitzer Endzelle, Luftblasen als dunkel umrandete Strukturen erkennbar (Abb. 27).



Abbildung 27: *Epilobium hirsutum* L, mehrzellige Haare an der Innenseite der Narbenschapel mit spitzer Endzelle

Die Samen sind stark papillös und tragen kein Anhängsel. Die Testazellen sind lt. Saukel isodiametrisch bis deutlich rechteckig (Abb. 28) [17].

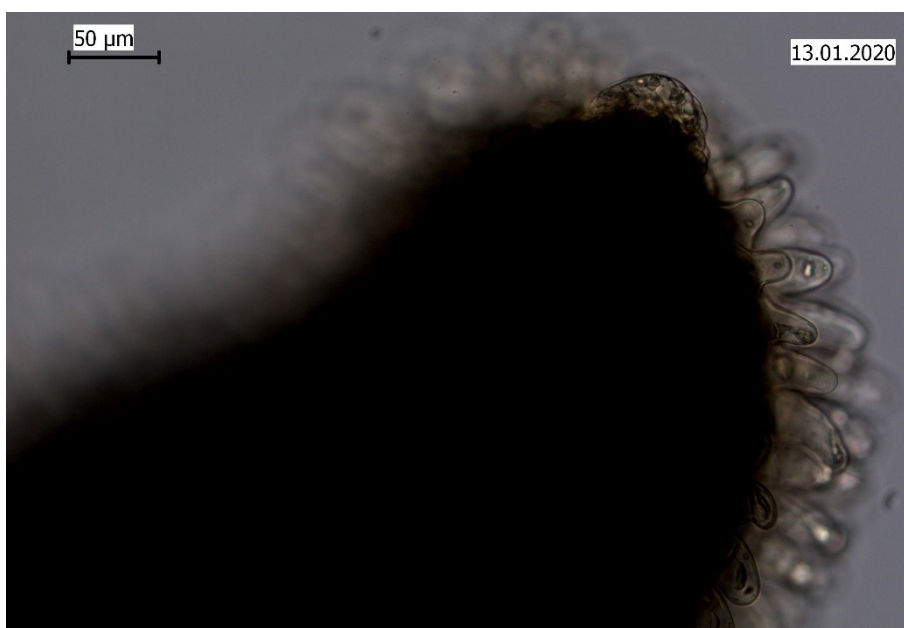


Abbildung 28: *Epilobium hirsutum* L, Testa in der Aufsicht papillös

Herba Epilobii kleinblütig im Pulverpräparat

Im Pulverpräparat herrschen Blattstücke und Sprossanteile vor, auch Teile von Samenschalen sind oft zu erkennen. Vor allem die Blattfragmente geben Aufschluss über die vorliegende Sektion. Blütenanteile sind in den untersuchten Proben nur selten anzutreffen. Im Präparat finden sich lose Idioblasten und einzelne Pollenkörner.

Die Idioblasten mit Raphidenbündel im Interkostalbereich deuten auf das Vorliegen einer Kleinblütigen Weidenröschenart hin (Abbildung 29).

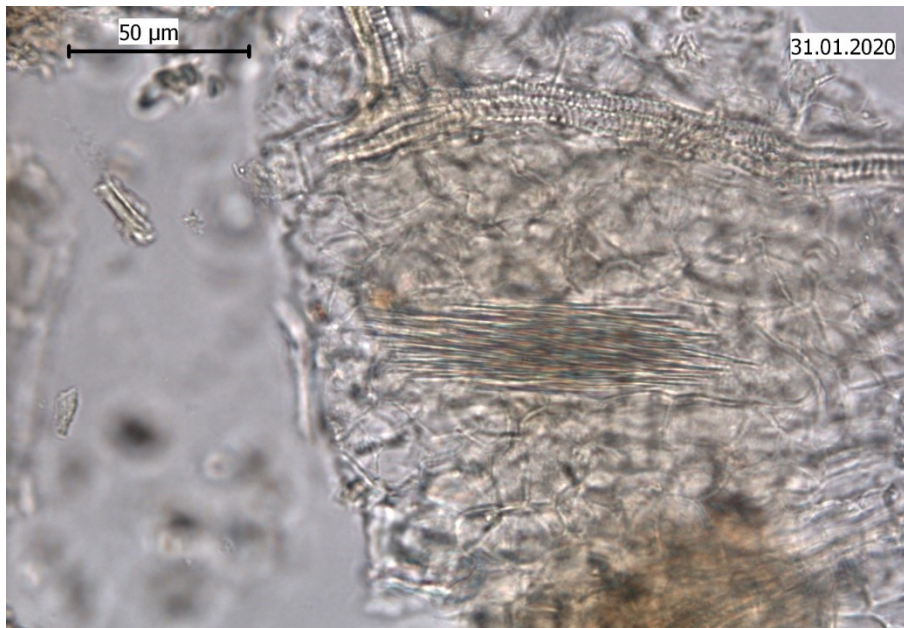


Abbildung 29: Blattaufsicht im Pulverpräparat mit Idioblast

Drüsenhaare fehlen bei allen Großblütigen Arten und sprechen ebenfalls für das Vorhandensein der Sektion *Epilobium* (Abbildung 30).

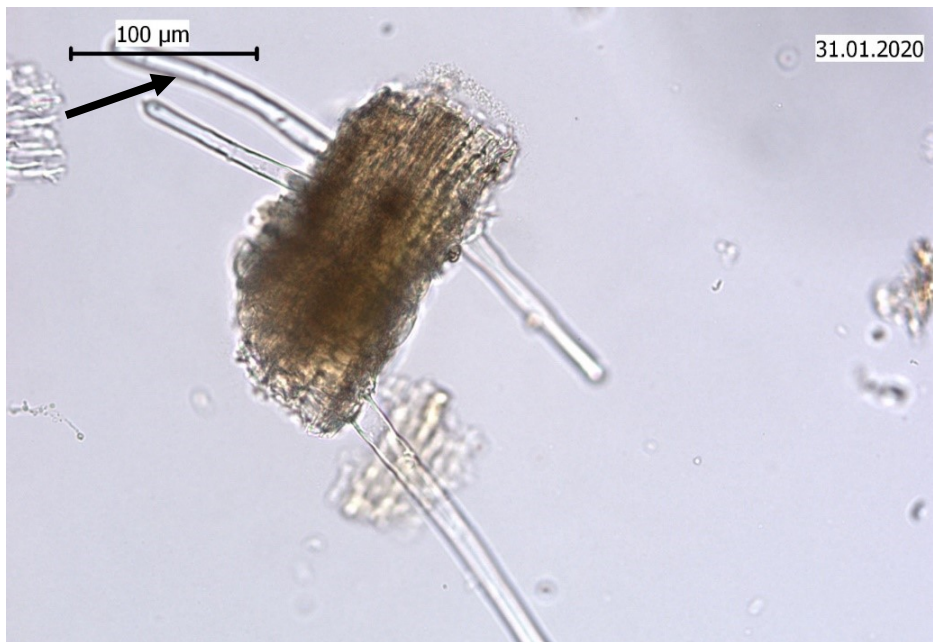


Abbildung 30: Fragment mit einzelligen Drüsenhaaren

Testazellen von *Epilobium angustifolium* L sind lt. Saukel stets längslang angeordnet und glatt. Fragmente der Samenschalen mit Papillen oder isodiametrischen, rechteckigen oder ungeordneten Testazellen stammen nicht von *Epilobium angustifolium* [17].

Einzelkristalle sind zwar auch in Epidermiszellen der Samen von *Epilobium angustifolium* L mäßig zu finden jedoch nicht im Ausmaß des auf Abb. 31 dargestellten Exemplares.

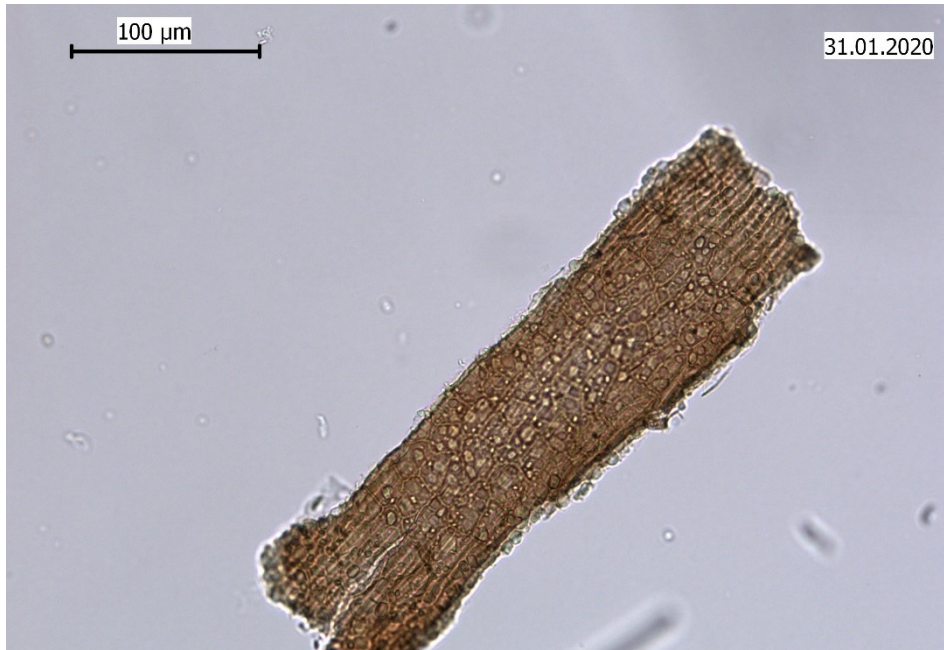


Abbildung 31: Aufsicht Testa mit ungeordneten Zellen und durchscheinenden Einzelkristallen

Der oft im Präparat auffindbare Pollen kann sich in Farbe und Vorkommen von *Epilobium angustifolium* L unterscheiden. Während die rötlichen Pollenkörner in *Epilobium angustifolium* L nur einzeln vorkommen, treten sie bei den Kleinblütigen Arten in Tetraden auf und sind gelblich-weiß gefärbt. Im Pulverpräparat konnte der Pollen jedoch nicht im Tetradenverband beobachtet werden. Die ursprünglichen Farben bleiben durch die Behandlung mit *Choralhydrat R* nur bedingt erhalten und können ebenfalls nicht als zuverlässiges Unterscheidungsmerkmal herangezogen werden.

4.4 Trocknungsverlust

Trocknungsverlust 1 *Epilobium angustifolium* L

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes wurde mit den als *Epilobium angustifolium* L identifizierten Handelsmustern durchgeführt. Die Proben wurden gemahlen und durch das Sieb 710 nach Ph. Eur. 2.1.4 gesiebt [6].

Beim Trocknungsverlust 1 wurde versucht auf Gewichtskonstanz zu trocknen.

Tabelle 10: Rohdaten, Trocknungsverlust 1 absolut

Probennummer	Gewicht 1	Gewicht 2	Gewicht 3	Gewicht 4	Gewicht 5	Gewicht 6
19107777-001	23,30869 g	23,30221 g	23,30183 g	23,30136 g	23,30642 g	23,29828 g
	19,65988 g	19,65395 g	19,65290 g	19,65223 g	19,65676 g	19,64890 g
	19,43480 g	19,42753 g	19,42743 g	19,42711 g	19,43167 g	19,42388 g
19107777-002	20,48725 g	20,48138 g	20,47936 g	20,47863 g	20,48271 g	20,47553 g
	21,83616 g	21,82892 g	21,82824 g	21,82695 g	21,83122 g	21,82409 g
	19,42215 g	19,41573 g	19,41501 g	19,41470 g	19,41743 g	19,41065 g
19107777-004	19,57987 g	19,57363 g	19,57307 g	19,57257 g	19,57604 g	19,56953 g
	19,40966 g	19,40462 g	19,40284 g	19,40076 g	19,40558 g	19,39922 g
	21,00299 g	20,99819 g	20,99643 g	20,99577 g	20,99861 g	20,99230 g
19107777-005	19,78747 g	19,78056 g	19,77944 g	19,77938 g	19,78262 g	19,77596 g
	19,94547 g	19,93883 g	19,93636 g	19,93601 g	19,93975 g	19,93310 g
	20,32162 g	20,31378 g	20,31151 g	20,31162 g	20,31466 g	20,30751 g

Tabelle 11: Rohdaten, Trocknungsverlust 1 relativer Anteil

Pr.Nr.:	Tr.Verl. 2 h	Tr.Verl. 3 h	Tr.Verl. 4 h	Tr.Verl. 5 h	Tr.Verl. 6 h	Tr.Verl. 7 h
19107777-001	7,42%	8,07%	8,11%	8,15%	7,65%	8,46%
	7,39%	7,98%	8,09%	8,15%	7,70%	8,49%
	7,30%	8,02%	8,03%	8,06%	7,61%	8,39%
19107777-002	7,22%	7,80%	8,01%	8,08%	7,67%	8,39%
	7,14%	7,86%	7,93%	8,06%	7,63%	8,34%
	7,15%	7,79%	7,86%	7,89%	7,62%	8,30%
19107777-004	6,68%	7,31%	7,36%	7,41%	7,06%	7,70%
	6,63%	7,14%	7,32%	7,52%	7,04%	7,68%
	6,58%	7,06%	7,24%	7,30%	7,02%	7,65%
19107777-005	6,49%	7,18%	7,29%	7,30%	6,98%	7,64%
	6,39%	7,06%	7,30%	7,34%	6,97%	7,63%
	6,32%	7,10%	7,32%	7,31%	7,03%	7,72%

Nach insgesamt 7 h Trocknungszeit lag immer noch keine Gewichtskonstanz vor. Der Trocknungsverlust befand sich zwischen 7,63% und 8,49%. Die Bestimmung des Trocknungsverlustes wurde wiederholt und auf den Verlust nach einer Trocknungszeit von 2 Stunden festgelegt.

Trocknungsverlust 2 *Epilobium angustifolium*

Tabelle 12: Rohdaten, Trocknungsverlust 2

Probennummer	Tiegel leer 1	Konstantes Gewicht	Einwaage
19107777-001	19,50625 g	19,50624 g	1,00024 g
	18,54230 g	18,54233 g	1,00016 g
	20,02864 g	20,02866 g	1,00020 g
19107777-002	20,90612 g	20,90608 g	1,00066 g
	18,23478 g	18,23480 g	0,95949 g
	23,29668 g	23,29651 g	1,00018 g
19107777-004	20,82030 g	20,82029 g	1,00038 g
	21,15538 g	21,15517 g	1,00024 g
	20,72070 g	20,72065 g	1,00029 g
19107777-005	20,93503 g	20,93486 g	1,00054 g
	19,76890 g	19,76877 g	1,00010 g
	20,93557 g	20,93534 g	1,00030 g

Probennummer	Gewicht 1	Tr.verlust
19107777-001	20,42375 g	8,27%
	19,46026 g	8,22%
	20,94707 g	8,18%
19107777-002	21,81701 g	8,97%
	19,11074 g	8,71%
	24,20641 g	9,03%
19107777-004	21,73989 g	8,07%
	22,07538 g	8,00%
	21,64126 g	7,97%
19107777-005	21,86275 g	7,26%
	20,69650 g	7,24%
	21,86463 g	7,10%

Nach 2 h Trocknen im Trockenschrank bei 105 °C liegt der Trocknungsverlust zwischen 7,10% und 9,03%.

4.5 Asche

Die Bestimmung der Asche wurde als Dreifachbestimmung mit den als *Epilobium angustifolium* L identifizierten Handelsmustern durchgeführt. Die Proben wurden analog zum Trocknungsverlust vorbereitet. Der Aschegehalt beträgt zwischen 5,33% und 5,82%.

Tabelle 13: Rohdaten Asche

Pr.Nr.	Leergewicht Tiegel	Einwaage	Auswaage	Rückstand	% Asche
19107777-001	20,55110 g	1,00016 g	20,60867 g	0,05757 g	5,76%
	19,87214 g	1,00064 g	19,93034 g	0,05820 g	5,82%
	22,45079 g	1,00038 g	22,50815 g	0,05736 g	5,73%
19107777-002	20,60445 g	1,00021 g	20,65776 g	0,05331 g	5,33%
	16,52727 g	1,00020 g	16,57994 g	0,05267 g	5,27%
	20,25481 g	1,00088 g	20,30834 g	0,05353 g	5,35%
19107777-004	19,66196 g	1,00002 g	19,71822 g	0,05626 g	5,63%
	19,90930 g	1,00030 g	19,96536 g	0,05606 g	5,60%
	21,37030 g	1,00026 g	21,42624 g	0,05594 g	5,59%
19107777-005	19,74992 g	1,00018 g	19,80447 g	0,05455 g	5,45%
	19,40448 g	1,00027 g	19,45908 g	0,05460 g	5,46%
	20,07125 g	1,00044 g	20,12602 g	0,05477 g	5,47%

4.6 Dünnschichtchromatographie

4.6.1 Auswahl eines Systems

Für *Epilobii herba* sind in der Literatur DC-Systeme zur Identitätsprüfung publiziert [9]. Für den chromatographischen Fingerprint erscheinen die Flavonoide gut geeignet. Das DC-System aus [28] konnte nach Überprüfung weitgehend übernommen werden. Die Herstellung der Untersuchungslösung, mobile und stationäre Phase, die Referenzlösungen, Derivatisierung mit Diphenylboryloxyethylamin und Polyethylenglykol 400 und Auswertung des Chromatogramms bei UV₃₆₆ wurden nicht verändert [28].

Insgesamt wurden sechs Proben von *Epilobium angustifolium* L aus eigenen Aufsammlungen, zwei Proben von *Epilobium hirsutum* L aus eigener Aufsammlung und zwei Proben von *Epilobium dodonaei* Vill ebenfalls aus eigener Aufsammlung, alle fünf *Epilobium angustifolium* L Handelsmuster, der Kleinblütige Mix aus eigener Aufsammlung und zwei *Epilobii herba* Handelsmuster mittels DC untersucht.

Die Untersuchungslösungen wurden mit der Hand bandförmig aufgetragen, nach Trocknung erfolgte das Aufsprühen der Detektionsreagenzien mit dem CAMAG Derivatizer und anschließend wurde bei UV₃₆₆ mit dem CAMAG Visualizer ausgewertet.

Kammersättigung

Der Gasraum in der Trennkammer kann wesentlichen Einfluß auf die Ergebnisse eines Chromatogramms nehmen. Nach den Vorgaben des Europäischen Arzneibuches für die Dünnschichtchromatographie erfolgt die Sättigung der Kammeratmosphäre mittels eines Filterpapieres, das blasenfrei an eine Wand der mit dem entsprechenden Fließmittel befüllten Trennkammer gelegt wird. Die Kammer wird verschlossen und 1 h bei 20 -25° C so belassen. Ist in einer Einzelmonographie des Europäischen Arzneibuchs nichts anderes angegeben, ist eine Kammersättigung obligat [6].

Die Sättigung der Kammeratmosphäre stellt einen Schritt dar, der mit einem nicht unerheblichen Zeitaufwand verbunden ist. Deshalb wurde untersucht, ob dadurch eine Verbesserung der Leistung erhalten werden kann, welche diesen Schritt rechtfertigt.

Bei Wichtl, der in der Monographie für *Epilobii herba* auf Hiermann [9] verweist, wird ohne Kammersättigung gearbeitet und die Platte nach der Entwicklung mit Wärme getrocknet [28].

Die Ergebnisse der Entwicklung mit oder ohne Kammersättigung und einer anschließenden Trocknung auf einem Plattenheizer bei 100- 105 °C werden auf den Abb. 32 I und II dargestellt.

Alle Proben jeweils auf Abb. 32 I bzw. II zeigen das gleiche Muster, unterscheiden sich aber in den Intensitäten. Bei den Proben handelt es sich bei 1 und 2 um *Epilobium angustifolium* L aus eigenen Aufsammlungen und bei 5 und 6 um Handelsmuster der gleichen Weidenröschenart.

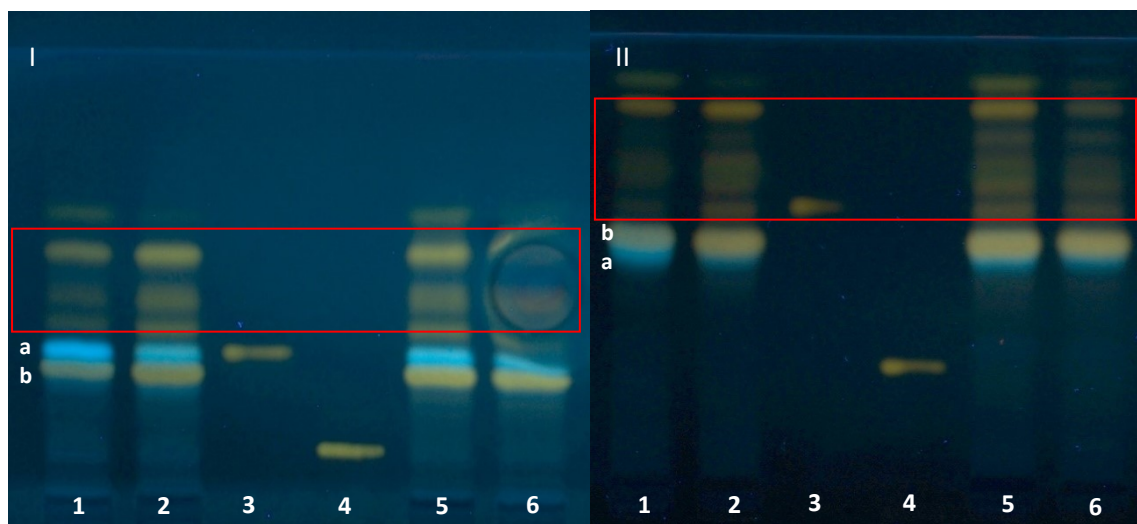


Abbildung 32: DC *Epilobium angustifolium* L, betrachtet bei 366 nm I: mit Kammer'sättigung
II: ohne Kammer'sättigung a: Chlorogensäure, b: Quercetinglucuronid

- 1 19107777-009
- 2 19107777-012
- 3 Hyperosid
- 4 Rutin
- 5 19107777-004
- 6 19107777-002

Die Referenzsubstanzen Hyperosid (3) und Rutin (4) erscheinen deutlich orange, Rutin mit dem kleineren Rf-Wert.

Bei der Entwicklung mit Kammer'sättigung erscheint eine blaue Zone auf Höhe des Hyperosids über der ersten deutlichen orangen Zone, bei der Entwicklung ohne Kammer'sättigung ist es umgekehrt. Die blaue Zone kann als Chlorogensäure (a), die orange (b) als Quercetinglucuronid identifiziert werden. Bei Hiermann findet sich die Zone des Quercetin-glucuronids inmitten zweier blauer Zonen bzw. überdeckt in diesem Bereich eine breite blaue Zone [9].

Insgesamt sind auf Abb. 32 II mehr getrennte Zonen als auf I zu erkennen. Besonders die Trennung der im Rf-Bereich von ca. 0,4-0,8 (rot umrandet) erscheinenden Substanzen ist mit Kammer'sättigung schlechter als ohne Kammer'sättigung.

Bei der Entwicklung mit Kammer'sättigung ergeben sich niedrigere Rf-Werte als ohne Kammer'sättigung.

Trocknung nach Entwicklung

Abb. 33 I und II zeigen einen Vergleich der Trocknung bei Raumtemperatur nach der Entwicklung mit oder ohne Kammer'sättigung.

Bei den beiden Positionen 1 und 2 handelt es sich um zwei Proben *Epilobium angustifolium* L aus eigener Aufsammlung, Hyperosid in Position 3, Rutin in 4, in 5 und 6 Handelsmuster des Schmalblättrigen Weidenröschens.

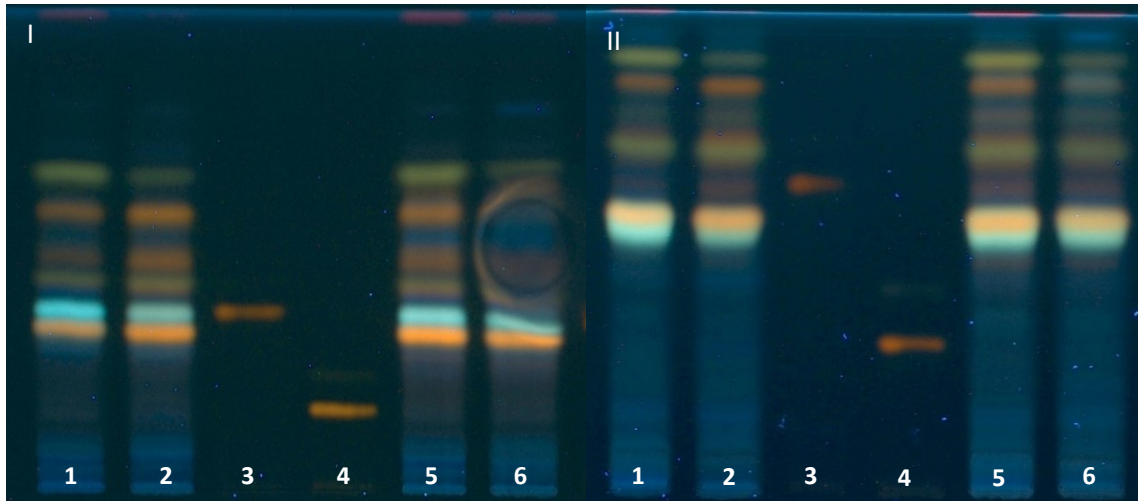


Abbildung 33: DC von *Epilobium angustifolium* L, Trocknung bei Raumtemperatur, betrachtet bei 366 nm
I: mit Kammersättigung II: ohne Kammersättigung

- 1 19107777-009
- 2 19107777-012
- 3 Hyperosid
- 4 Rutin
- 5 19107777-004
- 6 19107777-002

Sowohl in der gesättigten als auch in der ungesättigten Kammer entstehen ohne Erhitzen nach der Entwicklung schärfere Bilder. Die Zonen erscheinen besser getrennt und klarer abgegrenzt.

Bei der Entwicklung mit Kammersättigung ergeben sich insgesamt niedrigere Rf-Werte. Im Bereich über der gelben Zone mit dem höchsten Rf-Wert sind hier noch drei unterschiedlich deutliche blaue Flecke zu erkennen, welche im ohne Kammersättigung entwickelten Chromatogramm nicht als getrennt zu beobachten sind.

Die Chromatogramme, welche mit Kammersättigung und Trocknung nach der Entwicklung bei Raumtemperatur entstanden, zeigen klarer abgegrenzte Flecke. Die für die sichere Identifizierung von *Epilobium angustifolium* relevanten Zonen im Rf-Bereich unter 0,4, Quercetinglucuronid für *Epilobium angustifolium* und Myricetingalaktosid für die kleinblütigen Arten bzw. auch *Epilobium dodonaei*, erscheinen deutlicher getrennt (siehe Abbildung 35). Die im Rf-Bereich zwischen 0,4 und 0,8 (siehe Abbildung 32) getrennten Substanzen sind, obwohl ohne Kammersättigung besser getrennt, für eine sichere Abgrenzung nicht geeignet, da sie in allen Arten nachgewiesen werden können.

4.6.2 Identitätsprüfung

Um die Eignung dieses chromatographischen Systems für die Identitätsprüfung zu testen, wurden Muster von *Epilobium angustifolium* mit Mustern anderer *Epilobium*-Arten verglichen.

Für alle folgenden Chromatogramme wurden die Untersuchungslösungen mit dem CAMAG Auftragegerät (Automatic TLC Sampler) aufgebracht und in einer Doppeltröglammer (10 cm x 20 cm) über eine Laufstrecke von 8 cm mit Kammersättigung entwickelt. Nach dem Trocknen im Abzug bei Raumtemperatur wurden die Platten im CAMAG Derivatizer mit den in 4.6.1 genannten Reagenzien besprüht und anschließend bei UV₃₆₆ betrachtet.

Abb. 34 zeigt in Position 1-3 Proben dreier Handelsdrogen des Schmalblättrigen Weidenröschens und in 4-5 und 7-10 Proben von *Epilobium angustifolium* L aus eigenen Aufsammlungen. In Position 6 befinden sich die Referenzsubstanzen. Diese wurden um Quercitrin ergänzt und in einer Mischung chromatographiert. Die Referenzsubstanzen zeigen sich als orange Zonen. Mit dem niedrigsten R_f-Wert erscheint Rutin, gefolgt von Hyperosid und mit dem höchsten R_f-Wert Quercitrin.

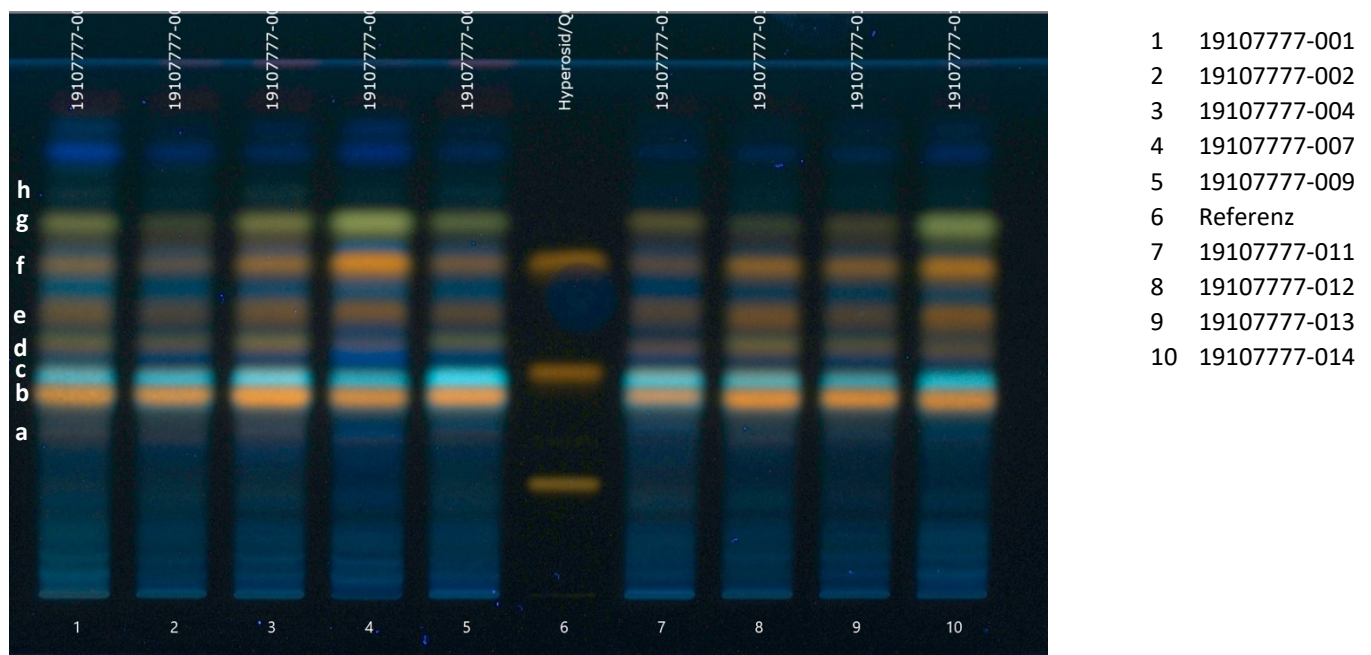


Abbildung 34: DC verschiedener *Epilobium angustifolium* L Proben, a-h siehe Text

Alle Proben zeigen ein einheitliches Muster und unterscheiden sich nur in den Intensitäten.

Mit aufsteigendem R_f-Wert handelt es sich bei der ersten schwachen orangen Zone (a) nach Rutin wahrscheinlich um Myricetin-3-O-β-D-glucuronid, welches lt. Hiermann et al. nur in *Epilobium angustifolium* L. vorkommt. Dessen Konzentration ist nach Baert et al. populationsabhängig und außerdem spezifisch für die Blätter. Der R_f-Wert stimmt mit dem von Lachinger gefundenen R_f-Wert überein [2, 9, 12].

Die nächste sehr intensive orange Bande (b) kann nach Lachinger als Quercetin-3-O- β -D-glucuronid identifiziert werden. Es handelt sich dabei um das Hauptflavonoid in *Epilobium angustifolium* L, auch dieses kann nach Hiermann nur in *Epilobium angustifolium* L gefunden werden [9, 12].

Dann folgt die hellblau fluoreszierende Zone (c) der Chlorogensäure.

Mit aufsteigendem Rf-Wert die Glycoside des Quercetintyps Hyperosid (d), Isoquercitrin (e) und Guajaverin (f) [12].

Die gelbe Zone mit in den verschiedenen Proben stark unterschiedlicher Intensität (g) müsste nach Lachinger Quercetin-3-O- β -D-rhamnosid sein. Dieses Flavonoid kommt nach Baert ausschließlich in den Blüten von *Epilobium spp.* vor. Das deckt sich auch mit der Beobachtung, dass die Proben mit intensiverer Zone mehr Blüten enthalten [2, 12].

Dies gilt auch für die nächste blaue Zone (h), eventuell Kämpferol-3-O- β -D-rhamnosid, auch nur in den Blüten vorhanden.

Nach Baert et al. machen Quercetin-3-O-rhamnosid, Myricetin-3-O-rhamnosid und Kämpferol-3-O-rhamnosid mit 70-85% den Hauptflavonoidanteil der Blüten von *E. angustifolium* aus [2].

Unter den gleichen Bedingungen wurden verschiedene *Epilobium*-Arten chromatographiert (Abb. 35).

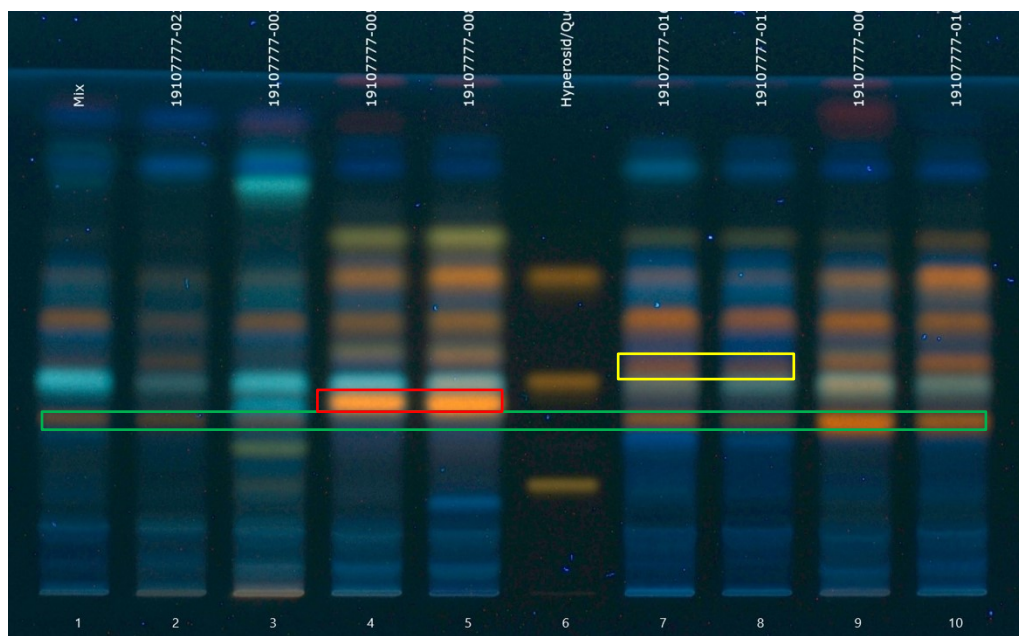


Abbildung 35: DC verschiedener *Epilobium*arten, farbig umrandete Bereiche siehe Erklärung im Text

1	Mix	Mischung kleinblütiger Arten	Eigene Aufsammlung
2	19107777-021	<i>Epilobii herba</i> kleinblütig	Handelsmuster
3	19107777-003	<i>Epilobium angustifolium</i>	Handelsmuster
4	19107777-005	<i>Epilobium angustifolium</i>	Handelsmuster
5	19107777-008	<i>Epilobium angustifolium</i>	Eigene Aufsammlung

6	Referenz		
7	19107777-016	<i>Epilobium dodonaei</i>	Eigene Aufsammlung
8	19107777-017	<i>Epilobium dodonaei</i>	Eigene Aufsammlung
9	19107777-006	<i>Epilobium hirsutum</i>	Eigene Aufsammlung
10	19107777-010	<i>Epilobium hirsutum</i>	Eigene Aufsammlung

Bei Position 1 in Abbildung 35 handelt es sich um den aus Pflanzen eigener Aufsammlung hergestellten Mix von Kleinblütigen Arten, in Position 2 um *Epilobii herba*, einer Handelsdroge, die ausschließlich aus Kleinblütigen Arten besteht. Die Sektion *Chamenaerion* und auch *Epilobium hirsutum* L würden nach Wichtl eine Verunreinigung darstellen [28].

Position 3 und 4 zeigen Proben von Handelsdrogen, deklariert als *Epilobium angustifolium* L, Position 5 der gleichen Art aus eigener Aufsammlung. In Position 3 ist eine deutliche Abweichung vom typischen Muster des Schmalblättrigen Weidenröschens erkennbar. Es entspricht teilweise dem der Kleinblütigen Arten und enthält weiters zusätzliche Zonen, die weder bei der Sektion *Chamenaerion* noch bei *Epilobium* zu finden sind. Die für *Epilobium angustifolium* L charakteristische Zone des Quercetin-glucuronids (rot umrandet) fehlt.

Epilobium dodonaei Vill wurde in Positionen 7 und 8 aufgetragen, *Epilobium hirsutum* L in Positionen 9 und 10.

In Position 6 mit aufsteigendem Rf-Wert die Referenzsubstanzen Rutin, Hyperosid und Quercitrin.

Bei 1, 2, 3, 7, 8, 9 und 10 findet sich mit dem niedrigsten Rf-Wert eine orange Bande (grün umrandet) auf gleicher Höhe, die nach Lachinger der des Myricetin-3-O- β -D-galaktosid entspricht. Diese fehlt bei den *Epilobium angustifolium* -Proben in Position 4 und 5 [12].

Bei 7 und 8 (*E. dodonaei*) tritt knapp über der Chlorogensäure eine orange Bande (gelb umrandet) auf, bei der es sich nach Lachinger um die des Myricetin-3-O-(6"-O-galloyl)- β -D-galaktosid handelt. Auch diese gibt es bei *E. angustifolium* nicht [12].

Die Bahnen in Position 9 und 10 zeigen Charakteristika sowohl von *Epilobium angustifolium* L als auch der Kleinblütigen Arten. Im Bereich oberhalb der in allen Proben zu findenden blauen Bande der Chlorogensäure gleicht das Muster dem des Schmalblättrigen Weidenröschens (Pos. 4 und 5). Knapp darunter fehlt jedoch die für diese Art charakteristische Zone des Quercetin-glucuronids, stattdessen tritt wiederum darunter die für die Kleinblütigen Arten typische Zone des Myricetin-3-O- β -D-galaktosids deutlich auf. Es handelt sich hierbei um Proben von *Epilobium hirsutum* L, welches, wie bereits bei der mikroskopischen Untersuchung erwähnt, Merkmale sowohl der Klein- als auch der Großblütigen Arten zeigt.

4.6.3 Reinheitsprüfung

Um festzustellen, ob eine Reinheitsprüfung mittels DC möglich ist, wurden Mischungen aus Proben Kleinblütiger Arten und einer Probe von *Epilobium angustifolium* L hergestellt. Eine Handelsdroge des Schmalblättrigen Weidenröschens wurde in unterschiedlichen Verhältnissen mit dem Handelsmuster *Epilobii herba* versetzt.

	Epilobii herba kleinblütig:	<i>Epilobium angustifolium</i> :
M1:	19107777-021 50%	19107777-004 50%
M2:	19107777-021 30%	19107777-004 70%
M3:	19107777-021 10%	19107777-004 90%

Unter den genannten Bedingungen wurden diese Mischungen und jeweils die beiden ungemischten Komponenten untersucht.

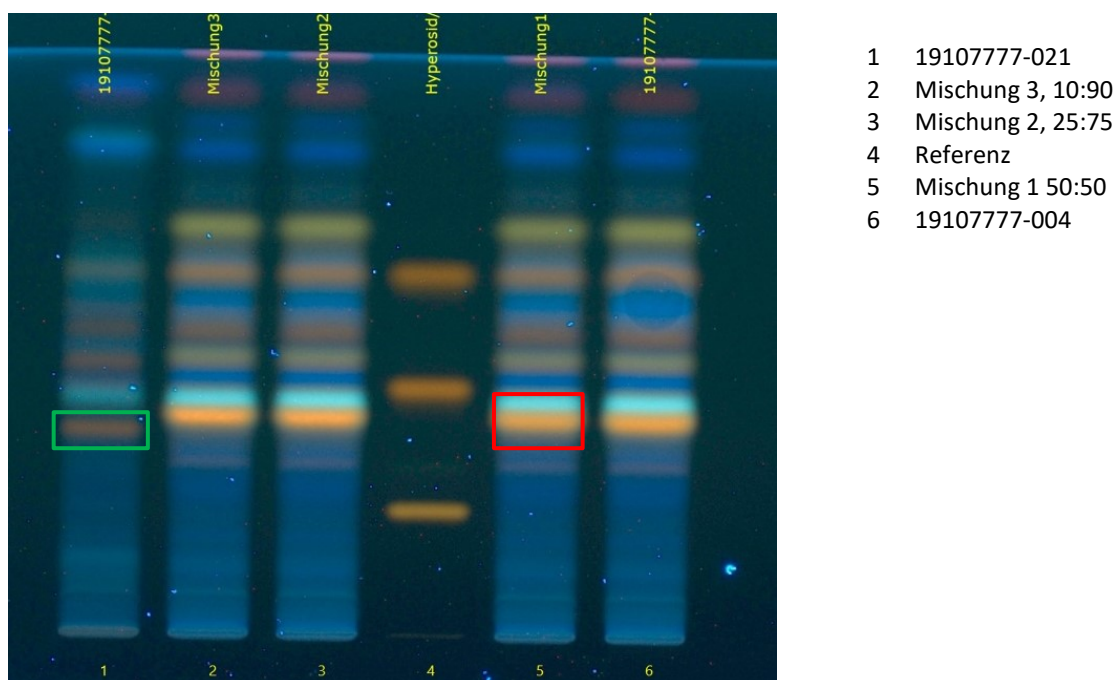
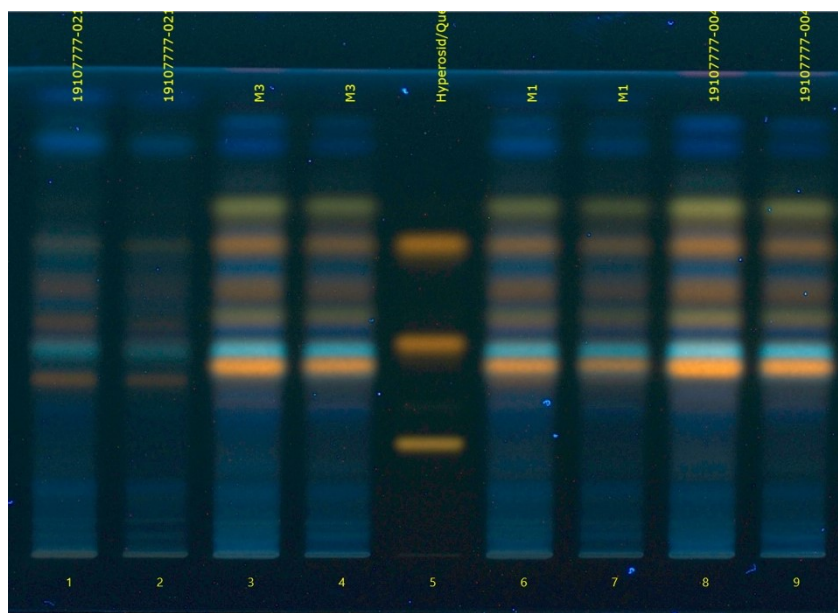


Abbildung 36: DC von *Epilobium angustifolium* L, *Epilobii herba* kleinblütig und Mischungen in verschiedenen Verhältnissen. Grün umrandet: Myricetingalaktosid Rot umrandet: Quercetinglucuronid

Die Beimengung von *Epilobii herba* kleinblütig lässt sich bestenfalls bei Mischung 1 (50:50) erahnen (Abb. 36). Die für *Epilobium angustifolium* typische Zone des Quercetinglucuronids erscheint hier eventuell verlängert (rot umrandet). Die grün umrandete Zone kennzeichnet das für die kleinblütigen Arten charakteristische Myricetingalaktosid.

Um der Bande des Quercetin-3-O- β -D-glucuronids die Dominanz zu nehmen, wurde auch eine geringere Auftragemenge von 3 μ l versucht (Abb. 37).



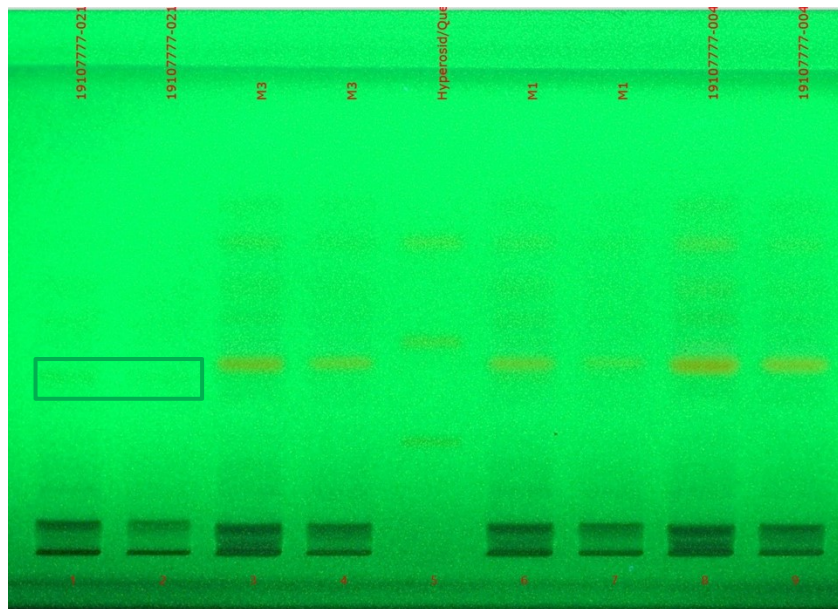
- 1 19107777-021 6 μ l
- 2 19107777-021 3 μ l
- 3 Mischung 3 6 μ l
- 4 Mischung 3 3 μ l
- 5 Referenz
- 6 Mischung 1 6 μ l
- 7 Mischung 1 3 μ l
- 8 19107777-004 6 μ l
- 9 19107777-004 3 μ l

Abbildung 37: DC von *Epilobium angustifolium* L, *Epilobii herba* kleinblütig und Mischungen in unterschiedlichen Verhältnissen, Vergleich verschiedener Auftragemengen, betrachtet bei 366 nm

Bei UV₃₆₆ gleicht das Ergebnis Abb. 36. Die geringere Auftragemenge wirkt sich nicht auf eine bessere Erkennbarkeit der Bande des Myricetingalaktosids aus.

Das Muster der *E. angustifolium* Probe ist auch bei der kleineren Auftragemenge ausreichend erkennbar.

Bei Betrachtung unter UV₂₅₄ ist bei Probe *Herba Epilobii* 100% in Position 1 (6 µl Auftragemenge) eine schwache Löschung im Bereich des Myricetingalaktosids zu erkennen, bei der reduzierten Auftragemenge, Position 2, keine mehr (Abb. 38 grün umrandeter Bereich).



- 1 19107777-021 6 µl
- 2 19107777-021 3 µl
- 3 Mischung 3 6 µl
- 4 Mischung 3 3 µl
- 5 Referenz
- 6 Mischung 1 6 µl
- 7 Mischung 1 3 µl
- 8 19107777-004 6 µl
- 9 19107777-004 3 µl

Abbildung 38: DC von *Epilobium angustifolium* L, *Epilobii herba* kleinblütig und Mischungen in unterschiedlichen Verhältnissen, Vergleich verschiedener Auftragemengen, betrachtet bei 254 nm. Der grün umrandete Bereich kennzeichnet die Zone des Myricetingalaktosids.

Die Mischungen zeigen nur das Muster der *E. angustifolium* Komponente.

Die Betrachtung bei Tageslicht zeigt bei Auftragsposition 6, Mischung 1 (50:50) 6 µl, leicht die Bande des Myricetingalaktosids (rot umrandet). Bei Mischung 1 3µl, Mischung 3 (10:90) 6 und 3 µl ist diese nicht erkennbar (Abb. 39).

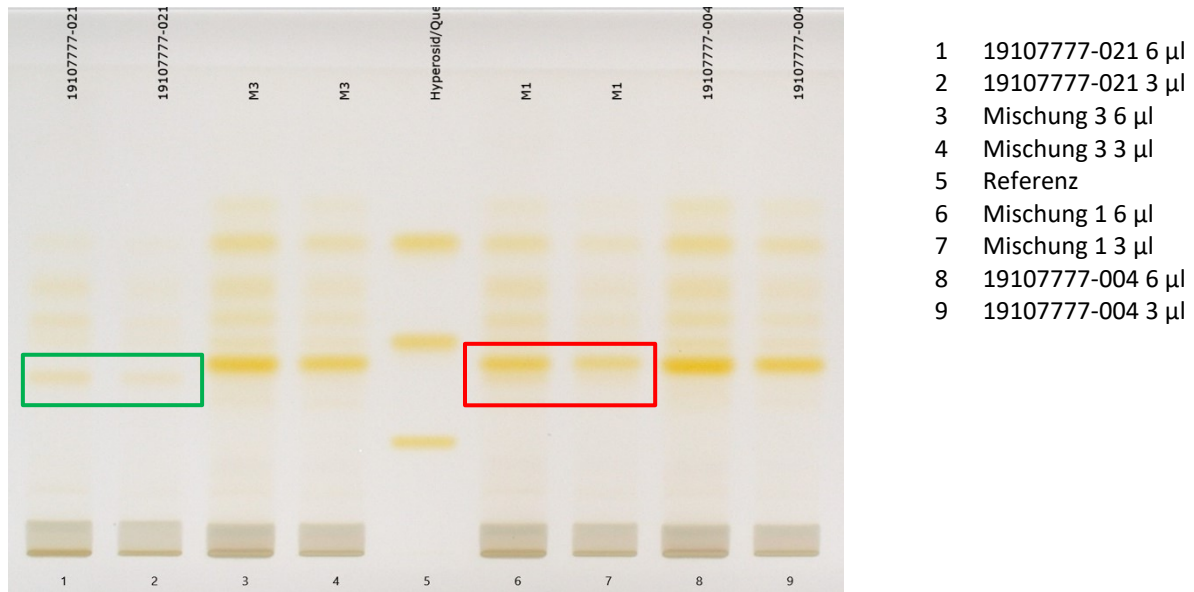


Abbildung 39: DC von *Epilobium angustifolium* L, *Epilobii herba* kleinblütig und Mischungen in unterschiedlichen Verhältnissen, Vergleich verschiedener Auftragemengen, betrachtet bei Tageslicht. Der rot umrandete Bereich zeigt Quercetinglucuronid mit dem höheren Rf-Wert bzw. Myricetingalaktosid knapp darunter, der grün umrandete Bereich kennzeichnet das Myricetingalaktosid.

Eine Verunreinigung von *E. angustifolium* mit Kleinblütigen Arten kann mittels DC nicht erkannt werden.

4.6.4 Anpassung des Systems an neue Standards der Ph. Eur. – HPTLC

Um den neuen Anforderungen an die Monographie *Herba Epilobii angustifolii herba* durch das Europäische Arzneibuch gerecht zu werden, sollte die Dünnschichtchromatographie durch die High Performance Thin Layer Chromatography ersetzt werden (Ph. Eur. Methode 2.8.25). Diese Methode unterscheidet sich von der DC nach Ph. Eur. Monographie 2.2.27 durch mehrere Details, die einerseits die Reproduzierbarkeit der Prüfung erhöhen und andererseits eine semiquantitative Einschätzung erlauben.

Die Verwendung von HPTLC-Platten anstelle von DC-Platten führt im Allgemeinen zu einer verbesserten Trennleistung bei meist kürzeren Analysenzeiten. HPTLC-Platten zeichnen sich durch eine engere Verteilung der Korngröße des Sorptionsmaterials aus. Da die Trennleistung wesentlich durch die mittlere Korngröße und die Verteilung dieser um einen Median abhängt, kann durch eine engere Korngrößenverteilung ein aussagekräftigeres und genaueres Ergebnis erzielt werden [8].

Untersuchungslösung und Referenzsubstanzen werden von einem geeigneten Auftragegerät aufgetragen. Damit werden Fehler, wie die Verletzung der Schicht, falsche Auftragemengen oder andere menschliche Irrtümer verhindert.

Das Europäische Arzneibuch sieht nach der Auftragung der Substanzen eine Konditionierung der Platte vor. Dazu wird die Platte für 1 h gemeinsam mit einer gesättigten Lösung von Magnesiumchlorid *R* in einen geschlossenen DC-Trog gestellt [6].

Die Aktivität der stationären Phase ist unter anderem von ihrem Wassergehalt abhängig. In einem geschlossenen Gefäß entstehen im Luftraum über einer gesättigten Salzlösung definierte Luftfeuchtigkeiten und verursachen auf der eingestellten Platte eine einheitliche Aktivität, die zu reproduzierbaren Ergebnissen führt [8].

Den Intensitätsmarker bilden eine oder mehrere Substanzen in der Referenzlösung, welche zu unterschiedlichen Konzentrationen verdünnt werden. Sie erlauben eine präzisere Beschreibung der Intensitäten der Zonen im erhaltenen Chromatogramm.

Dazu werden zwei Referenzlösungen hergestellt. In Referenzlösung a bleibt die ursprüngliche Konzentration erhalten (je 5 mg Hyperosid *R* und Quercitrin *R* in 5 ml Methanol *R*), für Referenzlösung b werden 2,5 ml von Referenzlösung a mit Methanol *R* zu 10 ml verdünnt. Anhand der Intensität der erhaltenen Zonen des Intensitätsmarkers werden die Zonen der Untersuchungslösung als intensiv, schwach oder sehr schwach beurteilt.

Um die systemspezifische Eignung festzustellen, werden mit den zu untersuchenden Lösungen und den Referenzen noch zwei Substanzen chromatographiert, welche unter den spezifischen Bedingungen gerade noch als getrennt erkannt werden können. Für die Monographie *Herba Epilobii angustifolii* waren das Hyperosid *R* und Chlorogensäure *R* in Methanol *R* [6].

Die Ausstattung, die für die Dünnschichtchromatographie von *Epilobii angustifolii herba* verwendet wurde, entspricht auch den Vorschriften für die HPTLC.

Die Untersuchungslösung wird wie in der Monographie beschrieben hergestellt und nicht verändert. Extrahiert wurden die vier Handelsdrogen, die auch schon für die Monographie verwendet wurden.

Referenzlösung a: entspricht der bisherigen Referenzlösung (Hyperosid und Quercitrin 1 mg/ ml)

Referenzlösung b: 2,5 ml Referenzlösung a und 7,5 ml Methanol

Referenzlösung c: Die Feststellung der systemspezifischen Eignung orientiert sich an der Monographie für *Betulae folium* im Europäischen Arzneibuch. Auch hier werden Flavonoide getrennt und die Bedingungen sind sehr ähnlich [6].

Dazu werden 2,5 mg Hyperosid *R* und 3 mg Chlorogensäure *R* werden in Methanol *R* zu 10 ml gelöst. Auch für das Schmalblättrige Weidenröschen konnte so die Systemeignung festgestellt werden.

Um die Notwendigkeit einer Konditionierung der HPTLC-Platten zu überprüfen wurden zwei Platten mit gesättigter $MgCl_2$ -Lösung konditioniert und zwei nicht. Jeweils eine konditionierte

und eine nicht konditionierte Platte wurde dann einmal mit 20 min Kammersättigung und einmal mit 60 min Kammersättigung entwickelt.

Die Dauer der Kammersättigung hatte keinen sichtbaren Unterschied zur Folge.

Die Vorkonditionierung der Platten zeigt sich in diesem Fall mit einer minimalen Stauchung der Zonen.

Abbildung 40 zeigt in Position 1 das Chromatogramm der Referenzlösung c. Die blaue Zone der Chlorogensäure und die orange Zone des Hyperosids können als getrennt erkannt werden (gelb umrandet), somit kann das vorliegende System als geeignet betrachtet werden.

Bei einer Kammersättigung über 60 min (Abb. 40 und 41) ist kein Unterschied zur geringeren Sättigungsdauer (Abb. 42, 43) zu erkennen.

Eine Konditionierung der Platten zeigt keine weitere Verbesserung der Trennleistung (Abb. 40, 41, 42 und 43).

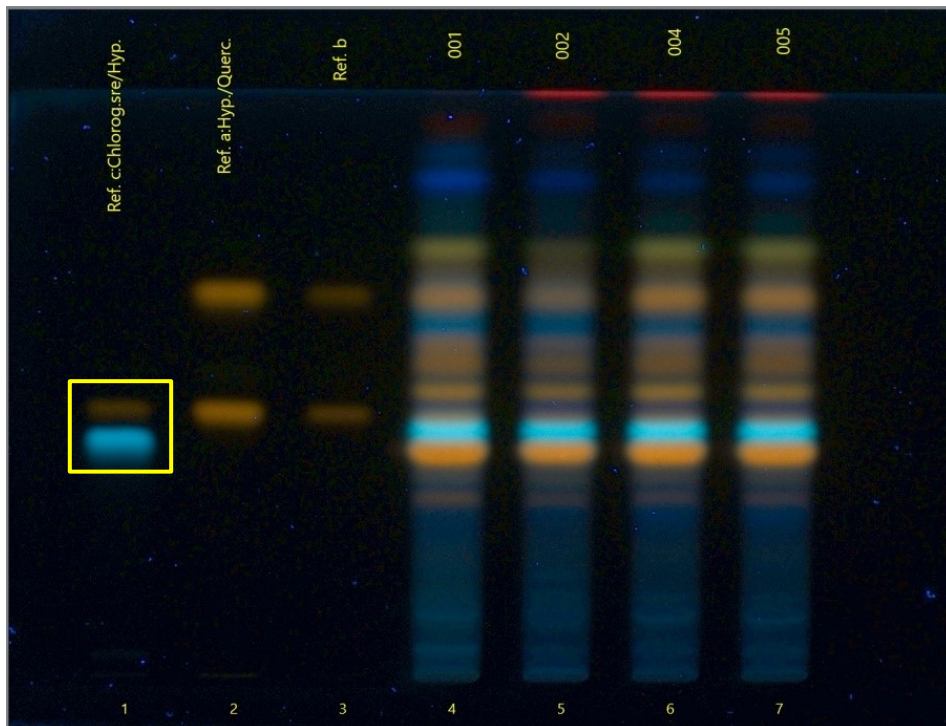


Abbildung 40: HPTLC *Epilobium angustifolium* L, Platte konditioniert, 20 min Kammersättigung. Die systemspezifische Eignung stellt sich im gelb umrandeten Bereich dar.

Referenzlösung a und b dienen als Intensitätsmarker, die höhere Konzentration ist in Position 2 und die niedrigere in Position 3 aufgetragen.

Die nächsten vier Positionen bilden die Untersuchungslösungen der vier Handelsdrogen von *Epilobium angustifolium* ab. Mit ansteigendem Rf-Wert sind eine sehr schwach bis schwach orange fluoreszierende Zone, eine intensiv orange fluoreszierende Zone, eine intensiv blau fluoreszierende Zone, drei schwach orange fluoreszierende Zonen und eine schwach bis sehr schwach gelb fluoreszierende Zone sichtbar.

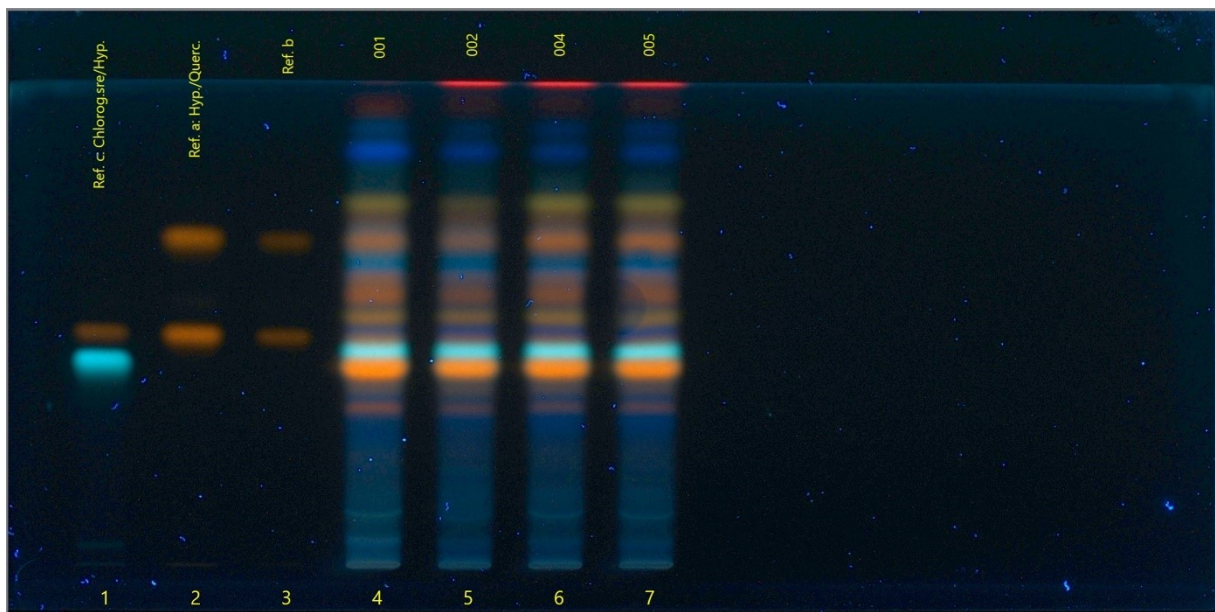


Abbildung 41: HPTLC *Epilobium angustifolium* L, Platte konditioniert, 60 min Kammersättigung

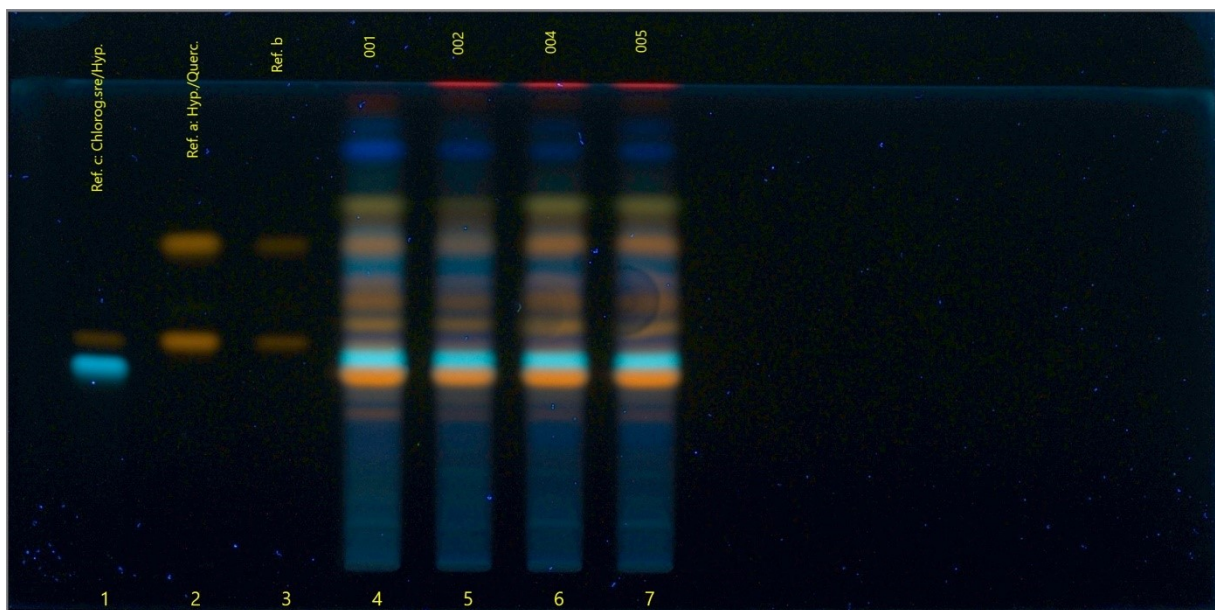


Abbildung 42: HPTLC *Epilobium angustifolium* L, Platte nicht konditioniert, 20 min Kammersättigung

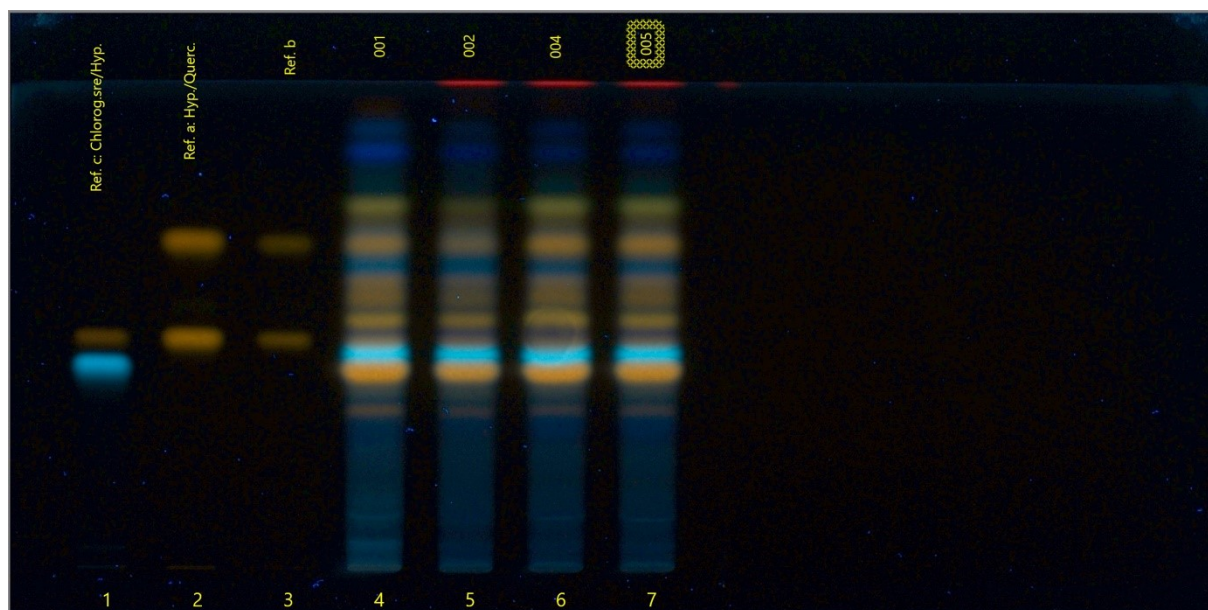


Abbildung 43: HPTLC *Epilobium angustifolium* L, Platte nicht konditioniert, 60 min Kammersättigung

4.7 Gehalt

4.7.1 Gerbstoffgehalt

Die Bestimmung erfolgte nach Ph. Eur. Monographie 2.8.14. Da die Absorption nach Entfernung der adsorbierbaren Polyphenole bei einer Einwaage von 0,500 g zu niedrig war, wurde die Bestimmung mit einer Einwaage von 1,000 g wiederholt.

Die für die Handelsdrogen 19107777-001, 19107777-002, 19107777-004 und 19107777-005 ermittelten Werte sind in Tabelle 14 ersichtlich. Die der Berechnung zugrundeliegende Einwaage wurde durch den Trocknungsverlust korrigiert.

Bei den Proben aus eigener Aufsammlung wurden bei Probe 19107777-009 die oberen und die unteren Anteile der Pflanze getrennt untersucht. In den unteren Teilen, welche vorwiegend aus Stängel und Blättern bestehen, ist der Gerbstoffgehalt geringer (2,10% bzw. 2,21%) als in den oberen Teilen, welche neben Stängel und Blättern auch Blüten und Früchte enthalten (5,79%/ 5,85%). Bei Probe 19107777-012, ebenfalls aus eigener Aufsammlung, handelt es sich um ein Exemplar nahezu ohne Blüten und mit höherem Samenanteil. Der Gerbstoffgehalt liegt bei dieser Probe bei 4,58% bzw. 4,73%. Da für diese Proben kein Trocknungsverlust ermittelt wurde, wurden diese nicht korrigiert.

Tabelle 14: Gerbstoffgehalt von *Epilobium angustifolium* L

Pr.Nr.:	M1	Tr.verl.%	M1 corr.	%	% corr.
19107777-001	1,00042 g	8,22%	0,91819 g	7,03%	7,66%
19107777-001	1,00048 g	8,22%	0,91824 g	7,07%	7,69%
19107777-004	1,00073 g	8,01%	0,91997 g	5,83%	6,79%
19107777-004	1,00080 g	8,01%	0,92057 g	6,27%	6,31%
19107777-002	1,00072 g	8,90%	0,91166 g	4,83%	5,29%
19107777-002	1,00082 g	8,90%	0,91175 g	5,13%	5,61%
19107777-005	1,00035 g	7,20%	0,92832 g	6,21%	6,66%
19107777-005	1,00091 g	7,20%	0,92884 g	6,32%	6,69%
19107777-012	1,00096 g	-	-	4,58%	-
19107777-012	1,00058 g	-	-	4,73%	-
19107777-009a	1,00026 g	-	-	5,79%	-
19107777-009a	1,00002 g	-	-	5,85%	-
19107777-009b	1,00093 g	-	-	2,21%	-
19107777-009b	1,00096 g	-	-	2,10%	-

Zum Vergleich wurde auch der Gerbstoffgehalt von *Epilobium hirsutum* L, *Epilobium dodonaei* Vill und Herba Epilobii kleinblütig ermittelt. Es handelt sich um Proben aus eigener Aufsammlung, weshalb auch hier die Einwaage nicht durch den Trocknungsverlust korrigiert wurde.

Tabelle 15: Gerbstoffgehalt *Epilobium hirsutum* L

Pr.Nr.:	M1	Tr.verl.%	M1 corr.	%	% corr.
19107777-006	1,00056 g	-	-	7,92%	-
19107777-006	1,00053 g	-	-	7,57%	-
19107777-010	1,00030 g	-	-	7,89%	-
19107777-010	1,00096 g	-	-	7,72%	-

Tabelle 16: Gerbstoffgehalt *Epilobium dodonaei* Vill

Pr.Nr.:	M1	Tr.verl.%	M1 corr.	%	% corr.
19107777-017	1,00026 g	-	-	8,55%	-
19107777-017	1,00009 g	-	-	8,59%	-

Tabelle 17: Gerbstoffgehalt Herba Epilobii (kleinblütig)

Pr.Nr.:	M1	Tr.verl.%	M1 corr.	%	% corr.
19107777-021	1,00017 g	-	-	5,06%	-
19107777-021	1,00016 g	-	-	4,93%	-
19150615-001	1,00033 g	-	-	3,65%	-
19150615-001	1,00010 g	-	-	3,58%	-

M1 Einwaage der pulverisierten Droge (355)
 % Gerbstoffgehalt in %
 % corr. Durch den Trocknungsverlust korrigierter Wert
 Tr.verl. Trocknungsverlust

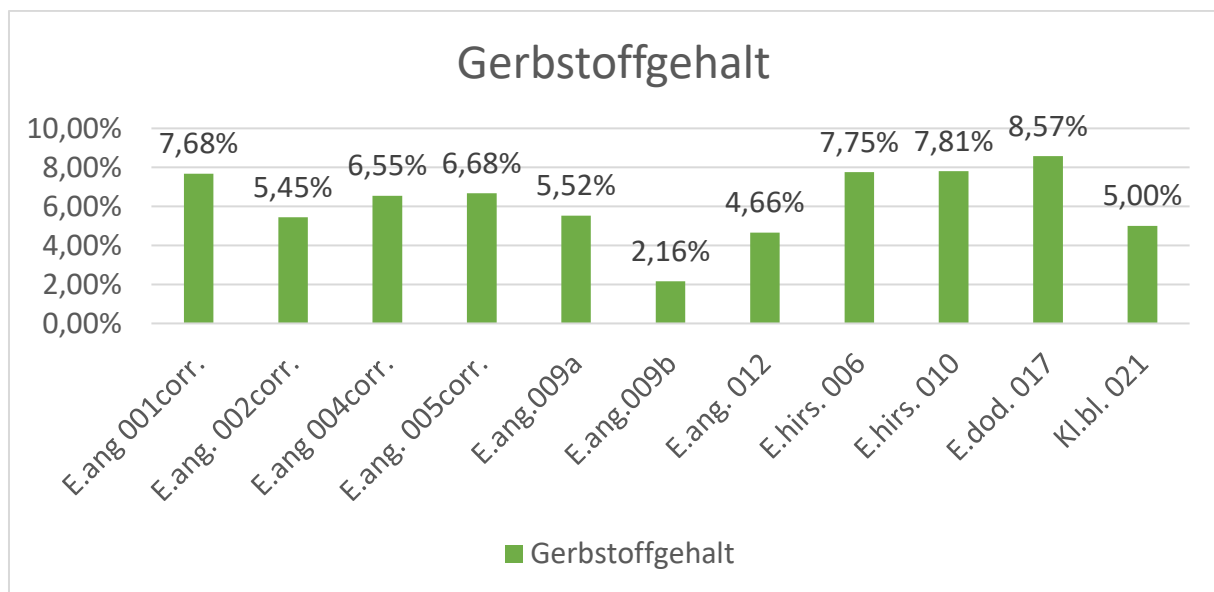


Abbildung 44: Gerbstoffgehalt in Prozent verschiedener Epilobiumproben im Vergleich

Auf Basis dieser Ergebnisse wird für die ÖAB Monographie ein Mindestgehalt von 4,0% vorgeschlagen. Dieser Mindestgehalt wird von Mustern, die überwiegend aus Stängeln bestehen, nicht erreicht.

4.7.2 Extrahierbare Bestandteile

Die Prüfung Extrahierbare Bestandteile stellt keine Gehaltsbestimmung im eigentlichen Sinn dar, kann aber im Zusammenhang mit der semiquantitativen HPTLC eine Aussage erlauben, ob das Untersuchungsmaterial mit Stängeln (geringerer Anteil an extrahierbaren Bestandteilen) versetzt ist. Um festzustellen, ob die Ermittlung des Gerbstoffgehalts durch diese wesentlich einfachere Methode ersetzt werden kann, wurde der Anteil der extrahierbaren Stoffe aller Proben bestimmt.

Es wurden drei Methoden zur Bestimmung untersucht. Da alle drei zu vergleichbaren Ergebnissen kamen, wurde die Methode mit dem geringsten Aufwand ausgewählt. Diese entspricht Methode 3 wie im Kapitel 3.2.6 dieser Arbeit vorgestellt.

Tabelle 18: Anteil der Extrahierbaren Bestandteile in sämtlichen Proben

Pr.Nr.:	Spezies	Einwaage	EA	EA in %
19107777-001/1	<i>E. angustifolium</i> L	1,99998 g	0,12228 g	30,57%
19107777-001/2		2,00007 g	0,12819 g	32,05%
19107777-002/1	<i>E. angustifolium</i> L	2,00060 g	0,11003 g	27,50%
19107777-002/2		2,00065 g	0,10673 g	26,67%
19107777-004/1	<i>E. angustifolium</i> L	2,00027 g	0,12162 g	30,40%
19107777-004/2		1,99994 g	0,12082 g	30,21%
19107777-005/1	<i>E. angustifolium</i> L	2,00008 g	0,12806 g	32,01%
19107777-005/2		2,00050 g	0,12615 g	31,52%
19107777-021/1	Kleinblütiger Mix	2,00039 g	0,06795 g	16,98%
19107777-021/2		2,00037 g	0,06865 g	17,16%
19107777-009a	<i>E. angustifolium</i> L	2,00041 g	0,13219 g	33,04%
19107777-009b		2,00050 g	0,06956 g	17,39%
19107777-012	<i>E. angustifolium</i> L	2,00057 g	0,09745 g	24,36%
19107777-006	<i>E. hirsutum</i> L	2,00043 g	0,12466 g	31,16%
19107777-010		2,00025 g	0,12274 g	30,68%
19107777-017	<i>E. dodonaei</i> Vill	2,00010 g	0,13263 g	33,16%
19150615-001/1	Herba Epilobii	2,00030 g	0,04358 g	10,89%
19150615-001/2		2,00091 g	0,04499 g	11,24%

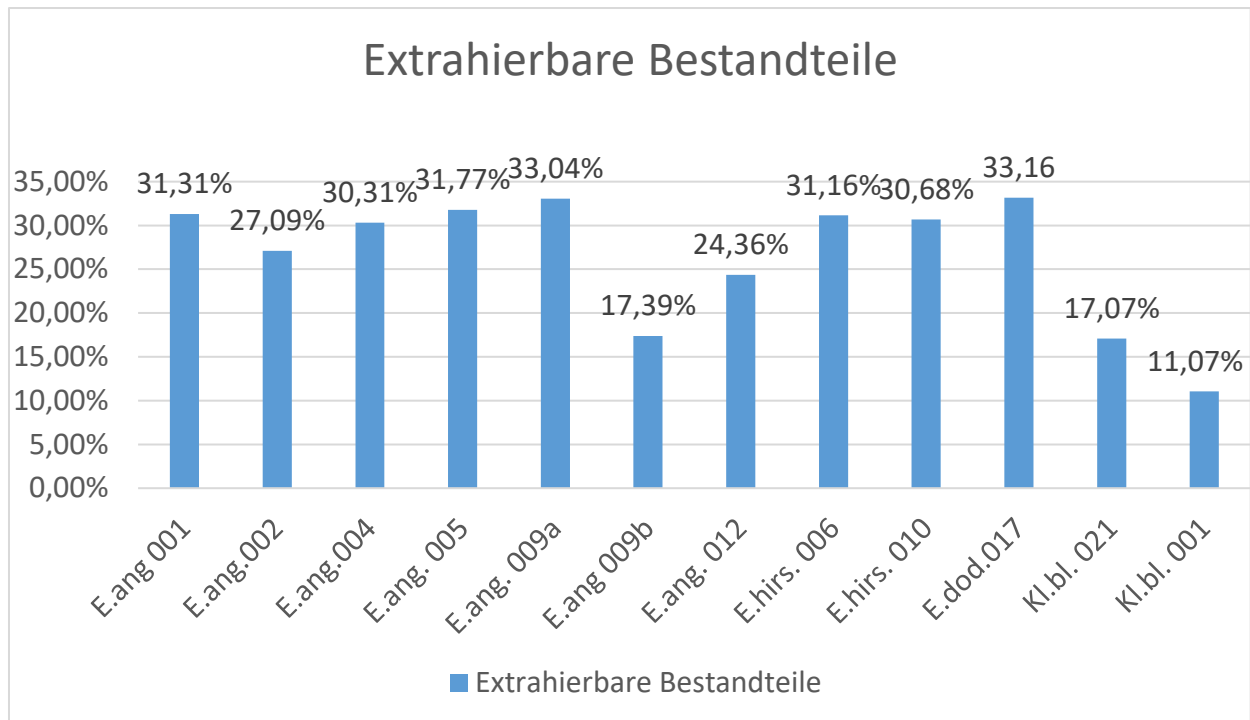


Abbildung 45: Relativer Anteil der Extrahierbaren Bestandteile verschiedener Epilobiumproben im Vergleich

5 Diskussion

Die Beschaffenheit der geschnittenen Handelsdroge entscheidet, ob bereits bei makroskopischer Betrachtung ein Hinweis auf die Identität der Droge möglich ist. Je nach Zerkleinerungsmethode und -grad ergibt sich ein anderes Bild.

Die Blätter sind hell- bis sattgrün und spröde. Schon mit freiem Auge lässt sich der zurückgerollte Blattrand und die typische Blattnervatur erkennen. Die Seitennerven gehen von einem deutlich erkennbaren Mittelnerv in fast rechtem Winkel ab und laufen in einem Randnerv zusammen. Sowohl die Blattober- als auch die Blattunterseite erscheinen kahl.

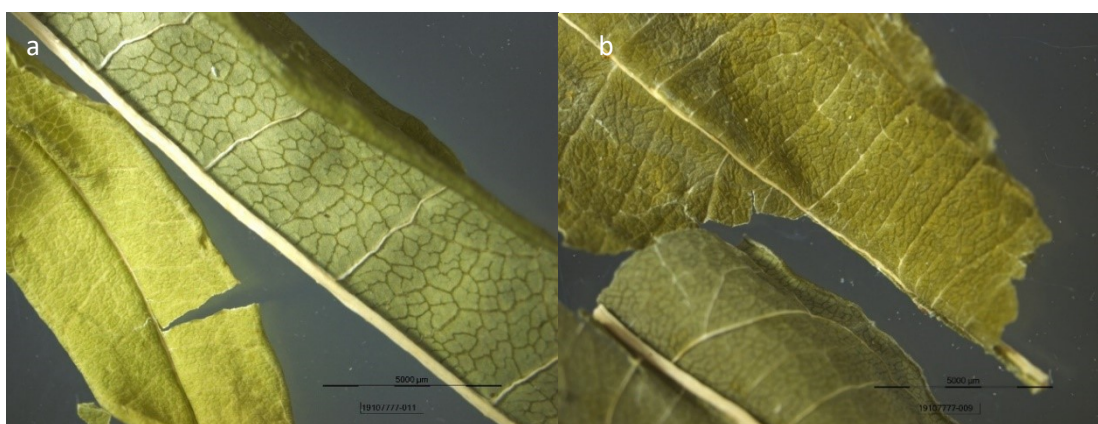


Abbildung 46 a: *Epilobium angustifolium* L, Ganzdroge Blattunterseite; b : *Epilobium angustifolium* L, Ganzdroge Blattoberseite

Die Farbe des Drogenpulvers ist sehr variabel. Je nach Anteil an Blüten oder rötlich überlaufenen Pflanzenteilen können Färbungen von selten rosa über graurosa nach meist sattgrün vorkommen. Anhand der visuellen Beurteilung des Pulvers kann keine Aussage über die Identität geliefert werden.

Bei der mikroskopischen Betrachtung ist vor allem die Verteilung der Idioblasten mit Raphidenbündeln streng entlang der Blattnerven das sicherste Erkennungsmerkmal. Dieses Merkmal lässt sich auch im Pulverpräparat zuverlässig nachweisen. Das Vorkommen von Idioblasten im Interkostalbereich weist in jedem Fall auf die Anwesenheit anderer Spezies hin. Genauso ist das Vorhandensein von Drüsenhaaren zu beurteilen, welche jedoch nicht immer leicht als solche zu identifizieren sind. Das Auftreten der Pollenkörner in Tetraden ist zwar ein typisches Merkmal der Kleinblütigen Arten, konnte aber im Präparat nicht beobachtet werden, genauso wie auch die rosa Farbe des Pollens von *Epilobium angustifolium* L nicht erhalten bleibt.

Mithilfe der HPTLC kann eine Identifizierung von *Epilobium angustifolium* L eindeutig erfolgen. Die Zonen des Myricetin-3-O- β -D-Glucuronids und des Quercetin-3-O- β -D-Glucuronids sind exklusiv für die besprochene Art. Die Zone des Myricetin-3-O- β -D-Glucuronids ist meist nur

schwach sichtbar, das Quercetin-3-O- β -D-Glucuronid als Hauptkomponente der Flavonoidfraktion ist aber stets sehr deutlich zu erkennen.

Eine Verunreinigung mit anderen Arten kann jedoch nicht mittels HPTLC festgestellt werden.

Die ermittelten Anteile der Asche und des Trocknungsverlustes entsprechen den üblichen Werten für pflanzliche Drogen im Europäischen Arzneibuch [6].

Die Bestimmung des Gerbstoffgehalts stellt eine Methode dar, die sowohl einen wesentlich höheren zeitlichen und apparativen Aufwand erfordert als die Bestimmung der extrahierbaren Bestandteile. Die hohe Korrelation der Werte von Gerbstoffgehalt und extrahierbaren Bestandteilen pro Muster spricht für die Anwendung der Extrahierbaren Bestandteile als indirekten Nachweis des Gehalts und kann somit den standardmäßigen Assay in einer Arzneibuchmonographie ersetzen.

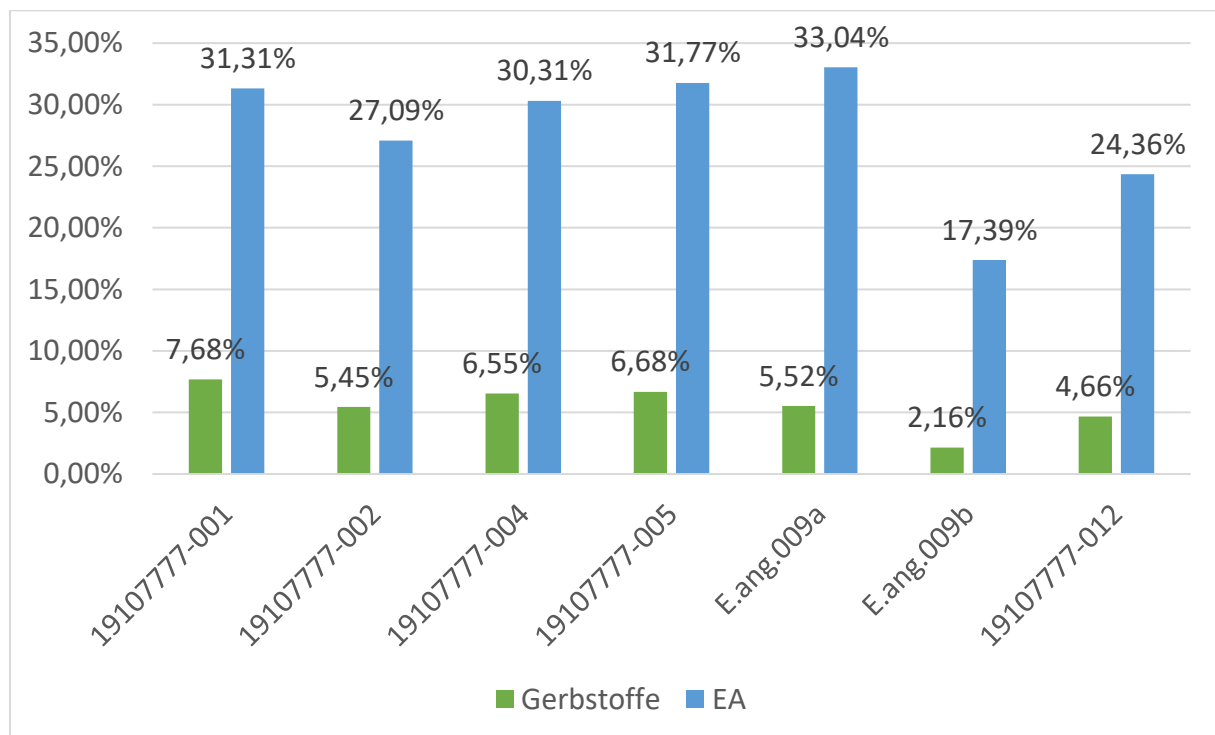


Abbildung 47: Zusammenhang des Gehalts an Gerbstoffen und der Extrahierbaren Bestandteile in *Epilobium angustifolium* L

Aufgrund der erhaltenen Daten konnte folgender Monographievorschlag erarbeitet werden:

Schmalblättriges Weidenröschenkraut

Epilobii angustifolii herba

Definition

Die zur Blütezeit gesammelten, getrockneten, oberirdischen Teile von *Epilobium angustifolium* L. (Onagraceae)

Eigenschaften

Geruch: aromatisch

Prüfung auf Identität

- A. In der getrockneten, geschnittenen Droge finden sich alle oberirdischen Organe der Pflanze. Die zylindrischen Sprosssteile sind hell- bis grünlich-braun und oft rötlich überlaufen. Sie können sowohl unregelmäßig kantig oder gerieft als auch glatt sein. In den Stängeln findet man meist eine Markhöhle, in sehr jungen Stängeln auch Mark. Die Stängel sind mäßig bis spärlich mit gekrümmten Deckhaaren behaart oder auch kahl. Die Blätter sind grün, spröde und ebenfalls meist kahl. Die Nervatur ist sehr deutlich und typisch für die Art. Von einem unterseits hervortretenden Mittelnerv gehen in stumpfem, manchmal auch normalem Winkel die Seitennerven ab und laufen in einem Randnerv wieder zusammen. Typisch ist auch der nach unten umgerollte, ganzrandige Blattrand. Die Blüten sind groß und vierzählig. Die vier freien Kelchblätter (ca. 10 mm lang und ca. 2,5 mm breit), die meist purpurfarben und an der Spitze zu einem kleinen Zipfel zusammengezogen sind, sind nur außen dicht, angedrückt behaart. Die vier ebenfalls purpurfarbenen Kronblätter (ca. 11,5 mm lang) sind nicht ausgerandet und am Grund kurz gestielt. Die Narbe ist vierspaltig und trägt am Grund einen dichten Kranz aus abstehenden Haaren. Der unterständige Fruchtknoten ist schlank, vierkantig, meist rötlich überhaucht und dicht, angedrückt behaart. Die Kapsel gleicht dem Fruchtknoten, die Teile sind außen meist rötlich und dicht behaart, innen hellbraun und kahl, Reste des Septums haften an. Oft finden sich die ovalen Samen in den Kapselteilen. Sie sind maximal 1 mm groß, gelb bis hellbraun und kahl, nur oberseits befindet sich ein dichtes Büschel unverzweigter, bis 12 mm langer Flughaare.
- B. Blatt: Zahlreiche mit Schleim gefüllte Idioblasten mit Raphidenbündel, welche stets entlang der Nervenbahnen angeordnet sind und praktisch nie im Interkostalbereich auftreten. Für die Art sind kurze (<110 µm) bis mittellange (120-160 µm) Idioblasten und Raphidenbündel, welche sowohl zellfüllend als auch nicht zellfüllend vorkommen, typisch. Die Epidermiszellen der Blattoberseite sind polygonal bis leicht wellig und frei von Stomata. Auf der Blattunterseite finden sich zahlreiche anomozytische Stomata zwischen welligen Epidermiszellen mit feiner Kutikularstreifung. Im Querschnitt zeigt sich ein bifazialer Blattbau. Die Behaarung ist spärlich. Am ehesten kommen die

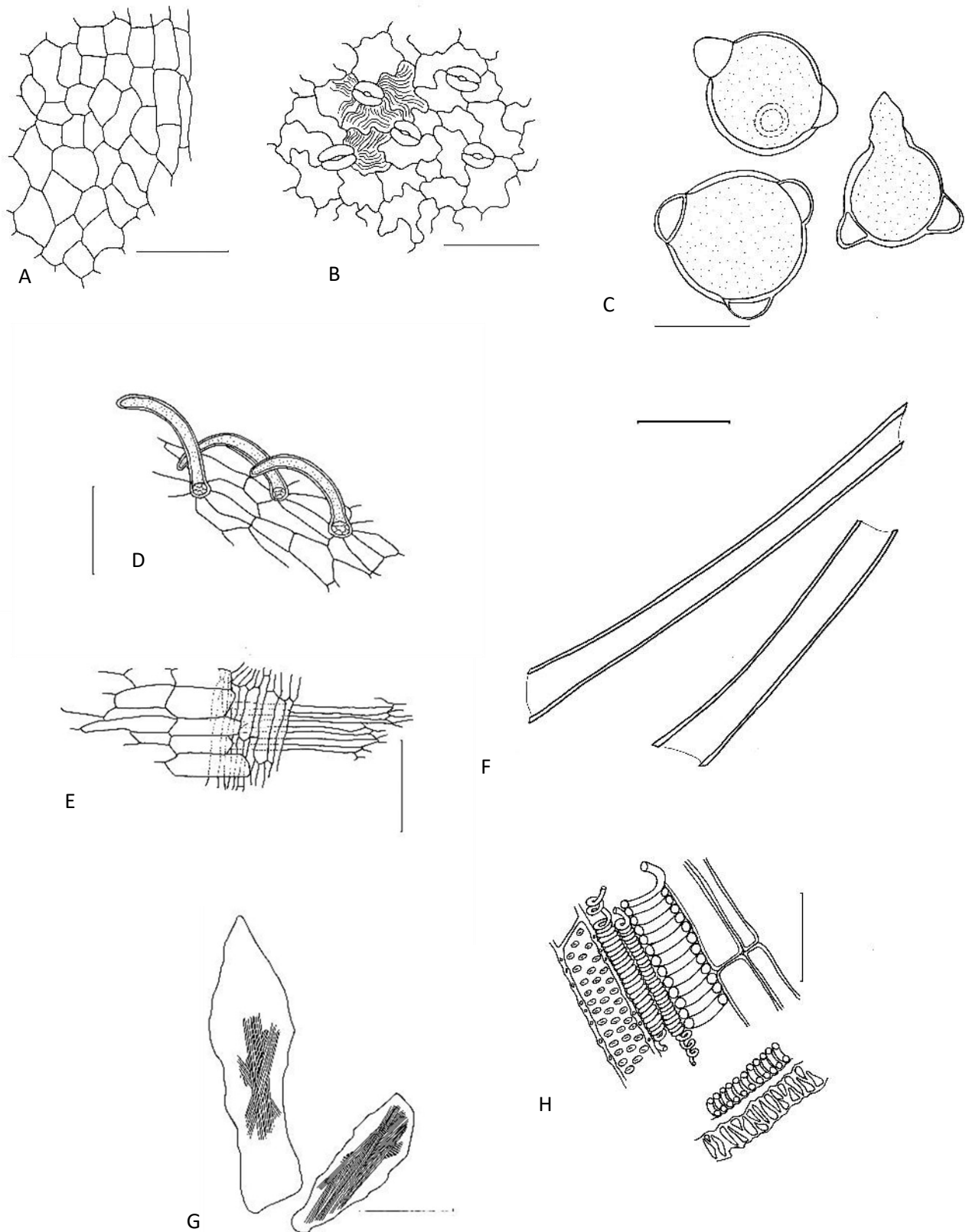
einzelligen, dünnwandigen, gewarzten Deckhaare (bis ca. 270 µm) auf den Blattnerven vor.

Spross: Deckhaare wie auf den Blättern, Raphidenbündel entlang der Nerven.

Blüte: Deckhaare wie auf den Blättern an der Kelchaußenseite, den Blütenstielen und dem Fruchtknoten bzw. der Kapsel außen. Der Griffelgrund ist mit einzelligen, geraden Haaren behaart. Auf der Narbeninnenseite finden sich (2)3-4(6) zellige Haare mit kugelig oder zumindest runder Endzelle. Der Pollen ist groß (bis 105 µm Durchmesser), triporat mit glatter Exine und tritt einzeln auf. Die gelblichen bis hellbraunen Samen sind in der Aufsicht glatt, die länglichen Epidermiszellen stets längslang angeordnet. Raphidenbündel finden sich sowohl in Kelch, Kronblatt, Staubblatt, dem Griffel und der Narbe als auch den Samen.

C. Mikroskopische Untersuchung (2.8.23): Das Pulver ist grün.

Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat-Lösung *R* verwendet wird. Das Pulver zeigt folgende Merkmale: Blattstücke mit polygonalen Epidermiszellen auf der Oberseite [A] bzw. mit welligen Epidermiszellen und anomozytischen Stomata auf der Unterseite [B]; entlang der Nervatur ist die typische Verteilung der Raphidenbündel erkennbar; Idioblasten mit zellfüllendem oder auch nicht zellfüllendem Inhalt verschiedener Größe, auch herausgelöst vorkommend [G]; Bruchstücke des Spross mit Spiral-, Tüpfel- und Netzgefäßen bzw. Übergängen zwischen den einzelnen Gefäßtypen [H]; Stücke des Kelchs mit dichter Behaarung außen [D]; Teile der Fruchtwand mit Parkettzellen [E]; zahlreiche Bruchstücke der Flughaare [F]; Pollen triporat mit glatter Exine, einzeln vorkommend, oft rosa [C]



Der Maßstab entspricht jeweils 50 μm .

D. Hochleistungs-dünnschichtchromatographie (2.8.25)

<i>Untersuchungslösung:</i>	0,5 g gepulverte Droge (355) (2.9.12) wird mit einer Mischung aus 25 ml Methanol <i>R</i> und 25 ml Wasser <i>R</i> 20 min lang im Wasserbad bei 40 °C extrahiert und nach dem Erkalten abfiltriert. Das Filtrat wird am unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft und der Rückstand anschließend in einer Mischung von 2,5 ml Methanol <i>R</i> und 2,5 ml Wasser <i>R</i> aufgenommen. Die Lösung wird filtriert.
<i>Referenzlösung a:</i>	5 mg Hyperosid und 5 mg Quercitrin werden in 5 ml Methanol <i>R</i> gelöst.
<i>Referenzlösung b:</i>	2,5 ml Referenzlösung a werden mit Methanol <i>R</i> zu 10,0 ml verdünnt.
<i>Referenzlösung c:</i>	2,5 mg Hyperosid <i>R</i> und 3 mg Chlorogensäure <i>R</i> werden in Methanol <i>R</i> zu 10 ml gelöst.
<i>Intensitätsmarker:</i>	Hyperosid
<i>Platte:</i>	DC-Platte mit Kieselgel F ₂₅₄ <i>R</i> (2 bis 10 µm)
<i>Fließmittel:</i>	Ethylacetat <i>R</i> , Ameisensäure <i>R</i> , Wasser <i>R</i> (68/8/8 V/V/V)
<i>Auftragen:</i>	6 µl Untersuchungslösung; bandförmig (6 mm) und 1 µl Referenzlösungen (6 mm); bandförmig
<i>Entwicklung:</i>	88 mm vom unteren Rand der Platte
<i>Trocknen:</i>	30 min bei Raumtemperatur
<i>Detektion:</i>	Die Platte wird mit einer Lösung von Diphenylboryloxyethylamin <i>R</i> (10 g/ l) und danach mit einer Lösung von Macrogol 400 <i>R</i> (50 g/ l) in Methanol <i>R</i> besprüht. Nach dem Trocknen der Platte bei Raumtemperatur betrachten bei UV 366 nm
<i>Eignungsprüfung:</i>	Referenzlösung c; das Chromatogramm muss im mittleren Drittel 2 deutliche Zonen zeigen. Die Zone der Chlorogensäure (untere Zone) fluoresziert blau, die Zone des Hyperosid (obere Zone) orange.
<i>Ergebnis:</i>	Die Zonenfolge in den Chromatogrammen von Referenzlösung a und Untersuchungslösung ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich.

Oberer Plattenrand	
Quercitrin: eine orange fluoreszierende — Zone	eine sehr schwach gelb fluoreszierende Zone eine schwach orange fluoreszierende Zone —
Hyperosid: eine orange fluoreszierende Zone —	eine schwach orange fluoreszierende Zone eine schwach orange fluoreszierende Zone eine intensiv blau fluoreszierende Zone <u>eine</u> intensiv orange fluoreszierende Zone
	eine sehr schwach bis schwach orange fluo- reszierende Zone
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (2.8.2): höchstens 2 Prozent

Trocknungsverlust (2.2.32): höchstens 10,0 Prozent, mit 1,000 g pulverisierter (355) (2.9.12) durch 2 h langes Trocknen im Trockenschrank bei 100-105 °C bestimmt

Asche (2.4.16): höchstens 8,0 Prozent

Extrahierbare Bestandteile: mindestens 27,0 Prozent

In einem 100 ml Erlenmeyerkolben werden 2,00 g pulverisierte Droge (355) (2.9.12) mit einer Mischung aus 10,0 ml Methanol *R* und 10 ml Wasser *R* versetzt und 2 h unter Rühren bei Raumtemperatur mazerieren gelassen. Das Mazerat wird abfiltriert. Vom Filtrat werden 4,00 ml in ein austariertes Wägegläschen überführt und am Wasserbad zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird im Trockenschrank bei 100-105 °C 3 h bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Seine Masse muss mindestens 0,540 g betragen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Adler W., Oswald K., Fischer R. (1994) Exkursionsflora von Österreich. Ulmer Verlag, Stuttgart, S. 485- 493.
- [2] Baert N., Kim J., Karonen M., Salminen J.-P. (2017) Inter-population and inter-organ distribution of the main polyphenolic compounds of *Epilobium angustifolium*. *Phytochemistry* 134, 54-63.
- [3] Deng L., Zong W., Tao X., Liu S., Feng Z., Lin Y., Liao Z., Chen M. (2019) Evaluation of the therapeutic effect against benign prostate hyperplasia and the active constituents from *Epilobium angustifolium* L.. *J. Ethnopharmacol.* 232, 1-10.
- [4] Ducrey B., Marston A., Gohring S., Hartmann R. W., Hostettmann K. (1997) Inhibition of 5- α -Reductase and Aromatase by the Ellagitannins Oenothain A and Oenothain B from *Epilobium* sp.. *Planta Med.* 63, 111-114.
- [5] Esposito C., Santarcangelo C., Masselli R., Buonomo G., Nicotra G., Insolia V., D'Avino M., Caruso G., Buonomo A. R., Sacchi R., Sommella E., Campiglia P., Tenore G. C., Daglia M. (2021) *Epilobium angustifolium* L. extract with high content in oenothain B on benign prostatic hyperplasia: A monocentric, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 138, art. no. 111414.
- [6] Europarat (2017) Europäisches Arzneibuch: Grundwerk 2017. 9. Ausgabe. Verlag Österreich
- [7] European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (2015) Assessment report on *Epilobium angustifolium* L. and/ or *Epilobium parviflorum* Schreb., herba.
https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field_ema_web_categories%253Aname_field/Herbal
- [8] Hahn-Deinstrop E. (1998) Dünnschicht-Chromatographie. 1. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH
- [9] Hiermann A. (1995) Die phytochemische Charakterisierung von *Epilobium angustifolium* L und dessen Abgrenzung zu anderen *Epilobium* Spezies mittels DC und HPLC. *Sci. Pharm.* 63, 135-144.
- [10] Kiss A. K., Bazylo A., Filipek A., Grancia S., Jaszewska E., Kiarszys U., Kośmider A., Piwowarski J. (2011) Oenothain B's contribution to the antiinflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp.. *Phytomedicine* 18, 557-560.
- [11] Kramer G., Mitteregger D., Marberger M. (2007) Is Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) an Immune Disease? *Eur. Urol.* 51, 1202-1216.
- [12] Lachinger M. (2004) Untersuchung von Inhaltsstoffen einheimischer *Epilobium*-Arten [Diplomarbeit]. Institut für Pharmakognosie der Universität Wien
- [13] Lischka-Günzel H., Melzig MF. (2007) *Epilobium angustifolium* L. – Schmalblättriges Weidenröschen. *Zeitschrift für Phytotherapie* 28, 201-206.
- [14] Österreichisches Arzneibuch: Amtliche Ausgabe 2019. Verlag Österreich, Wien 2019
- [15] Piwowarsky J. P., Bobrowska-Korczak B., Stanislawski I., Bielecki W., Wrzesien R., Grancia S., Krupa K., Kiss A. K. (2017) Evaluation of the Effect of *Epilobium angustifolium* Aqueous Extract on LNCaP Cell Proliferation in *In vitro* and *In vivo* Models. *Planta Med.* 83, 1159-1168.
- [16] Rümmele M. (2022) Phytotherapie in der Urologie. *Phytotherapie.at* 4/2022, 6-8.

- [17] Saukel J. (1982) Pharmakobotanische Untersuchungen von Arzneidrogen II. Herba Epilobii. *Sci. Pharm.* 50, 179-200.
- [18] Saukel J. (1983) Pharmakobotanische Untersuchungen von Arzneidrogen II. Herba Epilobii. *Sci. Pharm.* 51, 115-132.
- [19] Schepetkin I. A., Ramstead A. G., Kirpotina L. N., Voyich J. M., Jutila M. A., Quinn M. T. (2016) Therapeutic Potential of Polyphenols from *Epilobium Angustifolium* (Fireweed). *Phytother.Res.* 30, 1287-1297.
- [20] Schilcher H. (Hrsg.) (2016) Leitfaden Phytotherapie. 5. Auflage. Elsevier GmbH, München
- [21] Söukand R., Mattalia G., Kolosova V., Stryamets N., Prakofjewa J., Belichenka O., Kuznetsova N., Minuzzi S., Keedus L., Prüse B., Simanova A., Ippolitova A., Kalle R. (2020) Inventing a herbal tradition: The complex roots of the current popularity of *Epilobium angustifolium* in Eastern Europe. *J. Ethnopharmacol.* 247, 112254.
- [22] Sticher O., Heilmann J., Zündorf I. (2015) Pharmakognosie Phytopharmazie. 10. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 741- 822.
- [23] Stolarczyk M., Naruszewicz M., Kiss A. K. (2013) Extracts from *Epilobium sp.* herbs induce apoptosis in human hormone-dependent prostate cancer cells by activating the mitochondrial pathway. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 1044-1054.
- [24] Timms B. G., Hofkamp L. E. (2011) Prostate Development and Growth in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation* 82, 173-183.
- [25] Treben M. (2017) Gesundheit aus der Apotheke Gottes. 95. Auflage, Ennstaler Verlag Steyr
- [26] Vitalone A., Allkanjari O. (2018) *Epilobium* spp: Pharmacology and Phytochemistry. *Phytother.Res.* 32, 1229-1240.
- [27] Wichtl M. (Hrsg.) (1984) Teedrogen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- [28] Wichtl M. (Hrsg.) (2009) Teedrogen und Phytopharmaka: Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. 5. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 240-243.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tellimagrandin I (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tellimagrandin_I.png)	5
Abbildung 2: 19107777-005, <i>Epilobium angustifolium</i> Handelsdroge unter der Lupe.....	23
Abbildung 3: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Blattoberseite Idioblasten mit Raphidenbündeln	25
Abbildung 4: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Blattoberseite mit polygonalen Epidermiszellen	25
Abbildung 5: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Blattunterseite mit Stomata und Cuticularstreifung auf welligen Epidermiszellen	26
Abbildung 6: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Blattquerschnitt bifacialer Bau.....	26
Abbildung 7: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Sprossquerschnitt.....	27
Abbildung 8: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Aufsicht Kelchblattunterseite mit Deckhaaren	28
Abbildung 9: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Aufsicht Kronblatt	28
Abbildung 10: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Staubblatt.....	29
Abbildung 11: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Aufsicht Narbenbasis	30
Abbildung 12: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Aufsicht Narbenschenkel innen	30
Abbildung 13: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Pollenkörner einzeln	29
Abbildung 14: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Fruchtwand tangential	32
Abbildung 15: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Aufsicht Same.....	33
Abbildung 16: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Blattoberseite im Pulverpräparat	33
Abbildung 17: Idioblasten entlang der Leitbündel bei <i>Epilobium angustifolium</i> L im Pulverpräparat .	34
Abbildung 18: <i>Epilobium dodonaei</i> Vill, Blattoberseite mit Stomata und polygonal bis welligen Epidermiszellen	35
Abbildung 19: <i>Epilobium dodonaei</i> Vill, Blattunterseite mit Stomata und welligen Epidermiszellen ..	36
Abbildung 20: <i>Epilobium dodonaei</i> Vill, Blatt quer mit raphidenbündelführendem Idioblast quer zur Blattfläche	37
Abbildung 21: <i>Epilobium dodonaei</i> Vill, Raphidenbündel im Mesophyll im Polarisationsmikroskop ..	37
Abbildung 22: <i>Epilobium dodonaei</i> Vill, Aufsicht Narbeninnenseite mit mehrzelligen Haaren	38
Abbildung 23: <i>Epilobium hirsutum</i> L, Blattoberseite mit wellig buchtigen Epidermiszellen und Haarbasis	39
Abbildung 24: <i>Epilobium hirsutum</i> L, Blattunterseite mit wellig buchtigen Epidermiszellen und Stomata	39
Abbildung 25: <i>Epilobium hirsutum</i> L, Drüsenhaar auf Kelchblatt.....	40
Abbildung 26: <i>Epilobium hirsutum</i> L, Raphidenbündel im Mesophyll im Polarisationsmikroskop.....	40
Abbildung 27: <i>Epilobium hirsutum</i> L, mehrzellige Haare an der Innenseite der Narbenschenkel mit spitzer Endzelle.....	41
Abbildung 28: <i>Epilobium hirsutum</i> L, Testa in der Aufsicht papillös.....	41
Abbildung 29: Blattaufsicht im Pulverpräparat mit Idioblast.....	42
Abbildung 30: Fragment mit einzelligen Drüsenhaaren.....	43
Abbildung 31: Aufsicht Testa mit ungeordneten Zellen und durchscheinenden Einzelkristallen	44
Abbildung 32: DC <i>Epilobium angustifolium</i> L, betrachtet bei 366 nm a: mit Kammerfüllung b: ohne Kammerfüllung	49
Abbildung 33: DC von <i>Epilobium angustifolium</i> L, Trocknung bei Raumtemperatur, betrachtet bei 366 nm a: mit Kammerfüllung b: ohne Kammerfüllung	50
Abbildung 34: DC verschiedener <i>Epilobium angustifolium</i> L Proben.....	51
Abbildung 35: DC verschiedener <i>Epilobium</i> arten	52
Abbildung 36: DC von <i>Epilobium angustifolium</i> L, <i>Epilobii herba</i> und Mischungen in verschiedenen Verhältnissen.....	54

Abbildung 37: DC von <i>Epilobium angustifolium</i> L, <i>Epilobii herba</i> und Mischungen in unterschiedlichen Verhältnissen, Vergleich verschiedener Auftragemengen, betrachtet bei 366 nm.....	55
Abbildung 38: DC von <i>Epilobium angustifolium</i> L, <i>Epilobii herba</i> und Mischungen in unterschiedlichen Verhältnissen, Vergleich verschiedener Auftragemengen, betrachtet bei 254 nm.....	56
Abbildung 39: DC von <i>Epilobium angustifolium</i> L, <i>Epilobii herba</i> und Mischungen in unterschiedlichen Verhältnissen, Vergleich verschiedener Auftragemengen, betrachtet bei Tageslicht.....	57
Abbildung 40: HPTLC <i>Epilobium angustifolium</i> L, Platte konditioniert, 20 min Kammersättigung	59
Abbildung 41: HPTLC <i>Epilobium angustifolium</i> L, Platte konditioniert, 60 min Kammersättigung	60
Abbildung 42: HPTLC <i>Epilobium angustifolium</i> L, Platte nicht konditioniert, 20 min Kammersättigung	60
Abbildung 43: HPTLC <i>Epilobium angustifolium</i> L, Platte nicht konditioniert, 60 min Kammersättigung	61
Abbildung 44: Gerbstoffgehalt in Prozent verschiedener <i>Epilobium</i> proben im Vergleich	64
Abbildung 45: Relativer Anteil der Extrahierbaren Bestandteile verschiedener <i>Epilobium</i> proben im Vergleich.....	66
Abbildung 46 a und b: <i>Epilobium angustifolium</i> L, Ganzdroge Blattober- und Blattunterseite	67
Abbildung 47: Zusammenhang des Gehalts an Gerbstoffen und der Extrahierbaren Bestandteile in <i>Epilobium angustifolium</i> L.....	68

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Morphologische Merkmale <i>Epilobium</i> spp. [1,2]	3
Tabelle 2: Unterscheidungsmerkmale innerhalb der Subsectiones und heimische Vertreter.....	9
Tabelle 3: Drogenmaterial, eigene Aufsammlungen.....	9
Tabelle 4: Drogenmaterial Fa. Kottas	10
Tabelle 5: Drogenmaterial Fa. Kwizda	10
Tabelle 6: Reinsubstanzen, Reagentien und Lösungsmittel, die verwendet wurden.....	11
Tabelle 7: Verwendete Geräte.....	12
Tabelle 8: Unterscheidungsmerkmale der <i>Epilobium</i> arten in der Schnittdroge	24
Tabelle 9: Durchmesser Pollen und Länge der Deckhaare von <i>Epilobium angustifolium</i> L	31
Tabelle 10: Rohdaten, Trocknungsverlust 1 absolut	45
Tabelle 11: Rohdaten, Trocknungsverlust 1 relativer Anteil	45
Tabelle 12: Rohdaten, Trocknungsverlust 2	46
Tabelle 13: Rohdaten Asche	47
Tabelle 14: Gerbstoffgehalt von <i>Epilobium angustifolium</i> L	62
Tabelle 15: Gerbstoffgehalt <i>Epilobium hirsutum</i> L	63
Tabelle 16: Gerbstoffgehalt <i>Epilobium dodonaei</i> Vill	63
Tabelle 17: Gerbstoffgehalt <i>Herba Epilobii</i> (kleinblütig)	63
Tabelle 18: Anteil der Extrahierbaren Bestandteile in sämtlichen Proben.....	65

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Betreuer Dr. Reinhard Länger für sein Vertrauen, die Ermöglichung und besonders seine freundliche Unterstützung bei dieser Masterarbeit bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Mag. Dr. Silvester Ölzant, welcher mir beim praktischen Teil meiner Arbeit zur Seite stand und stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte. Auch bei allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Analytik chemisch- pharmazeutische Arzneimittel der AGES/ MEA möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung bedanken.

Der größte Dank geht an meine Familie. Ohne ihre Geduld, viel Verzicht und oft unerwartete Ratschläge wäre mein Traum, das Studium der Pharmazie, nicht wahr geworden.