



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**Wissenschaftliche Erstellung der Monographie
„Polygalae extractum fluidum“
für das Österreichische Arzneibuch**

verfasst von

Sarah Kuderer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen aufrichtig danken, die mir bei der Entstehung meiner Diplomarbeit zur Seite standen.

An erster Stelle danke ich Frau Univ. Prof. Mag. Dr. Dr.h.c. Brigitte Kopp, dass sie mir die Bearbeitung dieser interessanten Themenstellung am Department für Pharmakognosie ermöglicht hat. Ihre fachliche Kompetenz und ständige Erreichbarkeit waren eine wertvolle Hilfe beim Verfassen dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Weiters gilt mein Dank dem Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend für die Vergabe des Diplomarbeitsthemas und die finanzielle Unterstützung. Zudem danke ich der Expertengruppe 13B der EDQM für ihren Beitrag zur Erstellung der Monographie für das Österreichische Arzneibuch sowie Dr. Denis Bellenot für seine Information zur Methode des Schaumindex.

Mein besonderer Dank gilt Frau Mag. Katharina Waldbauer für ihre geduldige Betreuung, ihre hilfreichen Erklärungen während der gesamten praktischen Arbeit sowie beim Verfassen dieser Diplomarbeit.

Frau Mag. Sabine Mascotti danke ich für die Vorarbeit bezüglich der dünnschicht-chromatographischen Identifizierung von Polygala-Arten.

Des Weiteren richtet sich mein Dank an Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Johannes Saukel für die Unterstützung und praktischen Tipps bei den mikroskopischen Untersuchungen sowie an Herrn Dr. Christoph Dobeš für die statistische Auswertung der erhobenen Daten.

Dem Institut für Analytische Chemie und Radiochemie der Universität Innsbruck unter Leitung von Herrn O. Univ. Prof. Mag. Dr. Dr.h.c. Günther K. Bonn danke ich für Möglichkeit der Durchführung der IR - Untersuchungen. Frau Mag. Cornelia Pezzei danke ich für die Anleitung zur Bedienung der Geräte sowie für die statistische Auswertung sowie Herrn Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Christian Huck für die fachliche Unterstützung.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich dafür, dass sie meine wissenschaftliche Neugier stets gefördert und mich in den Höhen und Tiefen des Studienalltags jederzeit unterstützt haben. I would especially like to thank my anglicist for helping me to find euphonic terms. Ich bedanke mich bei meinem Freund für seine Geduld und sein Verständnis während der Zeit der Forschungsarbeit.

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

Sarah Kuderer

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Anisaldehyd – Schwefelsäure
AB	Arzneibuch
Abb.	Abbildung
DC	Dünnschichtchromatographie
d.h.	das heißt
EuAB	Europäisches Arzneibuch
FM	Fließmittel
HI	Hämolytischer Index
IR	Infrarot
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
k. A.	keine Angabe
MIR	Mittleres Infrarot
MW	Mittelwert
NIR	Nahes Infrarot
NST-PEG	Naturstoff-Polyethylenglykol
ÖAB	Österreichisches Arzneibuch
OI	Ovalitäts Index
PEG	Polyethylenglykol
SI	Schaumindex
TD	Tagesdosis
TLC	Thin Layer Chromatography
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	- 1 -
1.1 <i>Polygala senega</i> L.....	- 2 -
1.2 <i>Polygala tenuifolia</i> WILLD.....	- 8 -
2. PROBLEMSTELLUNG.....	- 13 -
3. MATERIAL UND METHODEN.....	- 15 -
3.1 Material	- 15 -
3.1.1 Untersuchungsmaterialien.....	- 15 -
3.1.2 Reagenzien und Chemikalien	- 18 -
3.2 Methoden	- 20 -
3.2.1 Dünnschichtchromatographie	- 21 -
3.2.2 Ethanolgehalt	- 23 -
3.2.3 Schaumindex	- 24 -
3.2.4 Infrarotspektroskopie (NIR und MIR).....	- 26 -
4. ERGEBNISSE.....	- 31 -
4.1 Wurzeldroge	- 31 -
4.1.1 Prüfung auf Identität.....	- 31 -
4.1.1.1 Makroskopie.....	- 31 -
4.1.1.2 Mikroskopie.....	- 33 -
4.1.1.3 Dünnschichtchromatographie (TLC und HPTLC)	- 39 -
4.1.1.4 Spektroskopie (NIR und MIR)	- 48 -
4.1.2 Wertbestimmung mittels Schaumindex	- 55 -

4.2 Fluidextrakt.....	- 59 -
4.2.1 Prüfung auf Identität	- 59 -
4.2.1.1 Dünnschichtchromatographie (TLC und HPTLC)	- 59 -
4.2.1.2 Spektroskopie (NIR und MIR)	- 66 -
4.2.2 Prüfung auf Reinheit	- 68 -
4.2.2.1 Ethanolgehalt	- 68 -
4.2.2.2 Vergällungsmittel	- 70 -
4.2.3. Wertbestimmung mittels Schaumindex	- 70 -
5. VORSCHLAG FÜR DIE MONOGRAPHIE „ <i>Polygalae extractum fluidum</i> “ (ÖAB).....	- 74 -
6. DISKUSSION.....	- 76 -
7. ZUSAMMENFASSUNG.....	- 80 -
8. SUMMARY.....	- 81 -
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	- 82 -
CURRICULUM VITAE.....	- 86 -
ANHANG: MANUSKRIFT “ <i>Vibrational spectroscopic discrimination of Polygala senega, Polygala tenuifolia and Glinus oppositifolius</i> ”	- 87 -

1. Einleitung

Das durch Verordnung vom Bundesministerium für Gesundheit verbindlich gemachte Arzneibuch (AB) umfasst eine Sammlung anerkannter pharmazeutischer Regeln über die Definition, Herstellung, Qualität, Zusammensetzung, Bezeichnung, Lagerung, Abgabe und Prüfung von Arzneimitteln sowie über die Beschaffenheit von Behältnissen und Umhüllungen von Arzneimitteln (Arzneibuchgesetz § 1; Quelle: siehe Fußnote ¹).

Das Arzneibuch in Österreich setzt sich aus der deutschen Fassung des Europäischen Arzneibuchs (EuAB) und der nationalen Ergänzung, dem Österreichischen Arzneibuch (ÖAB) zusammen.

Das Österreichische Arzneibuch (ÖAB) wird derzeit von einer Expertengruppe grundlegend überarbeitet. Von den mehr als 260 im ÖAB enthaltenen Monographien, d.h. Einträgen in des Arzneibuch, werden die veralteten revidiert, obsoletere Monographien entfernt sowie neue Monographien erstellt.

Ergänzend zu der im Europäischen Arzneibuch enthaltenen Monographie der Senegawurzel (*Polygalae radix*) soll im Österreichischen Arzneibuch die Monographie für den Fluidextrakt der Senegawurzel neu aufgenommen werden. Im Rahmen des Diplomandenkollegs sollte diese Monographie ausgearbeitet werden.

Die Erstellung der Monographie „*Polygalae extractum fluidum*“ beinhaltet die Untersuchung der in Frage kommenden Drogen, deren makroskopische und mikroskopische Identifikation sowie deren Unterscheidung mittels Dünnschichtchromatographie und Infrarotspektroskopie. Weiters wird eine standardisierte Methode zur Wertbestimmung der enthaltenen Saponine mittels Schaumindex etabliert.

Die im Rahmen der Diplomarbeit neu erstellte Monographie des Fluidextraktes orientiert sich an der bereits bestehenden EuAB-Monographie der Senegawurzel (*Polygalae radix*). In dieser Fassung sind „*Polygala senega* und eng verwandte Arten“ monographiert, wobei diese Arten nicht näher spezifiziert sind.

¹ <http://www.basg.gv.at/arzneimittel/oesterreichisches-arzneibuch/> (11.9.2013)

EINLEITUNG

Für die Herstellung des Fluidextrakts soll die Verwendung der Arten *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* untersucht werden, da diese Arten medizinisch-pharmazeutisch als gleichwertig angesehen werden können (Hänsel & Sticher, 2010; Heinrich et al., 2004).

Des Weiteren soll die Verfälschung *Glinus oppositifolius* mit in die Untersuchungen aufgenommen werden, um sie von den offizinellen Drogen abzugrenzen.

1.1 *Polygala senega* L.

Insgesamt umfasst die Gattung *Polygala* (Kreuzblume) etwa 600 Arten, von denen jedoch nicht alle von pharmazeutischer Bedeutung sind. In der traditionellen Heilkunde sind *Polygala*-Arten jedoch sehr weit verbreitet. Neben *Polygala senega* finden auch andere Arten wie *Polygala fruticosa* und *Polygala virgata* z.B. in der Zulu-Heilkunde seit jeher Anwendung. In Europa wurden *Polygala amara* und verwandte Arten als Expectorans, Magenbitter und zur Förderung der Milchproduktion bei Stillenden eingesetzt (Van Wyk et al., 2004).

Etymologie und historische Bedeutung

Nach Hunnius (1997) wird *Polygala senega* auch mit den Synonymen Klapperschlangenzwurzel, Kreuzblume, virginische Schlangenzwurzel, Senega, Senegawurzel etc. bezeichnet. Der Gattungsname „*Polygala*“ bedeutet „viel Milch“, was auf Dioscurides, einen Arzt aus dem 1. Jhdt. n. Chr. zurückgeht, der dieser Pflanze eine laktationsfördernde Wirkung zuschrieb. „Senega“ als Bezeichnung der Art ist abgeleitet von dem Seneca-Stamm, einem nordamerikanischen Stamm von Ureinwohnern, die *Polygala senega* als Arzneimittel bei Schlangenbissen einsetzten (Briggs, 1988).

Herkunft, Verbreitung und Habitus

Polygala senega gehört zur Familie der Polygalaceae, der sogenannten Kreuzblumengewächse. Die bis zu 40-50 cm hohe, ausdauernde Erdstockstaude ist heimisch in Nordamerika, sie wächst vor allem in den Prärien und trockenen, lichten Wäldern in den Nordstaaten der USA und Kanada (Teuscher et al., 2012).

EINLEITUNG

Aus einem kurzen Wurzelschopf einer verzweigten Wurzel entspringen die aufrechten, oft unverzweigten Triebe. Die Blätter von *Polygala senega* sind lanzettlich, sitzend, wechselständig angeordnet und haben einen fein gezähnten Rand (Van Wyk et al., 2004). Sie besitzen eine sattgrüne Oberfläche und eine blässere Unterseite. Die weißen, schmetterlingsförmigen Blüten sind in bis zu 8 cm langen Trauben angeordnet und weisen eine für die Familie typische Teilung der Unterlippe auf, wie in nachfolgender Abbildung 1 ersichtlich (Quelle: siehe Fußnote ²)



Abbildung 1. *Polygala senega* (L.)

Die Wurzel von *Polygala senega* – *Polygalae radix* – ist eine 10-15 cm lange und bis zu 1 cm dicke, spindelförmige, gekrümmte oder leicht spiralig gedrehte Pfahlwurzel, die gelbbraun bis dunkelbraun gefärbt ist und die nach unten im Durchmesser abnimmt. Sie trägt einen graubraunen, höckerigen und knorrigen Wurzelkopf, der mit 5 cm Durchmesser deutlich breiter als die Wurzel ist und aus Stängelabbruch und Knospenresten besteht (Wagner, 1999). Die Oberfläche der Wurzel enthält Längs- und Querrillen. Während auf der Innenseite der Wurzel-Krümmung eine kielförmige Aufwulstung erkennbar ist, zeigt die äußere Seite eine Querfaltung (Wichtl, 2009).

² <http://m1.i.pbase.com/g3/78/629478/2/112726961.fozQ7HXk.jpg> (14.9.2013)

EINLEITUNG



Abbildung 2. Senegawurzel (eigenes Bildmaterial)

Der Bruch der Senegawurzel ist glatt und zeigt im Querschnitt eine gelbliche, oft ungleich dicke Rinde. Diese umgibt einen helleren, kreisförmigen oder unregelmäßig geformten zentralen Holzkörper (EuAB, 7. Ausgabe 2011).

Eigenschaften

Der Geruch der Wurzeldroge ist süßlich und aromatisch, wobei er an Salicylsäuremethylester erinnert, sowie leicht ranzig bei längerer Lagerung. Der zuerst süßliche Geschmack wird in Folge kratzend und es zeigt sich ein sialoger Effekt, d.h. der Speichelfluss wird bei längerem Kauen angeregt. Beim Einatmen des Staubes der pulverisierten Droge wird ein starker Niesreiz ausgelöst (Hänsel und Sticher, 2010).

Inhaltsstoffe

Mit 5-12% bilden die Triterpensaponine vom Oleanolsäuretyp den für die pharmazeutische Wirkung verantwortlichen Inhaltsstoff. Schüttelt man die pulverisierte Droge mit Wasser, kommt es zu Schaumbildung (Rahfeld, 2009). Der hämolytische Index (HI) der Senegawurzel liegt zwischen 2000-5000. Als hypoglykämisch im Tierversuch erweisen sich einige der Senega-Saponine, vor allem Senegin II (Teuscher et al., 2012).

Die Triterpensaponine bestehen aus dem (Haupt-) Aglykon Presenegenin (siehe Abbildung 3, Seite 5) und verschiedenen Zuckerketten. Die zumeist bisdesmosidischen Glykoside heißen Senegine, wobei hauptsächlich die Senegine II-IV in *Polygala senega* enthalten sind.

EINLEITUNG

Die Senegine sind teilweise strukturell identisch mit den Onjisaponinen, welche in der eng verwandten Art *Polygala tenuifolia* vorkommen (Teuscher et al., 2012). Generell finden sich die wichtigsten Unterschiede zwischen den enthaltenen Saponinen bei der Zuckerkette in Position C28 und beim Methoxylierungsgrad des Zimtsäurerests, welcher mit der Zuckerkette verestert ist und als E- oder Z-Isomer vorliegen kann.

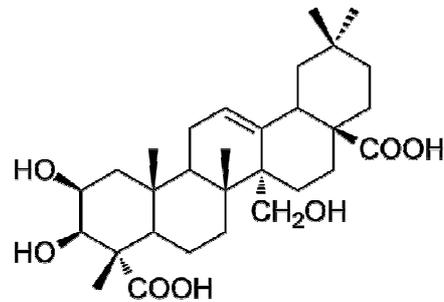


Abbildung 3. Aglykon Presenegenin

Das Hauptsaponin Senegin II (Abbildung 4) ist ein bisdesmosidisches Estersaponin, an der 3-OH-Gruppe des Aglykons ist β -D-Glucose verbunden, an dem 28-Carboxyl ist ein lineares Tetrasaccharid gebunden, dessen Fucose an der 4-OH-Gruppe mit 3,4-Dimethoxyzimtsäure verestert ist.

Im Unterschied zum Senegin II sind Senegin III (Synonym: Onjisaponin B) (Abbildung 5, Seite 6) ebenso wie das Senegin IV im Fucoseteil nicht mit Dimethoxyzimtsäure verestert, sondern mit 4-Methoxyzimtsäure. Bei den Seneginen II bis IV können die Zimtsäurereste als E- oder Z-Isomer vorliegen (Hänsel und Sticher, 2010).

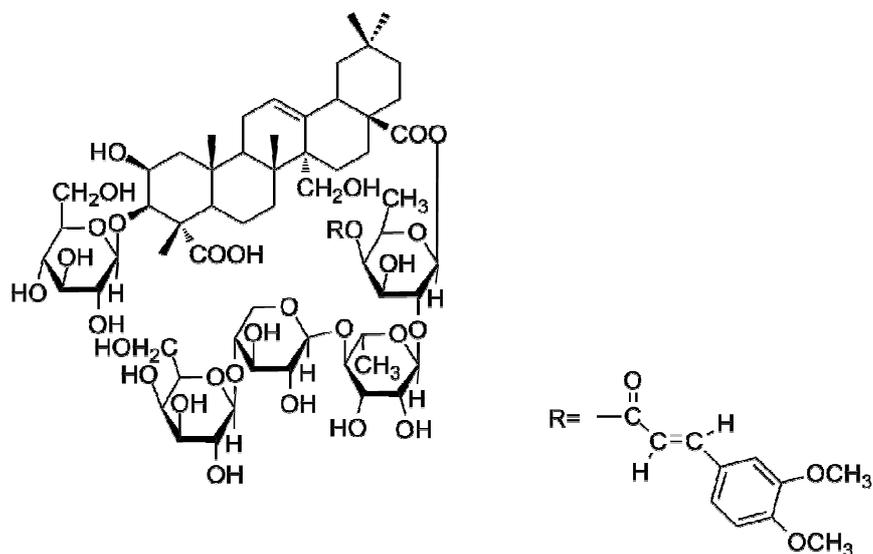


Abbildung 4. Senegin II

EINLEITUNG

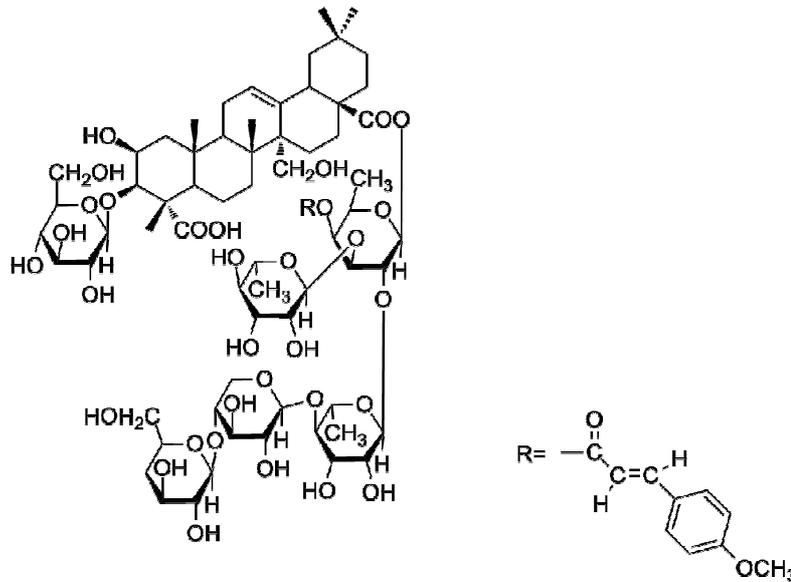


Abbildung 5. Senegin III (Synonym: Onjisaponin B)

Weitere wichtige Inhaltsstoffe der Polygala-Wurzel sind Senegosen A-O in *Polygala senega* sowie Xanthone und Xanthonglykoside (Wichtl, 2009). Zusätzlich sind verschiedene Mono- und Oligosaccharide und rund 5% Lipide mit dem Hauptbestandteil Ölsäure enthalten, die für den ranzigen Geruch bei längerer Lagerung verantwortlich sind. Das in der frischen Pflanze vorkommende Primverosid wird beim Trocknen durch eine pflanzeeigene Glucosidase zu Methylsalicylat gespalten (Leistner und Breckle, 2000), welches man an der Droge als typischen, schwach aromatischen Geruch wahrnehmen kann (Schilcher et al., 2007). Weiters finden sich in *Polygala senega* ätherisches Öl sowie Flavonoide, wobei vor allem Isorhamnetin- und Quercetinderivate vorherrschen (Blaschek, 2007).

Wirkung und pharmazeutische Anwendung der Droge

Medizinische Verwendung findet die Wurzeldroge oder Polygalae radix. Sie besteht aus der getrockneten, meist zerkleinerten Wurzel und dem Wurzelkopf von *Polygala senega* und bestimmten anderen eng verwandten Arten sowie aus Mischungen dieser Arten der Gattung Polygala (EuAB, 2011).

Polygala senega wird in der Heilkunde hauptsächlich als Expectorans angewandt. Aufgrund der (broncho-)sekretolytischen und expektorierenden Wirkung wird die Senegawurzel daher fein geschnitten oder grob pulverisiert als Bestandteil von Hustentees, zur Herstellung von Flüssig- oder Trockenextrakten oder Sirupen (z.B. Sirupus Senegae, ÖAB) in Fertigarzneimitteln bei Katarrhen der oberen Luftwege (Senegatinktur) eingesetzt (Teuscher et al., 2012).

EINLEITUNG

Nach Empfehlung der ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) soll die Senegawurzel bei Husten mit Auswurf, sogenanntem produktiven Husten, bei Katarrhen der Luftwege und bei chronischer Bronchitis angewandt werden (Quelle: siehe Fußnote ³). Ebenso beschreibt Wichtl (2009) die Anwendung der Senegawurzel in der Volksmedizin bei den oben beschriebenen Indikationsstellungen. Die Wirksamkeit der Wurzel Droge bei weiteren volksmedizinischen Anwendungen wie bei chronischem Asthma, Emphysem sowie zum Gurgeln bei Halsinfekten ist jedoch nicht belegt (Quelle: siehe Fußnote ⁴).

Der Anteil an Saponinen und Salicylsäurederivaten ist verantwortlich für die zusätzliche antiphlogistische Wirkung von *Polygala senega* (Van Wyk et al., 2004). Auszüge der Senegawurzel kommen auch als Adjuvans bei Impfungen zur Steigerung der spezifischen Immunreaktion zum Einsatz (Estrada et al., 2000).

Nachfolgend werden Zubereitungen, Dosierung und Tagesmaximaldosen (TD) der Senegawurzel angeführt.

Teezubereitungen:

- 0,5g fein geschnittene Droge werden mit einer Tasse kochendem Wasser übergossen und die Wurzelstücke nach 10 min durch ein Sieb entfernt (1 Teelöffel entspricht ca. 2,5g Droge) (Quelle: siehe Fußnote ⁴)
- 0,5g fein geschnittene Droge werden mit kaltem Wasser angesetzt, zum Sieden erhitzt und nach 10 min die Wurzelstücke durch ein Sieb entfernt (Quelle: siehe Fußnote ⁴)

Anwendung als Sekretolytikum: 2-3 mal täglich eine Tasse Tee, in schweren Fällen alle zwei Stunden, aber Nebenwirkungen beachten (Quelle: siehe Fußnote ⁴)

TD: 1,5-3,0g Droge oder Fluidextrakt (1:2), 2,5-7,5g Tinktur (1:10) (Schilcher, et al., 2007)

³ <http://books.google.at/books?id=xPn-uDwUOq4C&pg=PA400&lpg=PA400&dq=escop+polygala+senega&source=bl&ots=cteO-7gx0m&sig=czTkWXvoO-3m4RQdbW08qJRwNXI&hl=de&sa=X&ei=ImUbU5byH4ap7Qb1xYGQBA&ved=0CCoQ6AEwAA#v=onepage&q=escop%20polygala%20senega&f=false> (8.3.2014)

⁴ http://www.medizinalpflanzen.de/systematik/6_droge/polyga-r.htm (14.9.2013)

EINLEITUNG

Obwohl die genauen Wirkmechanismen bei *Polygala senega* noch nicht im Detail bekannt sind, werden die antiphlogistischen, expektorierenden und sekretfördernden Effekte dem Vorliegen von Saponinen und Methylsalicylsäure zugeschrieben (Van Wyk et al., 2004). Die expektorierende Wirkung erfolgt reflektorisch über den Nervus vagus durch Reizung der Magenschleimhaut und den damit ausgelösten parasympathischen Reflexen wie in Schilcher et al. (2007) ausgeführt. Wegen dieser Reizwirkung auf den Magen und Darm aufgrund des hohen Saponingehalts ist allerdings ein längerer Gebrauch nicht indiziert (Wagner, 1999).

Überdosiert sind auch Nebenwirkungen wie Brechreiz, Durchfall, Magenbeschwerden und Übelkeit möglich (Wichtl, 2009).

1.2 *Polygala tenuifolia* WILLD.

Polygala tenuifolia ist auch als Chinesischer Senega bekannt, dessen Wurzel als Polygalae Radix oder Yuan Zhi im Chinesischen Arzneibuch monographiert ist. In dieser Monographie wird mit identischen Anwendungsgebieten auch *Polygala sibirica* L. angeführt, welche aber in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wird (Chinesisches Arzneibuch, 2010). Aus Abbildung 6 (Quelle: siehe Fußnote ⁵) ist der Habitus von *Polygala tenuifolia* ersichtlich.



Abbildung 6. *Polygala tenuifolia* (WILLD.)

⁵ <http://www.hellotc.com/Herb/hrb227.shtml> (14.9.2013)

EINLEITUNG

Etymologie und historische Bedeutung

Nach Kalg (2009) entspricht die lateinische Bezeichnung „*tenuifolia*“ dem deutschen Wort feinblättrig, was auf das Aussehen der nahezu nadelförmigen Blätter des Krautes zurückzuführen ist. Sowohl *Polygala tenuifolia* als auch *Polygala sibirica* finden seit vielen Jahrhunderten Anwendung in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) und werden bereits in der Materia Medica unter dem Namen Yuan Zhi erwähnt, was übersetzt „weitreichender Wille“ bedeutet. Auch in der japanischen Kampo-Medizin wird die Wurzel von *Polygala tenuifolia* seit Jahrhunderten verwendet.

Herkunft, Verbreitung und Habitus

Polygala tenuifolia ist ein ausdauerndes Kraut, das in gemäßigten Regionen Asiens, vor allem im nördlichen China, Japan und Indien beheimatet ist (Hänsel und Sticher, 2010), wo es bevorzugt auf sandigen, steinigen Böden wächst (Kalg, 2009). Die bis zu 20 cm hohe Staude besitzt dünne, nadelförmige Blätter und blauviolett gefärbte Blüten.

Die gelbbraune Wurzel von *Polygala tenuifolia* ist zwischen 3-15 cm lang, leicht gekrümmt mit einem Durchmesser von 3-8 mm und weist eine ringförmige Furchung auf (siehe Abbildung 7). Häufig fehlt der hölzerne Anteil der Wurzel, da er bei der Aufbereitung entfernt wird. Gemäß TCM verursacht dieser Zentralkörper Unruhezustände, daher findet nur die Wurzelrinde mit dem überwiegenden Onjisaponin-Gehalt pharmazeutische Anwendung (Körfers und Sun, 2009). Die Wurzel besitzt einen scharf-süßlichen Geschmack, welcher in der TCM eine große Bedeutung für die zugeschriebene Wirkung hat.



Abbildung 7. Wurzel von *Polygala tenuifolia* (eigenes Bildmaterial)

EINLEITUNG

Eigenschaften

In der TCM werden Yuan Zhi bzw. *Polygala tenuifolia* die Eigenschaften bitter, scharf und warm zugeschrieben und es soll in die Leitbahnen von Niere, Herz und Lunge eintreten (Kalg, 2009). Der Geruch der Wurzel Droge ist schwach ausgeprägt und leicht stechend. Der Geschmack von *Polygala tenuifolia*-Wurzel erweist sich als bitter und etwas scharf und beim Kauen wird ein irritierender Sinneseindruck im Rachenbereich beschrieben (Chinesisches Arzneibuch, 2010).

Inhaltsstoffe

In der Wurzel von *Polygala tenuifolia* sind 6-12% Triterpensaponine enthalten (Jänicke et al., 2003). Die Hauptkomponente bilden dabei die sogenannten Onjisaponine mit dem Aglykon Presenegenin, welches ident in *Polygala senega* vorkommt. In Abbildung 8 ist Tenuifolin dargestellt, welches eine O-glykosidische Bindung mit einer β -D-Glucopyranose an Position 3 aufweist und die Grundstruktur der enthaltenen Saponine bildet. Die Onjisaponine weisen nur geringfügige Unterschiede im Zuckeranteil bzw. in der Substitution des Zimtsäurerests im Vergleich zu den Saponinen in *Polygala senega* auf.

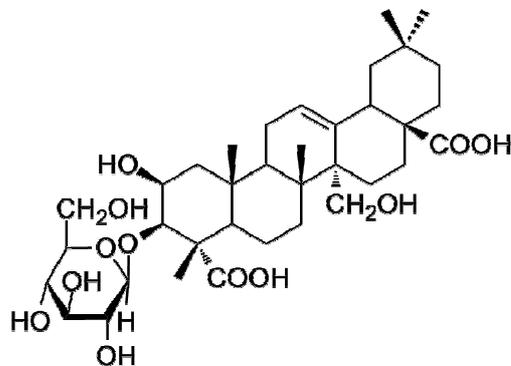


Abbildung 8. Tenuifolin

Die daraus abgeleiteten Onjisaponine zeigen strukturelle Vielfalt, da sie sich durch Positionierung und Anzahl der Zuckerbausteine an Position C28 sowie durch die unterschiedliche Methoxylierung am Zimtsäurerest unterscheiden (Jänicke et al., 2003). Hauptsächlich kommen Onjisaponine A – G, E, Z-Onjisaponin H, Onjisaponine V-Z und Vg in der Wurzel von *Polygala tenuifolia* vor (Blaschek, 2007; Klein et al., 2012). Beispielhaft wird in nachfolgender Abbildung 9 (Seite 11) Onjisaponin E dargestellt.

EINLEITUNG

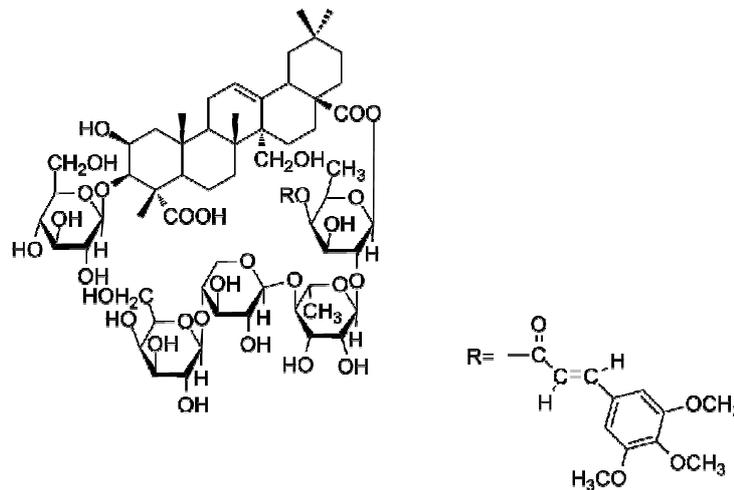


Abbildung 9. Onjisaponin E

Zusätzlich sind in der Wurzel von *Polygala tenuifolia* Oligosaccharidester mit Sinapinsäure und 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure, die sogenannten Tenuifoliosen A-P in geringer Menge vorhanden. Weiters sind Polygalit (Acerit, 1,5-Anhydrosorbit) und dessen Glykoside, z.B. Polygalit-2- α -galaktosid enthalten. Es kommen auch Xanthone und Xanthonglykoside (Polygalaxanthone IV-VII) vor (Jänicke et al., 2003).

Auch in *Polygala tenuifolia* sind Flavonoide hauptsächlich in Form von Isorhamnetin- und Quercetinderivaten enthalten (Shi et al., 2013). Des weiteren findet sich in der Wurzel ätherisches Öl, welches Carbonsäuren, Aldehyde und Alkohole aufweist. β -Carbolinalkaloide sind nur in Spuren vorhanden (Blaschek, 2007).

Wirkung und pharmazeutische Anwendung der Droge

Die Wirkung von *Polygalae radix* entspricht medizinisch und pharmazeutisch jener von *Polygala senega*, die Droge wird daher in Europa bei ähnlichen Indikationsstellungen eingesetzt (Hänsel und Sticher, 2010; Heinrich et al., 2004). In der TCM hingegen hat die Wurzeldroge von *Polygala tenuifolia* noch weitere Anwendungsgebiete. Folgende Wirkungen werden im Chinesischen Arzneibuch (2010) angegeben: *Polygala tenuifolia* beruhigt den Geist, führt zum Wiederauffüllen der Weisheit, koordiniert Herz und Niere, vertreibt Trägheit, stoppt Husten und reduziert Abszesse und Schwellungen. Demzufolge wird der Wurzelauszug bei Schlaflosigkeit, Vergesslichkeit oder Zerstreuung, Herzklopfen (durch schlechtes Herz-Nieren-Zusammenspiel), Schleimauswurf, Geschwüren und Schwellungen sowie Brustschwellungen angewandt.

EINLEITUNG

In der TCM und in der Kampo-Medizin wird *Polygala tenuifolia* zur Vorbeugung von Demenz eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass in vitro die Sekretion von β -Amyloid gehemmt wird (Hänsel und Sticher, 2010). Die neuroprotektive Wirkung des ethanolschen Wurzelextrakts wurde auch durch Studien von Xue et al. (2009), Lee et al. (2009) und Shin et al. (2009) belegt.

Die hemmende Wirkung vom wässrigen *Polygala tenuifolia*-Wurzelextrakt auf den Tumornekrosefaktor (TNF- α) wurde von Kim et al. (1998) nachgewiesen. Diese Ergebnisse postulieren einen antiinflammatorischen Effekt auf das zentralnervöse System. Die in der Wurzel von *Polygala tenuifolia* enthaltenen Onjisaponine sind für den Einsatz als Adjuvans bei Influenza- und Diphtherie-Pertussis-Tetanus-Impfstoffen geeignet (Nagai et al., 2001).

Ebenso wie bei *Polygala senega* ist der Wirkmechanismus der Wurzeldroge von *Polygala tenuifolia* noch nicht zur Gänze erforscht. Die expektorierende und sekretolytische Wirkung ist auf die enthaltenen Onjisaponine zurückzuführen und erfolgt wie bei *Polygala senega* ebenfalls über die Reizung des Nervus vagus (Schilcher et al., 2007). Eine Prozessierung der Polygala-Wurzelrogen wird im Chinesischen Arzneibuch beschrieben. Auch laut Kalg (2009) soll Polygalae Radix (Yuan Zhi) mit Süßholzdekot (*Glycyrrhiza glabra*) weiterbehandelt werden, um einer übermäßigen Reizung der Schleimhäute vorzubeugen. Der bereits erwähnte neuroprotektive Effekt wird dem enthaltenen Tenuifolin zugeschrieben, welches die Beta-Amyloid-Synthese in vitro (Lv et al., 2009) sowie die Acetylcholin-Esterase in vivo hemmt (Zhang et al., 2008).

Im folgenden Kapitel wird auf die Notwendigkeit einer Aufnahme des Fluidextrakts von *Polygala tenuifolia* ins Österreichische Arzneibuch näher eingegangen.

2. Problemstellung

Derzeit ist in der vorhandenen Monographie für „*Polygalae radix*“ im Europäischen Arzneibuch bereits definiert, dass sowohl *Polygala senega* als auch eng verwandte Arten oder eine Mischung der Arten von *Polygala* zur pharmazeutischen Nutzung zugelassen sind (EuAB, 7. Ausgabe, 2011). Allerdings wird hierbei nicht genau festgelegt, um welche Arten der Gattung *Polygala* es sich im Detail handelt.

Die europäische Marktsituation für *Polygala* Wurzeldrogen hat sich entsprechend dieser Bestimmungen verändert. Beim Einkauf von *Polygala senega* können die meisten Chargen bei näherer Betrachtung mit hoher Wahrscheinlichkeit als *Polygala tenuifolia* identifiziert werden. Bereits bei Mascotti (2014) wurde Drogenmaterial von *Polygalae radix* näher untersucht, wobei ein Großteil der Proben der Art *Polygala tenuifolia* zugeordnet werden konnte. Demnach wird derzeit am europäischen Markt bereits *Polygala tenuifolia* als *Polygalae radix* vertrieben.

Ein Hauptgrund für die derzeit vorherrschenden Marktverhältnisse ist der unterschiedliche Preis der Wurzeldrogen. Die Wurzel von *Polygala tenuifolia*, die aus dem asiatischen Raum stammt, ist um etwa das zehnfache billiger erhältlich als die Wurzel der in Nordamerika heimischen Pflanze *Polygala senega*. Aufgrund des geringeren Preises wird *Polygala tenuifolia* häufig als *Polygalae radix* vermarktet. Da laut Europäischem Arzneibuch beide Arten zugelassen sind und demnach keinerlei Einschränkung im Vertrieb der beiden Wurzeln vorliegt, ist das Überwiegen von *Polygala tenuifolia* auf dem europäischen Markt die unmittelbare Folge. Zur Überprüfung dieser aktuellen Marktsituation sollen in der vorliegenden Diplomarbeit 57 Proben von *Polygalae radix* analysiert werden, welche von verschiedenen europäischen Importeuren stammen. Aufgrund dieser Ergebnisse sollen anschließend Fluidextrakte analysiert und bewertet werden.

Da *Polygala tenuifolia* in Europa nachweislich schon in breitem Umfang in Verwendung ist, sollte auch einer Aufnahme des Fluidextraktes – hergestellt aus *Polygala tenuifolia* – ins Österreichische Arzneibuch demnach möglich sein. Die Identifizierung und Unterscheidung der Wurzeldrogen im Rahmen dieser Diplomarbeit dient somit als wichtige Grundlage für die Erstellung der Monographie des Fluidextraktes.

PROBLEMSTELLUNG

Die Aufnahme einer Monographie „*Polygalae extractum fluidum*“ soll laut Österreichischem Arzneibuchgesetz (§ 1) erfolgen und die „*Qualitätssicherung [...] soweit es zum Schutz der Gesundheit von Mensch und Tier, insbesondere zur Gewährleistung einer einwandfreien Qualität und zur Kontrolle von Arzneimitteln bei deren Herstellung oder Inverkehrbringen geboten ist*“ gewährleisten (Quelle: siehe Fußnote ⁶).

Im anschließenden Kapitel werden die für die Erstellung der Monographie verwendeten Materialien und Methoden im Detail beschrieben.

⁶ <http://www.basg.gv.at/arzneimittel/oesterreichisches-arzneibuch/> (11.9.2013)

3. Material und Methoden

3.1 Material

Obwohl sich die Monographie auf den Fluidextrakt von *Polygalae radix* (EuAB) bezieht, wurden zuerst auch zahlreiche Untersuchungen mit entsprechendem Drogenmaterial der beiden Polygala Arten als auch mit einer möglichen Verfälschung *Glinus oppositifolius* durchgeführt. Die vorhandenen 57 Wurzel-Proben eigneten sich für die Ausarbeitung der Unterscheidungsmerkmale der beiden Polygala Arten sowie deren Verfälschung, die Ergebnisse können in Folge auf den Fluidextrakt übertragen werden.

In der Arbeit von Mascotti (2014) wurde ein Teil des für die vorliegende Diplomarbeit verwendeten Drogenmaterials bereits identifiziert. Von den 15 untersuchten Proben RS24-RS38 konnten vier als *Polygala tenuifolia* (RS24, RS25, RS26, RS36), zehn als *Polygala senega* (RS27, RS28, RS29, RS30, RS31, RS32, RS33, RS34, RS37, RS38) und eine Probe als *Glinus oppositifolius* (RS35) bestimmt werden.

In Tabelle 1 sind die getrockneten und teilweise geschnittenen Drogen aufgeführt, die mit Ausnahme der mikroskopischen Analyse zu feinem Pulver gemahlen wurden. Mittels Siebanalyse wurden die Pulver einheitlich auf eine Korngröße von 355 µm (EuAB) gebracht.

3.1.1 Untersuchungsmaterialien

Tabelle 1. Zur Verfügung stehendes Probenmaterial (Wurzeldroge)

Kürzel	Name / Bezeichnung	Batch-Nr.	Lieferant (falls angegeben)
RS01	Radix Senega	34675	William Ransom & Son plc 1
RS02	Radix Senega	35455	William Ransom & Son plc 1
RS03	Radix Senega	35363	William Ransom & Son plc 1
RS04	Radix Senega	34522	William Ransom & Son plc 1
RS05	Radix Senega	36663	William Ransom & Son plc 1

MATERIAL UND METHODEN

RS06	Radix Senega	36258	William Ransom & Son plc 2
RS07	Radix Senega	36919	William Ransom & Son plc 2
RS08	Senega Radix	Ch. 05/2008-01	Phytolab
RS09	Senega Radix	Ch. PAS-08-085	Phytolab
RS10	Senega Radix	Ch. PAS-08-086	Phytolab
RS11	Senega Radix	Ch. 04110498	Phytolab
RS12	Senega Radix	Ch. 2355000	Phytolab
RS13	Polygalae Radix	640101	Plantasia
RS15	<i>P. senega</i>		Université de Liège (Luc Angenot)
RS16	Rd. senegae (<i>P. senega</i>)	R/505	
RS17	Rd. senegae	R/508	
RS18	<i>P. senega</i>	R/509	
RS19	Senegawurzel	1192902, 09025422/al	Dixa / Pharmonta Dr. Fischer GmbH
RS20	Rd. Senegae Polygalae radix / yuan zhi	0904-5427/al	Chinese medical Center
RS21,	<i>P. tenuifolia</i>	09045426/al	
RS22	<i>Glinus oppositifolius</i>		Université de Liège (Luc Angenot)
RS23	<i>P. senega</i>		
RS24	Polygalae Rx.	240101	
RS25	Polygalae Rx.	310101	
RS26	Polygalae Rx.	410101	
RS27	no name		
RS28	Polygalae senegae radix	0904-5423/al	
RS29	Polygalae radix	0906A	Phytolab
RS30	Polygalae radix	0810A	Phytolab
RS31	Polygalae radix	0812A	Phytolab
RS32	Radix Senegae (Julius Grossmann)	F3153	
RS33	Senegae radix concisa	F3154	

MATERIAL UND METHODEN

RS34	Senegawurzel ganz	2226/13 128332	Martin Bauer Group
RS35	Senegawurzel Ph.Eur.7.0	2804	Kottas / Pharmonta Dr. Fischer GmbH
RS36	Senegawurzel Ph.Eur.7.0	P20943	Dixa / Pharmonta Dr. Fischer GmbH
RS37	Rd. Senegae cs	P11309049	Kottas Pharma
RS38	Rd. Senegae cs	P11309220	Kottas Pharma
RS39	Radix Polygala Senega	6590A080902	Université de Liège
RS40	<i>P. senega</i>		Université de Liège
RS41	"Polygala de China"		Université de Liège
RS42	Rad. Senegae September 2004		Sammlung Department für Pharmakognosie, Universität Wien
RS43	<i>P. tenuifolia</i> A		
RS44	<i>P. tenuifolia</i> B		
RS45	<i>P. senega</i> Yvonne		
RS46	Senegawurzel geschn.	18583/13 135284	Martin Bauer Group
RS47	Radix Senegae cs.	P13301876	Kottas Pharma
RS48	Senegawurzel	6571B130910	Pharmonta Dr. Fischer GmbH
RS49	Senegawurzel	11005516	Pharmonta Dr. Fischer GmbH
RS50	Senegawurzel	P209431	Pharmonta Dr. Fischer GmbH
RS51	Senegawurzel	6571B130326	Pharmonta Dr. Fischer GmbH
RS52	Polygalae rx.	930101	Plantasia
RS53	Polygalae radix	21100252	EDQM
RS54	Radix Senegae	5037/1113	Gatt Koller
RS55	Radix Senegae	5084/1112	Gatt Koller
RS56	Polygalae radix	Sammeljahr 2008	Kwizda Pharmahandel GmbH
RS57	Polygalae radix	Sammeljahr 2009	Kwizda Pharmahandel GmbH
RS58	Polygalae radix	Sammeljahr 2011	Kwizda Pharmahandel GmbH

MATERIAL UND METHODEN

Aus nachfolgender Tabelle 2 kann man die Herkunft und Chargennummern der getesteten Polygala-Fluidextrakte entnehmen. Laut Angaben der jeweiligen Hersteller wurden sämtliche untersuchten Fluidextrakte durch Mazeration, also durch Extraktion der Drogen mit Ethanol bei Zimmertemperatur, gewonnen.

Tabelle 2. Untersuchte Fluidextrakte

Kürzel	Name	Batch-Nr.	Lieferant
ESF1	Extractum senegae fluidum	PH-043/13	Pharmonta Dr. Fischer GmbH
ESF2	Extractum senegae fluidum	PH-371/11	Pharmonta Dr. Fischer GmbH
ESF3	Extractum senegae fluidum	1021	Pharmonta Dr. Fischer GmbH
ESF4	Extractum senegae fluidum	1012	Pharmonta Dr. Fischer GmbH
ESF5	Extractum senegae fluidum	120201	Europlant Group
ESF6	Extractum senegae fluidum	100801	Europlant Group
ESF7	Extractum senegae fluidum	5959/ 01 14 02 14	Gatt-Koller
ESF8	Extractum senegae fluidum	PH-011/14 1013	Pharmonta Dr. Fischer GmbH

3.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Die zur Analyse des Drogenmaterials sowie der Fluidextrakte verwendeten Chemikalien und Reagenzien werden nachfolgend aufgeführt. Sämtliche im Rahmen der Probenuntersuchungen verwendeten Reagenzien entsprechen den Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs (2011) und besitzen pro analysi (p.a.) Qualität.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3. Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Verwendung	Chemikalie	Hersteller
Mikroskopie	Chloralhydrat 60%	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
	Ethanol 96%	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Extraktion	Ethanol 70% <i>R</i>	hergestellt aus Ethanol 96% und Wasser <i>R</i>
Dünnschicht- chromatographie	Ameisensäure, wasserfrei (FM2)	Gatt Koller, Absam, Österreich
	Anisaldehyd (= 4-Methoxybenzaldehyd)	Merck, Wien, Österreich
	Dichlormethan (FM1)	VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland
	Essigsäure 99% (FM1)	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
	Essigsäure, wasserfrei (FM 2)	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
	Ethylacetat (FM2)	VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland
	Methanol (FM1)	VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland
	Naturstoffreagenz A (NST, Diphenylboryloxyethylamin <i>R</i>)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	Polyethylenglykol (PEG) 400	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure, konz.	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	
mehrere Verwendungszwecke	Wasser <i>R</i>	Wasser dest., Herstellung Universität Wien, entspricht Wasser <i>R</i> des Ph.Eur.7

MATERIAL UND METHODEN

In Tabelle 4 werden die für die Dünnschichtchromatographie verwendeten Referenzsubstanzen zusammengefasst.

Tabelle 4. Verwendete Referenzsubstanzen

Substanz	Herkunft
Chlorogensäure	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland Batch-Nummer: 4549 Reinheit: purissimum
Cynarin	Trans MIT, Marburg, Deutschland Batch-Nummer: 04-11 Reinheit: > 98%
D(-)-Fructose	Merck, Wien, Österreich Batch-Nummer: 1053230250 Reinheit: purissimum
Glucose (Dextrose)	Lab M Limited, Heywood, Großbritannien Batch-Nummer: MC013-A Reinheit: purissimum
Hyperosid	Extrasynthese, Genay, Frankreich Batch-Nummer: 11101724 Reinheit: ≥ 98%
Monoammoniumglycyrrhizat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz Batch-Nummer: 101304461 Reinheit: ≥ 90%
Rutin	Extrasynthese, Genay, Frankreich Batch-Nummer: 11101722 Reinheit: ≥ 99%
Saccharose	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz Batch-Nummer: 58284 53K Reinheit: purissimum

3.2 Methoden

Dieses Kapitel enthält Beschreibungen der angewendeten Methoden zur Durchführung der praktischen Arbeit dieser Diplomarbeit. Mit Ausnahme der Mikroskopie der Wurzeln musste die Droge für sämtliche Methoden pulverisiert vorliegen. Anschließend an die Zerkleinerung mit einer Mühle wurde durch eine Siebanalyse ein einheitlicher Zerkleinerungsgrad gewährleistet (355 µm nach EuAB).

3.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC oder engl. TLC = Thin Layer Chromatography) ist eine Methode, die zur physikalisch-chemischen Stofftrennung bzw. zur Identifizierung organischer und anorganischer Verbindungen eingesetzt wird. Das Trennprinzip dieser planaren Chromatographie beruht auf einer mobilen Phase (Fließmittel, FM), die an einer ruhenden, stationären Phase vorbeiströmt. Zu einer Auftrennung der Inhaltsstoffe kommt es aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten, die durch verschiedene Interaktionen mit der stationären Phase in Abhängigkeit von ihrer Polarität bedingt sind (Böcker, 1997).

In dieser Diplomarbeit wurden zwei Arten von mit Kieselgel beschichteten Platten eingesetzt, die sich in der Korngröße des Kieselgels unterscheiden. Hauptgrund für die Auswahl dieser beiden stationären Phasen ist eine Harmonisierung mit dem EuAB, die zur Identifizierung sowohl TLC als auch HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) vorschreibt. Mittels HPTLC wird eine bessere Trennleistung der Analytate bei reduzierter Auftragemenge und kürzerer Laufstrecke sowie Laufzeit erzielt. Entsprechend der enthaltenen Stoffgruppen wurden auch zwei unterschiedliche Fließmittelsysteme zur Trennung von Triterpensaponinen sowie Flavonoiden und phenolischen Verbindungen eingesetzt.

Im Anschluss an die Entwicklung erfolgte die Detektion der Inhaltsstoffe im Tageslicht oder mittels UV-Lampe bei Wellenlänge 254 nm und/oder 366 nm. Die verwendeten Kieselgelplatten enthielten einen Fluoreszenzindikator, der bei Anregung durch Licht mit 254 nm grün fluoresziert. Dadurch ist eine Reduktion dieser Emission (Fluoreszenzlöschung) durch die aufgetrennten Inhaltsstoffe als dunkle Bande erkennbar. Weiters kann die Detektion bei Tageslicht und bei UV-Licht von 266 nm erfolgen. Weil aber viele Analysesubstanzen weder eine Eigenfarbe noch starke Fluoreszenz aufweisen, wurden die entwickelten Banden postchromatographisch mit einem entsprechenden Reagenz (AAS oder NST-PEG) besprüht bzw. darin getaucht.

Die Auswertung der Auftrennung erfolgte durch Fotografieren der entwickelten Platte unmittelbar nach dem Trocknen bzw. Besprühen mit dem Reagenz. Eine qualitative Auswertung der detektierten Inhaltsstoffe wurde nach relativer Laufstrecke (R_f -Werte) und Vergleich mit einem ebenfalls mitentwickelten Reinsubstanz-Standard durchgeführt.

MATERIAL UND METHODEN

In Tabelle 5 werden die Kriterien der beiden eingesetzten stationären Phasen näher beschrieben.

Tabelle 5. Stationäre Phasen

Thin Layer Chromatography (TLC)	Kieselgel 60 F ₂₅₄ auf Alufolie (5 – 40 µm) 20 x 20 cm Firma Merck (Darmstadt, Deutschland)
High Performance Liquid Chromatography (HPTLC)	Kieselgel 60 F ₂₅₄ auf Glas (2 – 10 µm) 10 x 20 cm Firma Merck (Darmstadt, Deutschland)

Nachfolgende Tabelle 6 stellt die verwendeten Fließmittelsysteme, Referenzlösungen, Auswertungsmethoden, Sprühreagenzien sowie Unterschiede in der Durchführung der Dünnschichtchromatographie gegenüber.

Tabelle 6. Analysenparameter für DC und HPTLC [abweichende Angaben für HPTLC in eckiger Klammer]

	Triterpensaponine	Flavonoide
Fließmittelsystem	<u>Fließmittelsystem 1 (FM1)</u> Dichlormethan <i>R</i> , Essigsäure 99% <i>R</i> , Methanol <i>R</i> , Wasser <i>R</i> (60:32:12:8 V/V/V/V)	<u>Fließmittelsystem 2 (FM2)</u> Ethylacetat <i>R</i> , Essigsäure, wasserfreie <i>R</i> , Ameisensäure, wasserfreie <i>R</i> , Wasser <i>R</i> (100:11:11:26 V/V/V/V)
Referenzlösung	2,0 mg Monoammonium-glycyrrhizat <i>R</i> und 2,0 mg Saccharose <i>R</i> in 1 ml Ethanol 70 % <i>R</i> gelöst	2,0 mg Rutin <i>R</i> , 2,0 mg Hyperosid <i>R</i> und 5,0 mg Chlorogensäure <i>R</i> in 10 ml Methanol <i>R</i> gelöst
Auftragemenge	5 µl; bandförmig (10 mm) [oder 2 µl; bandförmig (8 mm)]	5 µl; bandförmig (10 mm) [oder 2,5 µl; bandförmig (8 mm)]
Laufstrecke	12 cm [oder 6 cm]	12 cm [oder 6 cm]
Trocknen	in der Luft	in der Luft
Auswertung 1	vor dem Besprühen: bei 254 nm und 365 nm	vor dem Besprühen: bei 254 nm und 365 nm

MATERIAL UND METHODEN

Sprühreagenz	Anisaldehydreagenz <i>R</i> (0,5 ml Anisaldehyd mit 10 ml Eisessig und 85 ml Methanol und 5 ml konz. Schwefelsäure in aneugegebener Reihenfolge mischen); erhitzen bei 105-110°C für 5-10 min	Diphenylboryloxyethylamin <i>R</i> (Naturstoffreagenz A; 1%ige methanolische Lösung) und anschließend Macrogol 400 <i>R</i> (PEG; 5%ige ethanolische Lösung); trocknen an der Luft für 30 min
Auswertung 2	nach dem Besprühen: bei Tageslicht und 365 nm	30 Minuten nach dem Besprühen: bei 365 nm

Das Auftragen der Banden für die HPTLC und die Entwicklung der Platten erfolgte mit einem Gerät der Firma Camag (Muttens, Schweiz):

Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4):	200472
Automatic Developing Chamber (ADC 2):	200267
TLC Visualizer:	200496
Software:	Vision Cats

3.2.2 Ethanolgehalt

Zur Überprüfung, ob der vom Hersteller angegebene Prozentsatz an Alkohol im Fluidextrakt enthalten ist bzw. um nachträgliche, verfälschende Verdünnungen festzustellen, wurde der Ethanolgehalt über die Dichtemessung ermittelt.

Die Durchführung der Ethanolgehalts-Bestimmung erfolgte nach der Vorschrift des EuAB mittels Pyknometer (2.9.10). Hierfür wurde zunächst die entsprechende Apparatur (Abbildung 10 A, Seite 24) eingesetzt: In den 500 ml Rundkolben mit Siedesteinchen wurde ein 25,00 ml-Aliquot des Fluidextrakts gefüllt und mit 100-150 ml Wasser *R* versetzt. Durch die Hitze der Bunsenbrenner-Flamme wurde Ethanol durch Destillation quantitativ in einen 100 ml Messkolben überführt und mindestens 90 ml Destillat aufgefangen. Nach einem etwa 30-minütigen Temperatúrausgleich wurde mit Wasser *R* auf 100,00 ml aufgefüllt und gut vermischt. Anschließend wurde mit einem Pyknometer (Abbildung 10 B, Seite 24) die Masse eines definierten Volumens dieses Gemisches festgestellt und daraus die Dichte bei der vorliegenden Temperatur berechnet.

MATERIAL UND METHODEN

Zur Ermittlung des Ethanolgehalts (Gewichtsprozent) im binären Ethanol-Wasser-Gemisch wurden mit der Tabelle aus dem EuAB die Werte bei der Standardtemperatur (20°C) entnommen. Der erhaltene Wert wurde anschließend mit 4 multipliziert, um den entsprechenden Ethanolgehalt in Prozent (V/V) in 100 ml Fluidextrakt zu erhalten.

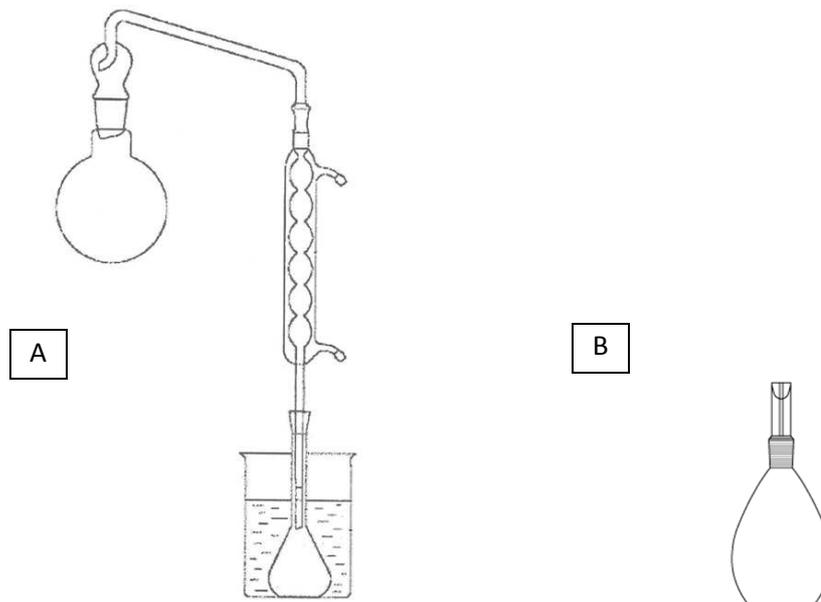


Abbildung 10. Schematische Darstellung der Apparatur für Ethanolgehaltsbestimmung (A) nach EuAB (2.9.10) und Pyknometer (B)

3.2.3 Schaumindex

Der hämolytische Index (HI), die früher eingesetzte Methode zur Wertbestimmung von saponinhaltigen Drogen, wird heute aufgrund der Problematik der Blutbeschaffung nicht mehr durchgeführt. Die in dieser Diplomarbeit durchgeführte Methode zur Wertbestimmung der Triterpensaponine mittels Schaumindex beruht auf deren Oberflächenaktivität, einem universellen Charakteristikum von Saponinen, die zur Bildung von stabilen Schäumen führt (Bellenot, 2014).

Zur Durchführung des Schaumindex wurden zunächst eine Referenz- sowie eine Untersuchungslösung hergestellt. Als Ausgangssubstanz für die Referenzlösung diente eine Ammoniumlaurylsulfatlösung ($300 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ in Wasser *R*), von der 3,3 g auf 25,0 g mit Wasser *R* verdünnt wurden. 2 g dieser Lösung wurden erneut mit Wasser *R* auf 100 g verdünnt und homogenisiert und somit eine 4%ige Lösung von Ammoniumlaurylsulfat hergestellt. Für die Untersuchungslösung wurden 1,0 g

MATERIAL UND METHODEN

pulverisiertes Drogenmaterial bzw. 1,0 g Fluidextrakt in einem 250 ml Becherglas eingewogen. Um die Saponine aus der Pulverdroge zu extrahieren, wurde diese eine halbe Stunde mit den ersten 50,0 ml Wasser *R* unter häufigem Umschwenken und weitere 30 Minuten mit den zweiten 50,0 ml ohne Umschwenken stehen gelassen. Bei den Fluidextrakten wurden ohne Wartezeiten nur einmalig 100,0 ml Wasser *R* hinzugefügt.

Für die Bestimmung des Schaumindex wurden der Untersuchungs- oder Referenzlösung zuerst 50,0 ml mit einer Vollpipette entnommen. Die restlichen 50 ml wurden möglichst ohne Schaumbildung in eine 250 ml Mensur mit 1 ml - Skalierung (innerer Durchmesser 3 cm) überführt. Aus 45 cm Höhe zum Mensurboden wurde die Flüssigkeit aus der Pipette abgelassen, wobei für eine gleichförmige Entleerung der Peleus-Ball abgezogen wurde. Der dabei gebildete Schaum wurde in der Höhe (cm) bzw. im Volumen (ml) vermessen und mit der nachfolgenden Formel der Schaumindex bestimmt:

$$\frac{\left(\frac{P}{T}\right) * 1000}{C}$$

P = Mittelwert der Schaumhöhe aus 3 Messungen der Untersuchungslösung
(gemessen in cm oder ml)

T = Mittelwert der Schaumhöhe aus 3 Messungen der Referenzlösung (gemessen
in cm oder ml)

C = Konzentration der Untersuchungslösung in g/l

Die in Abbildung 11 (Seite 26) dargestellte Apparatur zur Durchführung des Schaumindex dient zur Veranschaulichung der verwendeten Methode.

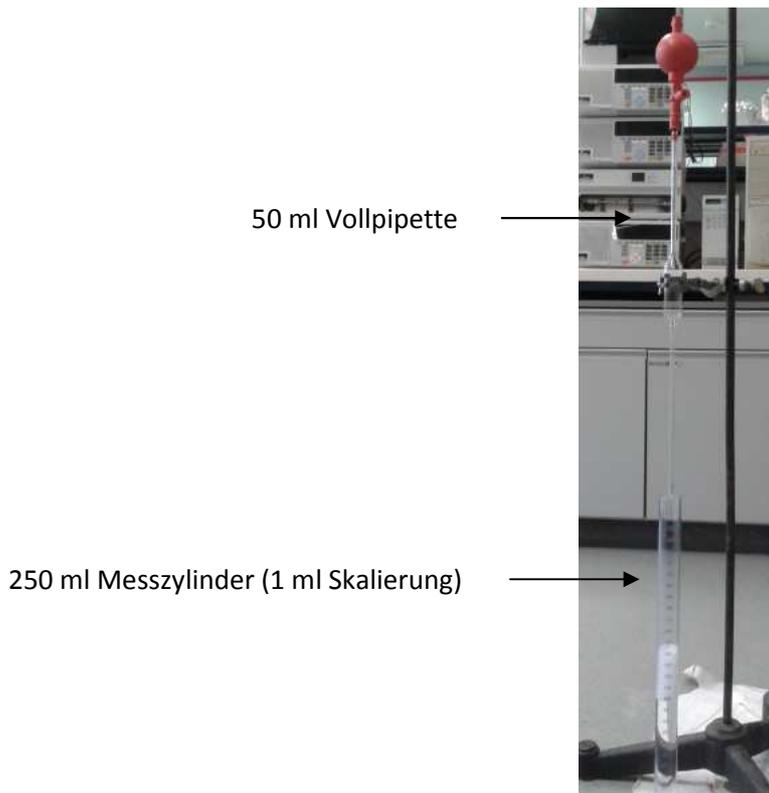


Abbildung 11. Apparatur zur Durchführung des Schaumindex

3.2.4 Infrarotspektroskopie (NIR und MIR)

Bei der Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR) handelt es sich um eine analytische Methode zur Strukturaufklärung und Stoffidentifizierung mithilfe von Infrarotlicht. Man kann dabei abhängig von Wellenzahl und Wellenlänge zwischen dem nahen Infrarot (NIR), dem mittleren Infrarot (MIR) und dem fernen Infrarot (FIR) unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit kamen zur Probenidentifizierung NIR (Wellenzahl: $10.000 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$; Wellenlänge: $1 - 2,5 \text{ }\mu\text{m}$) und MIR (Wellenzahl: $4.000 - 650 \text{ cm}^{-1}$; Wellenlänge: $2,5 - 15 \text{ }\mu\text{m}$) zur Anwendung.

Das Funktionsprinzip der IR beruht auf der Anregung eines Stoffes mit elektromagnetischen Wellen und der Absorption bestimmter Frequenzbereiche. Im MIR- und NIR-Bereich führt die Absorption zu einer Schwingungsanregung von Atomen bzw. Atomgruppen an ihren Molekülbindungen, wobei im NIR-Bereich die sogenannten Oberschwingungen des MIR-Bereich detektierbar sind (insbesondere von CH-, OH- und NH-Bindungen). Die spektroskopisch erfassten Frequenzen zur Schwingungsanregung sind charakteristisch für die jeweiligen Bindungen und ermöglichen die Identifizierung von Substanzen (Lambert et al., 2012).

MATERIAL UND METHODEN

Bei der Messung des Transmissionsgrades einer Probe wird die IR-Strahlung nicht absorbiert, sondern tritt durch die Probe hindurch. In der vorliegenden Untersuchung wurden jedoch die Modi der abgeschwächten Totalreflexion (ATR, Attenuated Total Reflectance) und der diffusen Reflexion (DRIFTS, diffuse Reflexionsspektroskopie) zur Unterscheidung der Proben nach Zugehörigkeit zu einer der beiden Polygala Arten bzw. der Verfälschung eingesetzt.

Wie aus nachfolgender Abbildung ersichtlich, wird bei der ATR-Infrarotspektroskopie die Strahlung in ein Reflexionselement (ATR-Kristall) geführt. Ein Teil der elektromagnetischen Energie dringt oberflächlich in die Probe ein und wird absorbiert. Es kommt jedoch zu keiner Totalreflexion, da bestimmte Frequenzbereiche durch die Probe absorbiert werden. Diese Bereiche fehlen nun im Spektrum des reflektierten Strahls und ergeben ein charakteristisches spektrometrisches Muster.

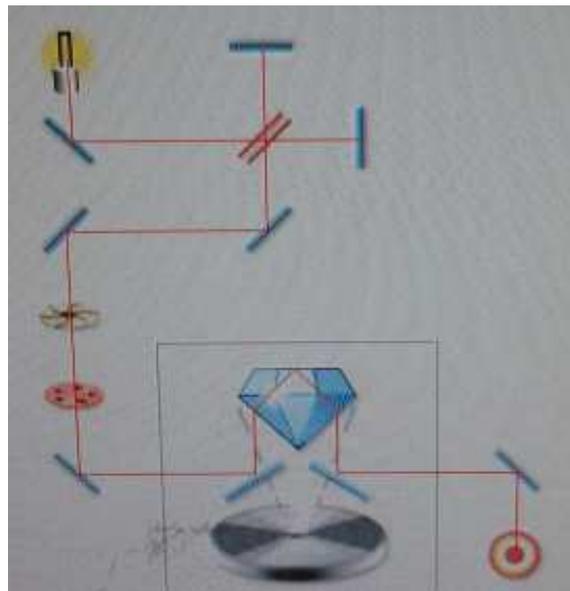


Abbildung 12. Strahlengang durch das ATR FT-MIR-Spektrometer nach Perkin Elmer

Bei der diffusen Reflexionsspektroskopie (DRIFTS) wird der Infrarotstrahl von der Probenoberfläche aufgrund der rauen Struktur nicht mehr gerichtet, sondern diffus reflektiert. Durch eine spezielle Spiegelanordnung wird diese diffus reflektierte Strahlung gebündelt und zum Detektor gelenkt. Das dabei entstehende Strahlenspektrum ermöglicht Rückschlüsse auf die Struktur der untersuchten Substanz.

MATERIAL UND METHODEN

Die spektroskopischen Messungen wurden an zwei Standgeräten und einem mobilen Handgerät (Phazir) sowohl an der pulverisierten Droge, an der ganzen Wurzel als auch am Fluidextrakt durchgeführt. Sämtliche Messgeräte wurden dankenswerterweise von der Leopold-Franzens Universität, Innsbruck, Institut für Analytische Chemie und Radiochemie (Leiter: O. Univ. Prof. Mag. Dr. Dr.h.c. Günther Bonn) zur Messung zur Verfügung gestellt. Nachfolgend werden verwendete Geräte sowie die eingesetzten Modi der spektroskopischen Untersuchungen aufgeführt.

ATR FT-MIR Spektroskopie:

Gerät	Perkin Elmer Spectrum 100 mit uATR Modul
Modus	ATR (abgeschwächte Totalreflexion)



Abbildung 13. ATR FT-MIR Spektrometer nach Perkin Elmer

MATERIAL UND METHODEN

FT-NIR Spektroskopie

Gerät Büchi NIRFlex N500 mit Solids Messzelle
Modus diffuse Reflexion



Abbildung 14. FT-NIR-Spektrometer nach Büchi mit Solids Messzelle und Vial add-on



Abbildung 15. FT-NIR-Spektrometer nach Büchi mit Solids Messzelle und Fiber Optic add-on

MATERIAL UND METHODEN

Handheld FT-NIR Spektroskopie

Gerät Thermo Scientific MicroPhazir GP 4.0
Modus diffuse Reflexion



Abbildung 16. Handheld FT-NIR-Spektrometer „Phazir“

4. Ergebnisse

4.1 Wurzeldroge

Zunächst werden Ergebnisse zu Identität, Reinheit und Wertbestimmung für das vorhandene Drogenmaterial von *Polygala senega*, *Polygala tenuifolia* und der Verfälschung *Glinus oppositifolius* präsentiert, um mit den erhaltenen Daten die entsprechenden Fluidextrakte auf artspezifische Charakteristika hin zu überprüfen und eindeutig einer der Arten zuordnen zu können.

4.1.1 Prüfung auf Identität

Das zu untersuchende Probenmaterial (n = 57) stammt aus unterschiedlicher Herkunft. Zur Identität der Wurzeldrogen ist wenig Information vorhanden und diese ist teilweise auch von zweifelhafter Validität. Daher ist eine Identitätsprüfung notwendig, um eine Zuordnung zu einer der beiden *Polygala*-Arten bzw. zu einer potentiellen Verfälschung vornehmen zu können. Die Unterscheidung der Proben erfolgte makroskopisch, mikroskopisch, dünnschichtchromatographisch und infrarotspektrometrisch, wobei die erhaltenen Ergebnisse bei allen vier Identitätsprüfungen übereinstimmen.

4.1.1.1 Makroskopie

Zur makroskopischen Unterscheidung der beiden Wurzeldrogen werden unterschiedliche Merkmale herangezogen. Die wichtigsten Aspekte in diesem Zusammenhang sind Form und Färbung der Wurzeln sowie die strukturellen Unterschiede in deren Oberflächentopographie. Farbunterschiede lassen sich auch bei der pulverisierten Droge feststellen, welche in Abbildung 17 deutlich erkennbar sind.



Abbildung 17. Pulverisierte Droge von *Polygala senega* (links), *Polygala tenuifolia* (Mitte) und *Glinus oppositifolius* (rechts)

ERGEBNISSE

Die unzerkleinerte Wurzel von *Polygala senega* kennzeichnet sich durch einen graubraunen, unregelmäßigen Wurzelkopf, der deutlich breiter als die gelegentlich verzweigte Wurzel mit höckrig-knorriger Gestalt ist. Der Durchmesser der Wurzel beträgt 1-8 mm, ist zur Spitze dünner werdend und die Wurzel ist schräg, longitudinal gestreift (Wagner, 1999). Der herablaufende, verlängerte, spiralige Kiel ist in unterschiedlicher Ausprägung vorhanden. Der unebene, fransige Bruch zeigt eine gelbe, verschieden dicke Rinde um einen blasseren, hölzernen Bereich (EuAB, 7. Ausgabe, 2011).

Bei *Polygala tenuifolia* weist die Wurzel eine gelblich, lichtbraune Farbe auf, die Oberfläche ist ringförmig gefurcht. Der eher glatte Bruch verläuft stufenförmig über den Querschnitt. Der hölzerne Teil der Wurzel fehlt oft, was meist auf die Entfernung des „Wurzelherzens“ zurückzuführen ist, da dies in der TCM zur Aufbereitung von Yuan Zhi gehört. Somit erhält die Wurzel ein schlauchartiges Aussehen, wobei ein zentraler Hohlraum von einer fleischigen Wurzelrinde umgeben ist. (Körfers und Sun, 2009)

Die Wurzel von *Glinus oppositifolius* zeigt als Verfälschung nur eine grobe Ähnlichkeit zu den *Polygala*-Arten. Einen wesentlichen Unterschied bildet die hell-beige Farbe der Wurzel. Im Vergleich zu *Polygala senega* ist eine ähnliche Furchung der Oberfläche, nämlich in longitudinaler Richtung, vorhanden. Der Wurzelkopf von *Glinus oppositifolius* ist deutlich kleiner als jener von *Polygala senega* und der Bruch ist unregelmäßig und fasrig.

In Abbildung 18 werden die untersuchten Wurzeldrogen im Vergleich gezeigt.



Abbildung 18. Wurzeln von *Polygala senega* (links), *Polygala tenuifolia* (Mitte) und *Glinus oppositifolius* (rechts)

ERGEBNISSE

Abschließend werden die makroskopischen Unterschiede und Charakteristika zur Differenzierung der untersuchten Wurzeldrogen tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 7. Makroskopische Differenzierung der Wurzeldrogen

	<i>Polygala senega</i>	<i>Polygala tenuifolia</i>	<i>Glinus oppositifolius</i>
Farbe	graubraun	gelblich, lichtbraun	hell-beige
Wurzelkopf	unregelmäßig, deutlich breiter als die Wurzel	–	deutlich kleiner als bei <i>Polygala senega</i>
Furchung	schräg, longitudinal gestreift	ringförmig gefurcht	longitudinal gefurcht
Kiel	vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden
Bruch	uneben, fransig	glatt, stufenförmig	unregelmäßig, fasrig
Querschnitt	blasser, hölzerner Bereich	hölzerner Teil fehlt oft	Holz blass beige
Rinde	gelbe, verschieden dicke Rinde	fleischige Wurzelrinde	Rinde beige bis hellbraun

4.1.1.2 Mikroskopie

Als Vorbereitung zur Anfertigung der Dünnschnitte wurde die Droge für 30-60 Minuten in Aqua dest. eingelegt und anschließend in Ethanol 96% konserviert. Durch Aufkochen des Präparates mit Chloralhydrat Lösung 60% R konnte die Probe mikroskopisch untersucht werden. Es wurden sowohl Querschnitte als auch zum Teil Längsschnitte der Wurzeln angefertigt. Probe RS45 wurde nicht mikroskopisch untersucht, da sie nur pulverisiert vorliegt.

Die mikroskopische Analyse der Wurzeldrogen bezog sich auf die Unterschiede von Kork, Tracheen, Tüpfel und Anteile der Gewebearten am Wurzeldurchmesser sowie eine grobe Abgrenzung zur Verfälschung *Glinus oppositifolius*. Mittelwertsunterschiede in den erhobenen Daten wurden mittels t-Test auf statistische Signifikanz ($\alpha = 0,05$) überprüft.

Bei Betrachtung der Korksicht zeigten sich zwischen den beiden *Polygala*-Arten signifikante Unterschiede sowohl was die Anzahl der Zellschichten als auch die Form der Korkzellen betrifft. Die Zellen wurden im Längs- und Querschnitt in ihrer Breite und Höhe vermessen und das resultierende Verhältnis zueinander berechnet.

ERGEBNISSE

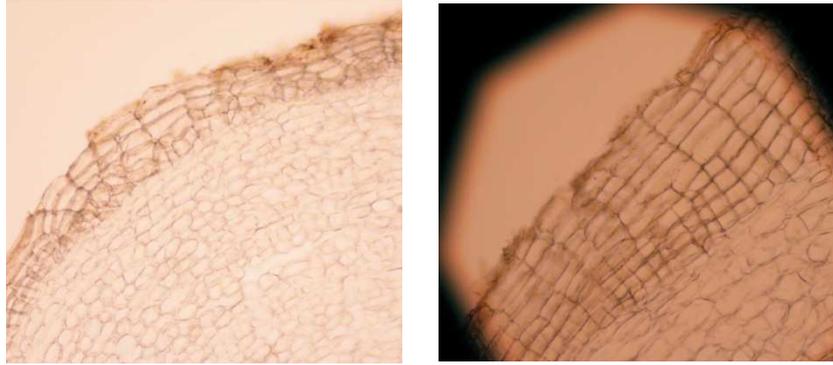


Abbildung 19. Mikroskopischer Vergleich des Korkgewebes von *Polygala senega* (links) und *Polygala tenuifolia* (rechts); 20-fache Vergrößerung

Wie aus Abbildung 19 entnommen werden kann, zeigen sich beim Korkgewebe von *Polygala tenuifolia* signifikant mehr Zellschichten als bei *Polygala senega*.

Im Querschnitt findet sich bei *Polygala tenuifolia* eine eher schmalere und langgestrecktere Zellform mit äußerst regelmäßiger Anordnung. Die Zellform bei *Polygala senega* variiert stärker und die Korkzellen sind unregelmäßig angeordnet. Im Längsschnitt ist bei *Polygala senega* eine rundliche Form der Korkzellen erkennbar, während bei *Polygala tenuifolia* eine rechteckige Zellform im Korkgewebe vorherrscht. Die mikroskopisch detektierten Unterschiede von 31 Wurzelproben wurden statistisch mittels t-Test auf Signifikanz überprüft und sind nachfolgend in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8. Vergleich der Mittelwerte (MW) der vermessenen Korkzellen

	<i>Polygala senega</i>	Signifikanz der Unterschiede	<i>Polygala tenuifolia</i>
Anzahl der Korkschichten (MW)	5,38	p < 0,001	7,24
Verhältnis Höhe/ Breite der Korkzellen Querschnitt (MW)	0,34	p = 0,009	0,20
Verhältnis Höhe/ Breite der Korkzellen Längsschnitt (MW)	0,94	p < 0,001	2,13

Die erhobenen mikroskopischen Daten erlauben eine Abgrenzung der beiden *Polygala*-Arten aufgrund der Unterschiede im Korkgewebe.

ERGEBNISSE

Zur Bestimmung der Form der Tracheen im Holzgewebe wurden der axiale (Höhe) und der radiale Durchmesser (Breite) der größten Gefäße vermessen. Zur Objektivierung der Tracheenform wurde ein eigens dafür festgelegter Ovalitätsindex (OI) berechnet, indem die gemessene Breite der Tracheen durch ihre Höhe dividiert wurde. Dabei wurde berücksichtigt, ob die Tracheen ihre längste Ausdehnung in radialer oder axialer Richtung aufweisen. Die absolute Abweichung von 1 gibt die Form der Tracheen unabhängig von ihrer Ausrichtung an. Je größer der ermittelte Wert ist, umso ovaler ist die Gestalt der Tracheen. Eine Analyse der Tracheenform im Querschnitt ergab folgendes Resultat (Tabelle 9).

Tabelle 9. Vergleich der Ovalitätsindices (OI) von *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia*

	<i>Polygala senega</i>	Signifikanz der Unterschiede	<i>Polygala tenuifolia</i>
MW der Ovalitätindices	0,28	$p = 0,038$	0,21

Auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ zeigen sich Unterschiede in der Tracheenform der beiden *Polygala*-Arten. Die großen Gefäße in *Polygala senega* sind in ihrer Gestalt eher oval, jene von *Polygala tenuifolia* weisen eine rundere Form auf, wie auch aus Abbildung 20 entnommen werden kann.

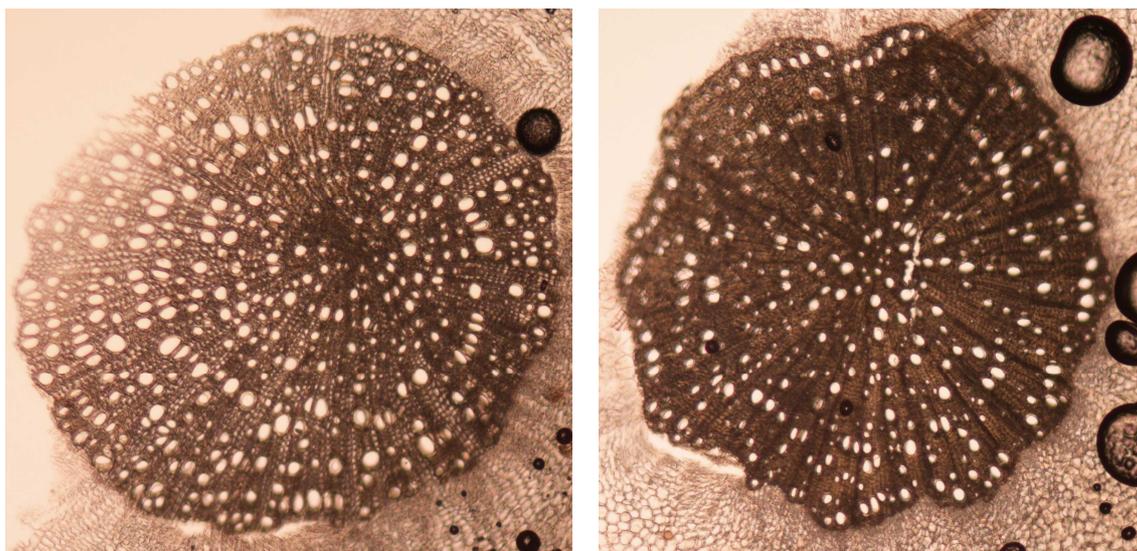


Abbildung 20. Vergleich der Tracheenform bei *Polygala senega* (links) und *Polygala tenuifolia* (rechts); 80-fache Vergrößerung

ERGEBNISSE

Auch beim Vergleich der Tüpfel zeigen sich charakteristische Unterschiede in deren Ausdehnung. Während die Tracheen von *Polygala senega* in ähnlicher Form wie Spangengefäße erscheinen, weist *Polygala tenuifolia* eher beidseitig behöfte Tüpfel (Hoftüpfel) auf (Abbildung 21).

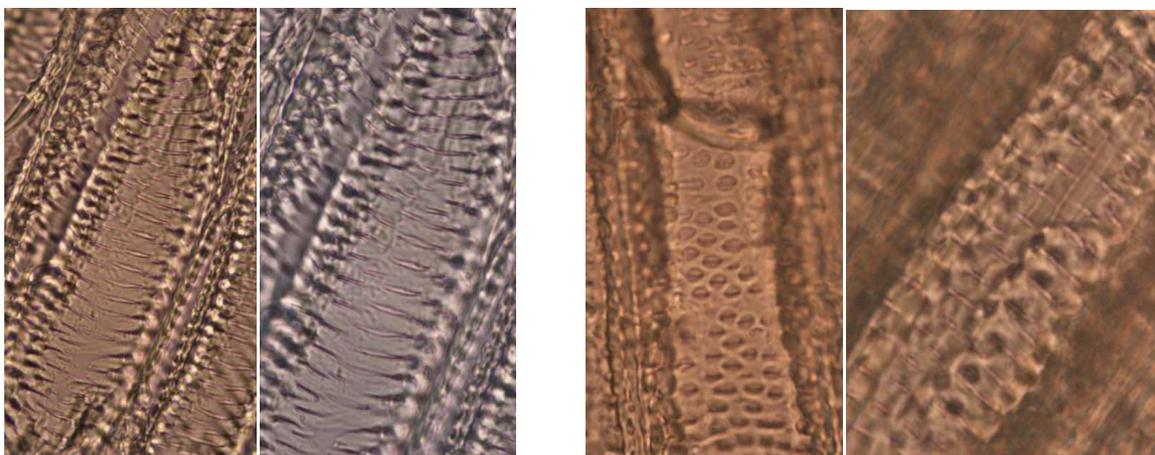


Abbildung 21. Vergleich der Tüpfel bei *Polygala senega* (links) und *Polygala tenuifolia* (rechts); 600-fache Vergrößerung

Die Untersuchung der Wurzelquerschnitte ergab, dass sich die durchschnittlichen Anteile der Gewebe-Arten am Wurzeldurchmesser bei *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* unterscheiden. Die statistische Analyse mittels t-Test von 28 Querschnitten der beiden *Polygala* Arten zeigten signifikante Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Gewebeanteile. Während der relative Holzanteil bei *Polygala senega* signifikant größer ist, zeigt sich bei *Polygala tenuifolia* ein höherer Korkanteil in Bezug auf den gesamten Wurzeldurchmesser. Der Parenchymanteil weist nur einen tendenziell höheren Wert bei *Polygala tenuifolia* auf (Tabelle 10).

Tabelle 10. Vergleich der Gewebe-Anteile am Wurzeldurchmesser

	<i>Polygala senega</i>	Signifikanz der Unterschiede	<i>Polygala tenuifolia</i>
Holz-Anteil (MW)	41,2 %	p = 0,010	35,0 %
Parenchym-Anteil (MW)	26,6 %	p = 0,068	28,5 %
Kork-Anteil (MW)	5,7 %	p = 0,002	7,9 %

ERGEBNISSE

Die unterschiedliche Verteilung der Gewebe-Typen im Wurzeldurchschnitt der beiden Polygala-Arten ist auch in Abbildung 22 deutlich ersichtlich.

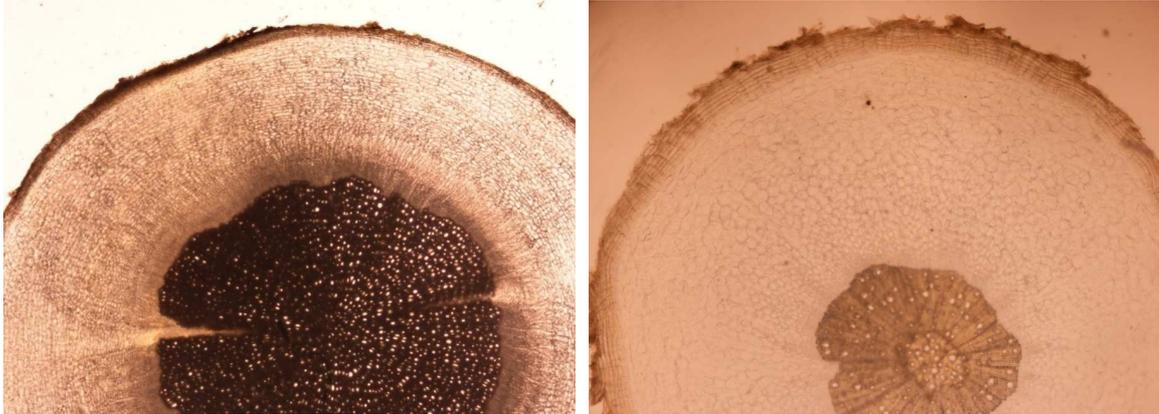


Abbildung 22. Wurzelquerschnitt von *Polygala senega* (links) und *Polygala tenuifolia* (rechts); 40-fache Vergrößerung

Zur Abgrenzung der Verfälschung *Glinus oppositifolius* (L.) wurde dessen Wurzelquerschnitt mikroskopisch untersucht. *Glinus oppositifolius* gehört einer anderen Familie (Molluginaceae) sowie einer anderen Ordnung (Caryophyllales) an und weist somit keinerlei taxonomische Nähe zu den Polygalaceae auf (Quelle: siehe Fußnote ⁷). Wie zu erwarten, zeigen sich demzufolge auch auf mikroskopischer Ebene offensichtliche Unterschiede zu den Wurzeln der beiden Polygala-Arten.

Als auffälligstes Merkmal erkennt man das anormale kambiale Dickenwachstum der Wurzel, welches sich in aufeinanderfolgenden Ringen neu gebildeten Kambiums äußert. Die konzentrischen Wachstumszonen verursachen mehrere Schichten von abwechselnd Holz- und Bastanteilen (Rao und Rajput, 2003).

Da diese charakteristische Besonderheit eine eindeutige Identifikation und Abgrenzung zu den Wurzeln der Polygala-Arten aufweist, wurde von weiteren mikroskopischen Untersuchungen abgesehen (siehe Abbildung 23, Seite 38).

⁷ <http://eol.org/pages/2906921/overview> (10.2.2014)

ERGEBNISSE

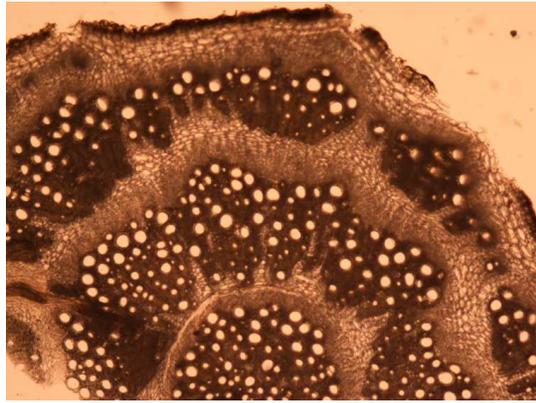


Abbildung 23. Wurzelquerschnitt von *Glinus oppositifolius* (L.), 40-fache Vergrößerung

Die eindeutige Identifizierung und Unterscheidbarkeit der untersuchten Polygala-Wurzeldrogen durch Anwendung mikroskopischer Techniken konnte auch durch eine Diskriminanzanalyse verifiziert werden. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe von Herrn Dr. Christoph Dobeš. Nachfolgende Abbildung zeigt die graphische Darstellung jener erhobenen Parameter, welche für eine Differenzierung der beiden Arten relevant sind. Diese beziehen sich auf die Abmessungen der Korkzellen (tangential, radial, längs), welche auf den Achsen im Scatterplot gegeneinander aufgetragen sind. Eine nicht vorhandene Überlappung der Datenpunkte (Dreieck grün: *Polygala senega*; Quadrat rot: *Polygala tenuifolia*) weist auf die vollständige Trennbarkeit des Probenmaterials anhand dieser charakteristischen Merkmale hin (Abbildung 24).

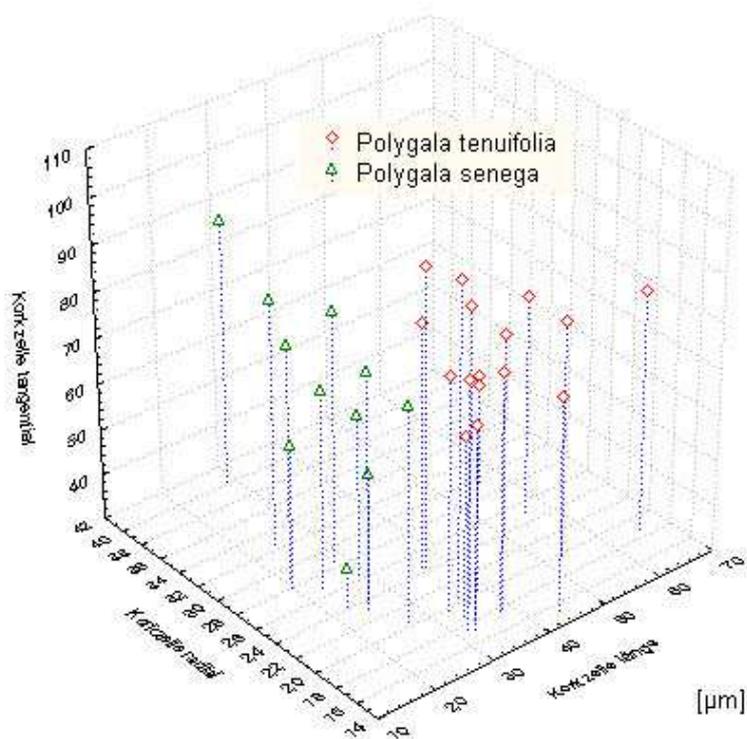


Abbildung 24. 3D-Scatterplot der Diskriminanzanalyse (Korkzelle tangential, radial, längs) *Polygala senega* [Δ] vs. *Polygala tenuifolia* [◊]

ERGEBNISSE

Eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten mikroskopischen Unterscheidungsmerkmale zwischen *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* ist in Tabelle 11 ersichtlich.

Tabelle 11. Mikroskopische Unterschiede der beiden Polygala-Arten

	<i>Polygala senega</i>	<i>Polygala tenuifolia</i>
Kork		
Anzahl der Korkschichten	weniger	mehr
Form der Korkzellen Querschnitt	breiter, kürzer	schmäler, langgestreckter
Form der Korkzellen Längsschnitt	rundlich	rechteckig
Anordnung der Korkzellen	unregelmäßig	regelmäßig
Tracheen		
Ovalitätsindex	höher (ovalere Form)	niedriger (rundlichere Form)
Tüpfel	Spangengefäße	Hoftüpfel
Anteile der Gewebearten am Wurzeldurchmesser		
Holz-Anteil	größer (41,2 %)	kleiner (35,0 %)
Parenchym-Anteil	kleiner (26,6 %)	größer (28,5 %)
Kork-Anteil	kleiner (5,7 %)	größer (7,9 %)

4.1.1.3 Dünnschichtchromatographie (TLC und HPTLC)

Zur dünnschichtchromatographischen Unterscheidung der Wurzel drogen musste zunächst eine Untersuchungslösung aus dem Probenmaterial hergestellt werden. Hierfür wird die verwendete Extraktionsmethode nachfolgend kurz beschrieben:

1,00 g gemahlene Wurzel (EuAB 355 µm) werden mit 10,00 ml Ethanol 70% für 15 Minuten bei 80°C auf dem Wasserbad extrahiert und anschließend filtriert.

Im EuAB ist zur dünnschichtchromatographischen Identifizierung von *Polygalae radix* eine DC auf Triterpensaponine monographiert. Diese Methode wurde bereits als Vorarbeit für diese Diplomarbeit von Sabine Mascotti überarbeitet (Mascotti, 2014). Basierend auf den enthaltenen Flavonoiden wurde in Zusammenarbeit mit der Expertengruppe 13B zusätzlich ein weiteres Auftrennungssystem herangezogen. Da sowohl Triterpensaponine als auch Flavonoide jeweils ein charakteristisches Bandenmuster aufweisen, das für die Identifizierung der Proben verwendet werden kann, wurden vorerst beide Inhaltsstoffgruppen mit den entsprechenden

ERGEBNISSE

Fließmittelsystemen (siehe Kapitel 3.2.1 Dünnschichtchromatographie in Material und Methoden, Tabelle 6, Seite 22) analysiert.

Zunächst erfolgte die Auswahl der Referenzsubstanzen. Die in der Monographie von *Polygalae radix* (EuAB) verwendeten Referenzsubstanzen Monoammoniumglycyrrhizat und Saccharose wurden für die Identifizierung der Drogen über das Triterpensaponin-Inhaltsstoffmuster beibehalten. Zum Nachweis von Flavonoiden mittels DC werden typischerweise Hyperosid und Rutin eingesetzt. Zusätzlich zu diesen wurde als weitere Referenzsubstanz Isoquercitrin getestet, was in der folgenden Fotografie des Chromatogrammes ersichtlich ist (Abbildung 25).

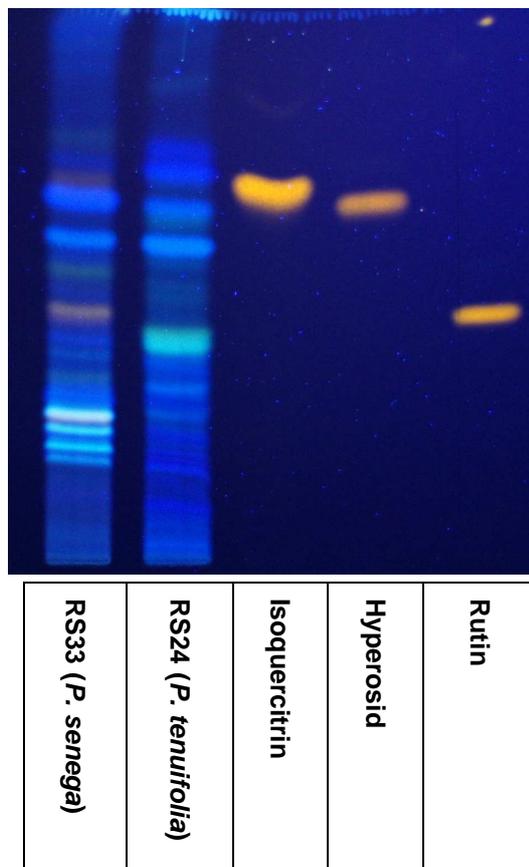


Abbildung 25. DC-Vergleich der Referenzsubstanzen Isoquercitrin, Hyperosid und Rutin nach Entwicklung mit FM2 (Tabelle 6, Seite 22) und Besprühen mit NST- und PEG-Reagenz unter UV 366 nm

Da die Bande von Isoquercitrin bei ähnlichem Rf-Wert wie Hyperosid auftritt, wurden in weiterer Folge die herkömmlichen Referenzsubstanzen Rutin und Hyperosid eingesetzt.

ERGEBNISSE

Für die drei untersuchten Arten *Polygala senega*, *Polygala tenuifolia* und *Glinus oppositifolius* traten bei den DC-Untersuchungen jeweils charakteristische Bandenmuster auf, die nachfolgend exemplarisch für jedes Fließmittelsystem mittels HPTLC dargestellt werden. Dieses erhaltene Bandenmuster ist auch in der TLC reproduzierbar. Für die Dokumentation wurden die entwickelten Platten fotografiert (Abbildungen 26-32, Seiten 41-47).

Zunächst wird das durch HPTLC erhaltene Triterpensaponin-Inhaltsstoffmuster von *Polygala senega* (Abbildung 26), *Polygala tenuifolia* (Abbildung 27, Seite 42) und *Glinus oppositifolius* (Abbildung 28, Seite 43) einzeln dargestellt, wobei die charakteristischen Banden zur Identifizierung der untersuchten Arten farbig markiert sind. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte überwiegend bei Tageslicht, da unter dieser Bedingung die Unterschiede am deutlichsten zu erkennen sind.

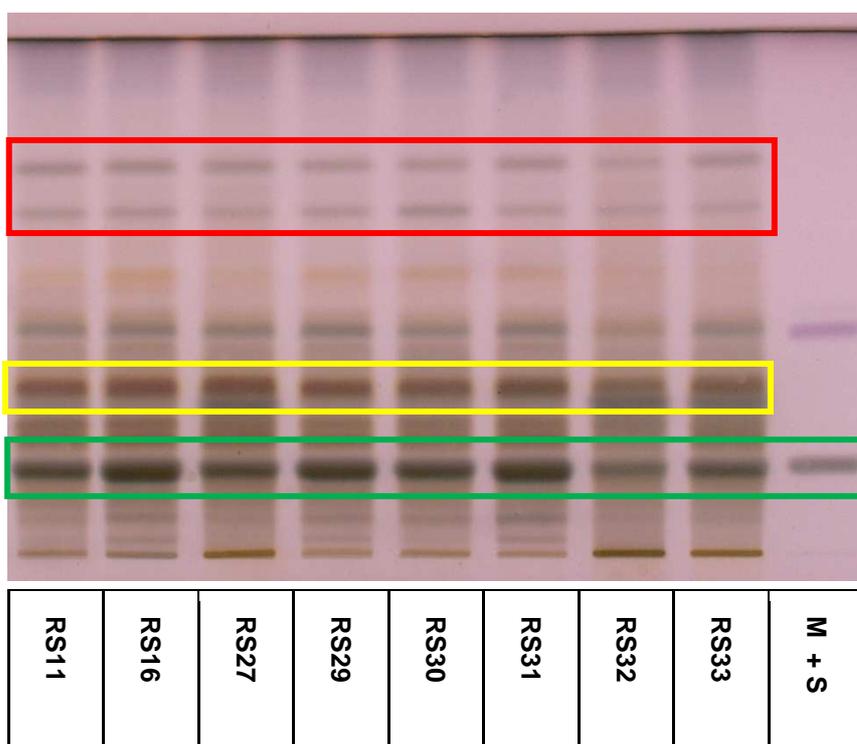


Abbildung 26. HPTLC-Chromatogramm von *Polygala senega* (FM 1, Tabelle 6, Seite 22) nach dem Besprühen mit AAS bei Tageslicht, Referenzsubstanzen: Monoammoniumglycyrrhizat (M) und Saccharose (S)

ERGEBNISSE

Bei *Polygala senega* ist eine rot-braune Bande zwischen den beiden Referenzsubstanzen zu erkennen (gelbe Markierung), welche bei *Polygala tenuifolia* nicht vorhanden ist. Weiters zeigt sich eine charakteristische Doppelbande (rote Markierung), bei welcher die Einzelbanden weiter voneinander entfernt sind als bei *Polygala tenuifolia* (Abbildung 27). In beiden *Polygala*-Arten sowie in der Verfälschung *Glinus oppositifolius* ist Saccharose auf Höhe der entsprechenden Referenzsubstanz (S) enthalten (grüne Markierung).

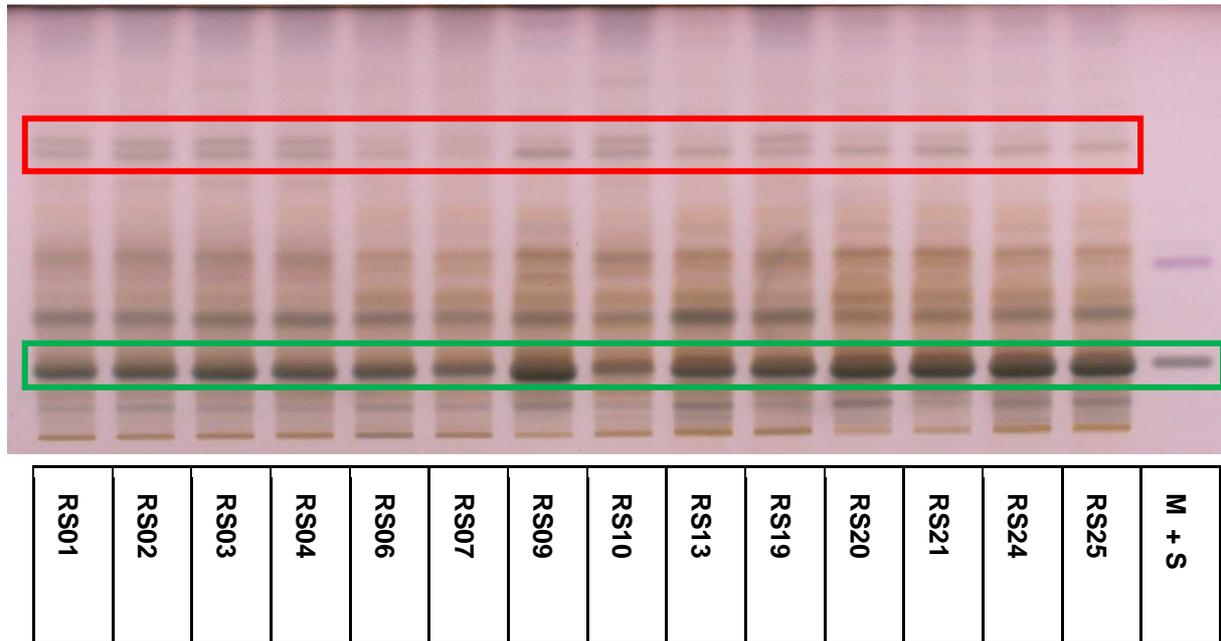


Abbildung 27. HPTLC-Chromatogramm von *Polygala tenuifolia* (FM1, Tabelle 6, Seite 22) nach dem Besprühen mit AAS bei Tageslicht, Referenzsubstanzen: Monoammoniumglycyrrhizat (M) und Saccharose (S)

Das nachfolgend dargestellte Bandenmuster von der Verfälschung *Glinus oppositifolius* (Abbildung 28, Seite 43) weist eindeutige Unterschiede im Vergleich zum Chromatogramm der untersuchten *Polygala*-Arten auf. Bis auf die enthaltene grüne Bande der Saccharose (grüne Markierung) unterscheidet sich das Bandenmuster der Verfälschung sowohl vor als auch nach dem Besprühen mit AAS und die Banden weisen im Gegensatz zu *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* bei Tageslicht eine violette Farbe auf.

ERGEBNISSE

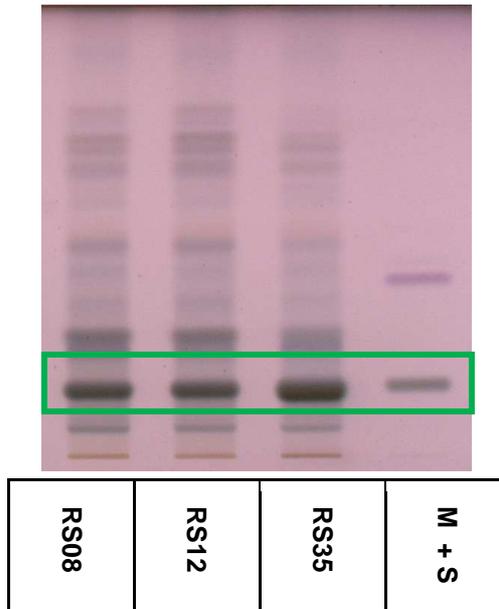


Abbildung 28. HPTLC-Chromatogramm von *Glinus oppositifolius* (FM1, Tabelle 6, Seite 22) nach dem Besprühen mit AAS bei Tageslicht, Referenzsubstanzen: Monoammoniumglycyrrhizat (M) und Saccharose (S)

Die für die Identifikation relevanten chemischen Unterscheidungsmerkmale werden zum Vergleich der Untersuchungsproben in Abbildung 29 zusammengefasst.

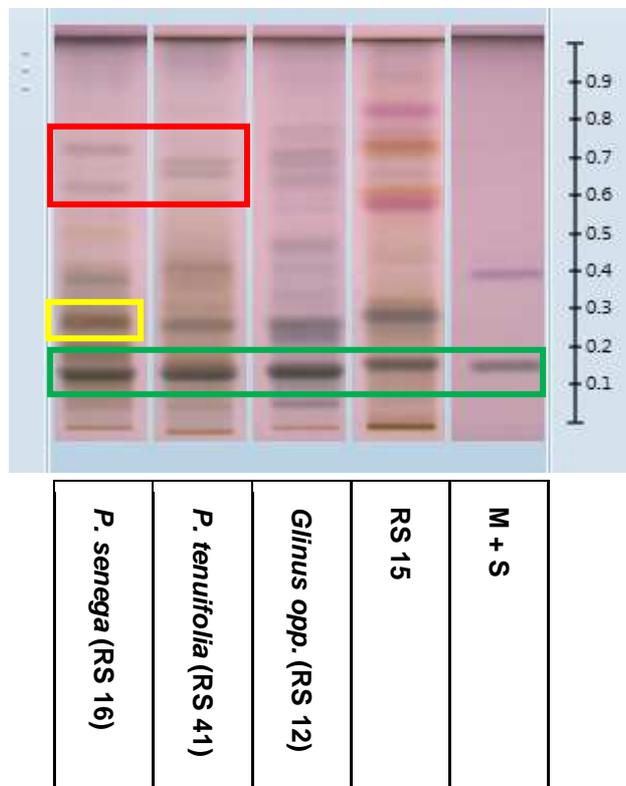


Abbildung 29. Vergleich der HPTLC-Bandenmuster bei Auftrennung der Triterpensaponine (FM1, Tabelle 6, Seite 22), nach dem Besprühen mit AAS bei Tageslicht, Referenzsubstanzen: Monoammoniumglycyrrhizat (M) und Saccharose (S)

ERGEBNISSE

Die in diesem Vergleich separat angeführte Probe RS15 entspricht mit ihrem Bandenmuster keiner der drei untersuchten Arten. Eine Identifizierung wurde in der vorliegenden Diplomarbeit nicht durchgeführt, da dies ohne entsprechendes Vergleichsmaterial nicht möglich ist.

Eine weitere Möglichkeit zur Prüfung der Identität mittels DC stellt ein Fließmittelsystem zum Nachweis des Flavonoid-Inhaltsstoffmusters dar. In der folgenden Abbildung werden die Chromatogramme der Proben von *Polygala senega* (RS11, 16, 29, 32, 33, 38, 39, 40, 45, 46), der nicht zuordbaren Probe RS15 sowie der Proben von *Glinus oppositifolius* (RS08, 12, 35) gezeigt.

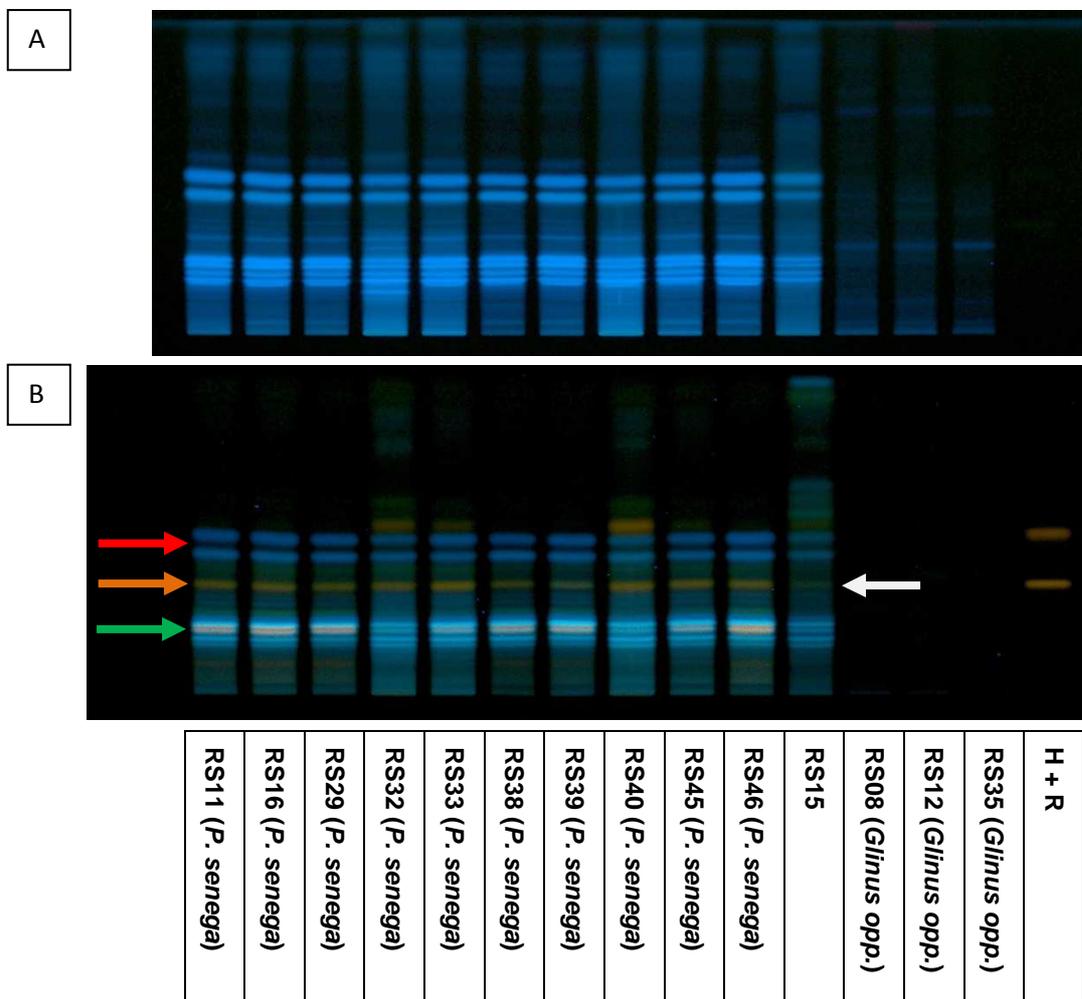


Abbildung 30. HPTLC-Chromatogramm von *Polygala senega*, Probe RS15 und *Glinus oppositifolius* (FM2, Tabelle 6, Seite 22) vor dem Besprühen (A) und 30 min nach dem Besprühen (B) mit NST-PEG-Reagenz jeweils bei UV 366 nm, Referenzsubstanzen: Hyperosid (H) und Rutin (R).

ERGEBNISSE

Schon vor dem Besprühen kann man einen deutlichen Unterschied zwischen *Polygala senega* und *Glinus oppositifolius* beobachten. Die Verfälschung weist nur ein sehr schwach sichtbares Bandenmuster auf, welches nach dem Besprühen mit NST-PEG-Reagenz gar nicht mehr zu erkennen ist (rechte drei Proben-Spalten).

Die Probe RS15 hingegen ist vor dem Besprühen kaum von *Polygala senega* zu unterscheiden, auch nach dem Besprühen mit NST-PEG-Reagenz ist noch eine Ähnlichkeit im Bandenmuster vorhanden, bei dem allerdings die orange-gefärbte Bande nur schwach ausgeprägt ist (weißer Pfeil Abbildung 30 B, Seite 44).

Das Chromatogramm von *Polygala senega* in Abbildung 30 B (Seite 44) weist eine blaue Doppelbande (roter Pfeil) knapp unterhalb der Referenzsubstanz Hyperosid auf, sowie eine orange-fluoreszierende Bande (oranger Pfeil) auf Höhe von Rutin und zwei markante hellblau fluoreszierende Zonen (grüner Pfeil), die durch eine schwache orange-gefärbte Bande getrennt sein können.

Nachfolgende Abbildung 31 (Seite 46) zeigt das Flavonoid-Bandenmuster von *Polygala tenuifolia* vor sowie 30 min nach dem Besprühen mit NST-PEG-Reagenz jeweils bei UV 366 nm.

ERGEBNISSE

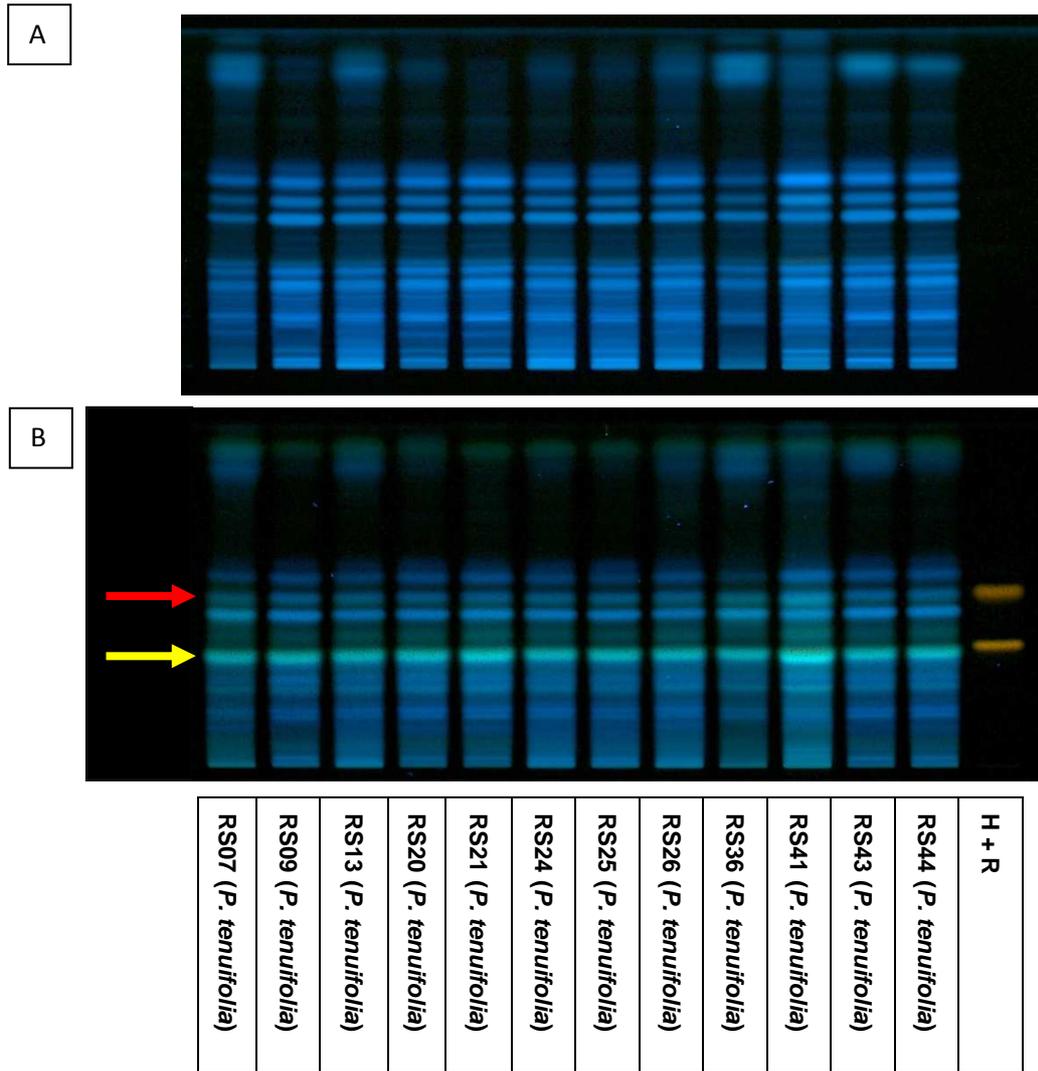


Abbildung 31. HPTLC-Chromatogramm von *Polygala tenuifolia* (FM2, Tabelle 6, Seite 22) vor dem Besprühen (A) und 30 min nach dem Besprühen (B) mit NST-PEG-Reagenz jeweils bei UV 366 nm, Referenzsubstanzen: Hyperosid (H) und Rutin (R).

Vor dem Besprühen zeigen sich im Chromatogramm von *Polygala tenuifolia* nur geringfügige Unterschiede zum Bandenmuster von *Polygala senega* (Abbildung 30 A, Seite 44 und 31 A). In Abbildung 31 B sind die differierenden Charakteristika von *Polygala tenuifolia* im Vergleich zu *Polygala senega* nach dem Besprühen durch Pfeile markiert. Während sich bei *Polygala senega* eine blaue Doppelbande in Höhe von Hyperosid zeigt, ist bei *Polygala tenuifolia* eine Dreifachbande an dieser Position erkennbar (roter Pfeil). Der gelbe Pfeil weist auf eine grüne Bande, welche nur im Bandenmuster von *Polygala tenuifolia* vorkommt.

ERGEBNISSE

Abbildung 32 stellt einen Vergleich der Bandenmuster von *Polygala senega*, *Polygala tenuifolia* und *Glinus oppositifolius* dar.

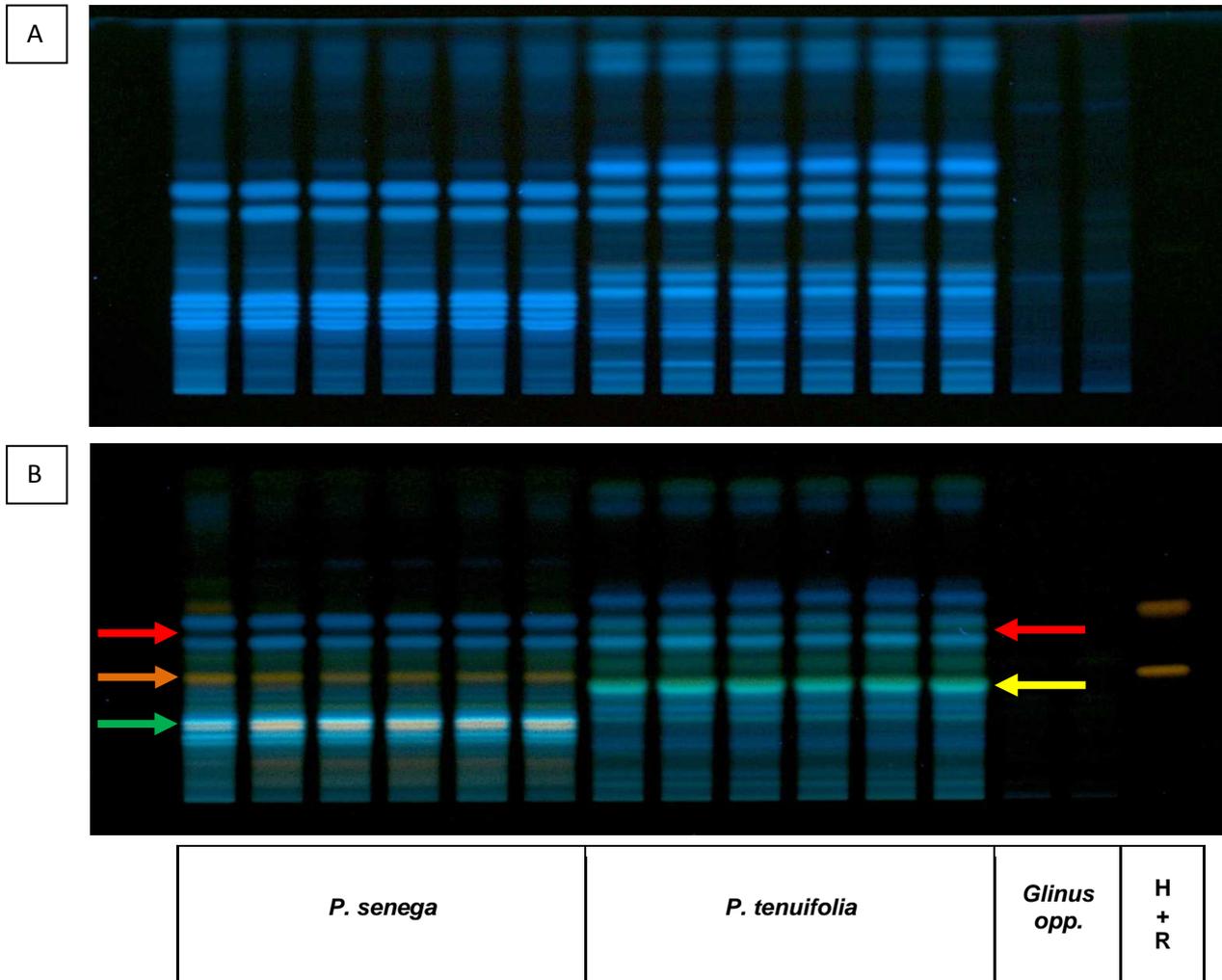


Abbildung 32. Vergleich der Bandenmuster von *Polygala senega*, *Polygala tenuifolia* und *Glinus oppositifolius* (FM2, Tabelle 6, Seite 22) vor dem Besprühen (A) und 30 min nach dem Tauchen in NST- und Besprühen mit PEG-Reagenz (B), detektiert jeweils bei UV 366 nm, Referenzsubstanzen: Hyperosid (H) und Rutin (R).

Eine Unterscheidung der Arten ist anhand der Bandenmuster problemlos möglich, da bei *Polygala senega* zumindest eine orange fluoreszierende Bande auf Höhe von Rutin auftritt (oranger Pfeil). Bei *Polygala tenuifolia* fehlt die orange-farbene Bande zur Gänze, dafür findet sich eine grün fluoreszierende Bande (gelber Pfeil) knapp unterhalb der Referenzsubstanz Rutin sowie eine dritte blaue Bande, im Gegensatz zu den zwei blauen Banden bei *Polygala senega*, knapp oberhalb des Rf-Wertes von Hyperosid (rote Pfeile). Die beiden charakteristischen blau fluoreszierenden Banden, welche nur bei *Polygala senega* auftreten, sind mit einem grünen Pfeil in Abbildung 32 B markiert.

ERGEBNISSE

Mithilfe des resultierenden DC-Bandenmusters zum Nachweis der enthaltenen Flavonoide und phenolischen Komponenten kann man außerdem die Polygala-Arten sehr einfach von der Verfälschung *Glinus oppositifolius* unterscheiden. Das Bandenmuster von *Glinus oppositifolius* ist vor dem Besprühen mit NST-PEG-Reagenz kaum bzw. nach dem Besprühen gar nicht mehr zu erkennen.

Zusammenfassend bieten sowohl die enthaltenen Triterpensaponine als auch die Flavonoide eine eindeutige Möglichkeit zur dünnenschichtchromatographischen Identifizierung der beiden Polygala-Arten als auch der Verfälschung *Glinus oppositifolius*. Daher werden in weiterer Folge zur Identifizierung der Fluidextrakte Dünnschichtchromatogramme von beiden Inhaltsstoffmustern durchgeführt.

4.1.1.4 Spektroskopie (NIR und MIR)

Die Infrarot-Spektroskopie bietet eine weitere Möglichkeit zur Identitätsprüfung. Es wurden dafür die Drogen RS01-RS55 (Ausnahme RS14) vermessen und die resultierenden Spektren anschließend miteinander verglichen. Die nachfolgend aufgelisteten Proben wurden mit den drei unterschiedlichen Techniken MIR-, NIR- und der Handheld NIR-Spektroskopie in pulverisierter Form untersucht.

RS01, RS02, RS03, RS06, RS07, RS08, RS09, RS10, RS11, RS13, RS15, RS16, RS19, RS20, RS21, RS24, RS25, RS26, RS27, RS29, RS30, RS31, RS34, RS35, RS36, RS37, RS38, RS39, RS42, RS43, RS44, RS45, RS46, RS47, RS48, RS49, RS50, RS51, RS52, RS53, RS54

Zusätzlich wurden jene Drogen, welche in zu geringer Menge vorlagen, um einheitlich pulverisiert zu werden, als ganze Drogen (Querschnitt ca. 1 mm) mittels Attenuated Total Reflectance (ATR) Methode im mittleren Infrarotbereich (MIR) vermessen.

RS04, RS05, RS12, RS17, RS18, RS22, RS23, RS28, RS32, RS33, RS40, RS41, RS55

Für die Auswertung und den Vergleich der Spektren wurde mit den Daten über das Programm NIRCAl Version 4.21 und 5.2 (Büchi, Flawil, Switzerland) eine PCA (Principal Component Analysis) durchgeführt. Für die statistischen Berechnungen bedanke ich mich bei Frau Mag. Cormelia Pezzeri von der Universität Innsbruck, Institut für Analytische Chemie und Radiochemie (Leitung: O. Univ. Prof. Mag. Dr. Dr.h.c. Günther Bonn).

ERGEBNISSE

Nachfolgend werden die Messparameter, die Aufbereitung der Daten sowie die Trennbarkeit der untersuchten Arten mit den drei IR-Messtechniken näher erläutert.

ATR FT-MIR Spektroskopie

Bei der ATR FT-MIR Spektroskopie wurden die oben angeführten pulverisierten oder ganzen Drogen im Modus der abgeschwächten Totalreflexion (ATR) in einem Messbereich von 4000 cm^{-1} - 650 cm^{-1} vermessen. Mit 4 cm^{-1} liegt bei dieser Technik die höchste Auflösung vor. Mit jeder Probe wurden drei Messungen mit je 16 Scans pro Messung durchgeführt.

Vorbehandlungen:

Max. Normalization

2nd Derivative (21 smoothing points)

ausgewählter WZ Bereich: 3050 cm^{-1} - 2790 cm^{-1} und 1782 cm^{-1} - 675 cm^{-1}

Die größte Trennung der Arten anhand der IR-Spektren erfolgte durch die erste latente Variable (PC-1) mit 39% Varianzaufklärung, PC-2 trägt dabei nicht zur Trennung bei.

Dadurch ist eine Abtrennung von *Glinus oppositifolius* problemlos möglich und die Unterscheidung von *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* erfolgreich.

In Abbildung 33 (Seite 50) wird die Trennung der beiden Polygala-Arten voneinander sowie von *Glinus oppositifolius* graphisch dargestellt. Zusätzlich wurde eine Kontrollprobe, d.h. eine Probe ohne Angabe der Herkunft, eingesetzt, um das Ergebnis zu bestätigen.

ERGEBNISSE

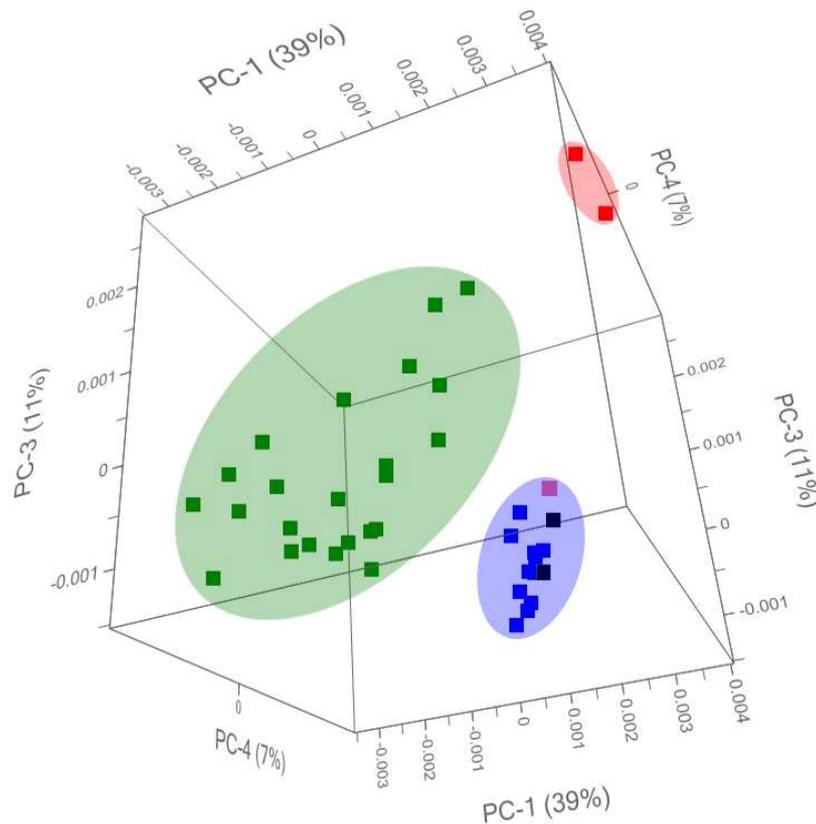


Abbildung 33. Trennung der untersuchten Arten mittels ATR FT-MIR Spektroskopie der pulverisierten Droge (n = 41). blau – *Polygala senega*, grün – *Polygala tenuifolia*, rot – *Glinus oppositifolius*, schwarz – Kontrollprobe, rosa – RS 15 (nicht eindeutig zuzuordnen)

Zur Identifizierung der ganzen Droge lagen dieselben Messparameter wie beim Pulver vor.

Vorbehandlungen:

Max. Normalization

2nd Derivative (21 smoothing points)

ausgewählter WZ Bereich: 3043 cm^{-1} - 2786 cm^{-1} und 1782 cm^{-1} - 685 cm^{-1}

Die größte Trennung resultiert ebenfalls aus der ersten latenten Variable (PC-1), wobei hier der Anteil der der Varianzaufklärung bei 50% liegt, PC-2 hingegen trägt nicht zur Trennung bei.

Auch bei der ganzen Droge ist demnach eine eindeutige Abtrennung von *Glinus oppositifolius* möglich, wie in Abbildung 34 (Seite 51) ersichtlich. Eine spektrometrische Unterscheidung der beiden *Polygala*-Arten kann durch diese Messtechnik ebenfalls erfolgen, allerdings ist die eingesetzte Probenzahl (n = 13) zu gering, um eine statistisch valide Aussage treffen zu können.

ERGEBNISSE

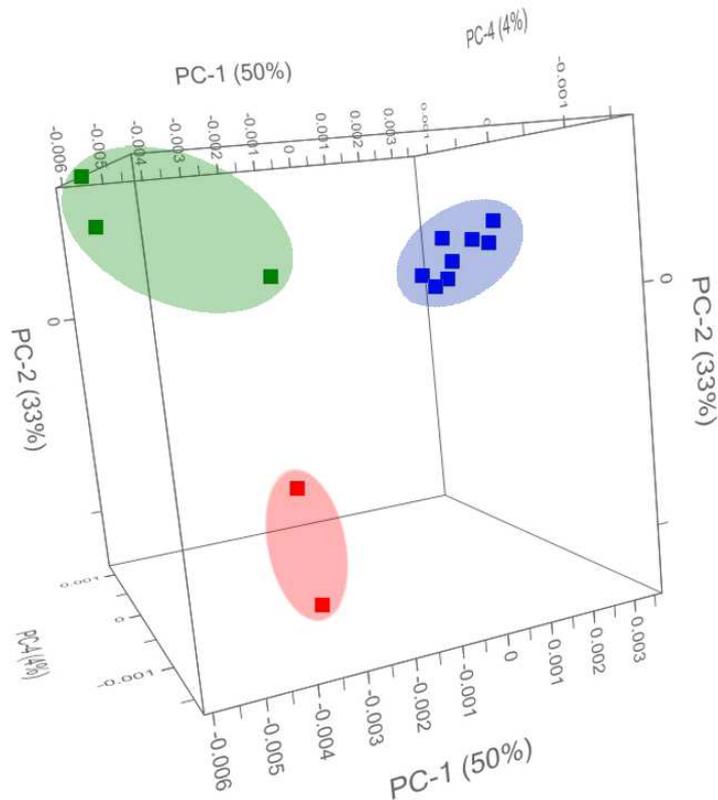


Abbildung 34. Trennung der untersuchten Arten mittels ATR FT-MIR Spektroskopie der ganzen Droge (n = 13). blau – *Polygala senega*, grün – *Polygala tenuifolia*, rot – *Glinus oppositifolius*

FT-NIR Spektroskopie

Im Gegensatz zur ATR FT-MIR Spektroskopie wird bei der FT-NIR Spektroskopie im Modus der diffusen Reflexion gemessen. Der Messbereich liegt zwischen 10000 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} und weist eine Auflösung von 8 cm^{-1} auf. Es wurden ebenfalls drei Messungen pro Probe, allerdings mit 64 Scans pro Messung vorgenommen.

Vorbehandlungen:

Multiplicative Scatter Correction

2nd Derivative (9 smoothing points)

ausgewählter WZ Bereich: 6160 cm^{-1} - 4000 cm^{-1}

Aus Abbildung 35 (Seite 51) kann entnommen werden, dass die größte Trennung erneut anhand der ersten latenten Variable (PC-1) erfolgt, die 83% der auftretenden Varianz erklärt. Auch hier trägt PC-2 nicht zur Trennung bei.

ERGEBNISSE

Bei der FT-NIR Spektroskopie ist ebenfalls eine eindeutige Abgrenzung von *Glinus oppositifolius* sowie eine Unterscheidung von *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* zweifelsfrei möglich.

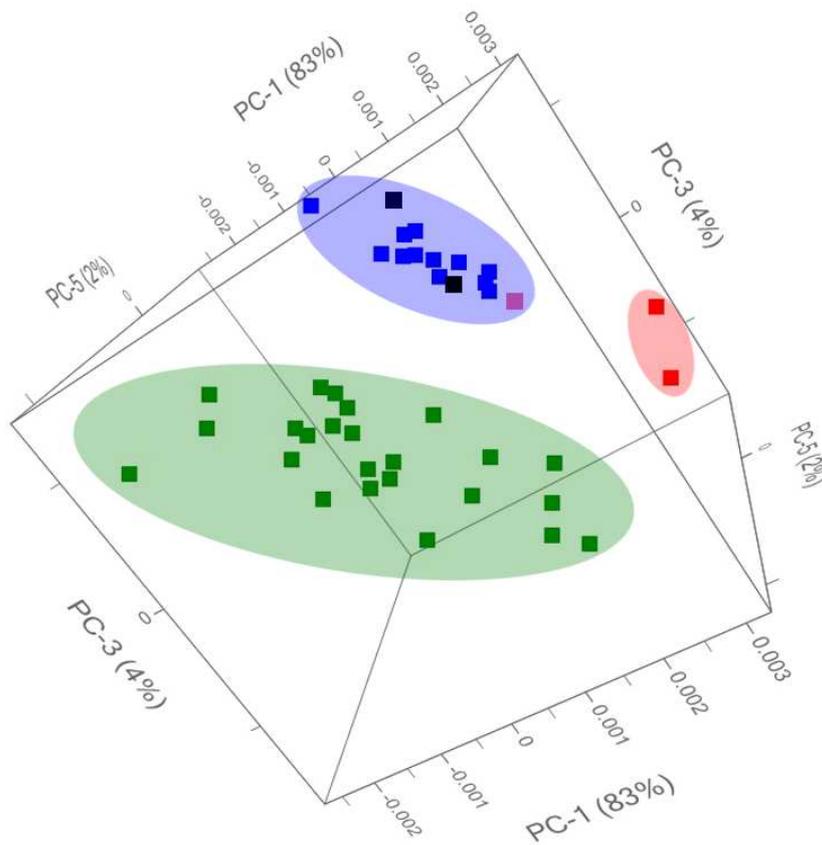


Abbildung 35. Trennung der untersuchten Arten mittels FT-NIR Spektroskopie der pulverisierten Droge (n = 41). blau – *Polygala senega*, grün – *Polygala tenuifolia*, rot – *Glinus oppositifolius*, schwarz – Kontrollprobe, rosa – RS 15 (nicht eindeutig zuzuordnen)

Handheld FT-NIR Spektroskopie

Bei der Handheld FT-NIR Spektroskopie, der ungenauesten Messtechnik, wurden die Pulverdrogen im Modus der diffusen Reflexion vermessen. Da die Spektren in einem Messbereich von 6267 cm^{-1} - 4173 cm^{-1} mit der geringsten Auflösung von 20 cm^{-1} aufgenommen wurden, musste für eine höhere Genauigkeit die Anzahl der Messungen pro Probe erhöht werden. Daher wurden fünf Messungen pro Probe mit jeweils zehn Scans pro Messung durchgeführt.

Vorbehandlungen:

2nd Derivative (5 smoothing points)

ausgewählter WZ Bereich: 4377 cm^{-1} - 4173 cm^{-1}

ERGEBNISSE

Entsprechend den beiden anderen Techniken erfolgte die größte Trennung anhand der ersten latenten Variable (PC-1; 97% Varianzaufklärung). Der gewählte Wellenzahl-Bereich entspricht dem aussagekräftigsten Bereich der BenchTop Kalibrierung.

Selbst bei dieser am wenigsten genauen Messtechnik mittels des mobilen Handgerätes ist eine spektrometrische Unterscheidung der untersuchten Arten möglich, allerdings fällt diese Trennung nicht ganz so eindeutig aus wie bei den beiden vorangegangenen IR-Techniken.

Dadurch ist eine Unterscheidung von *Glinus oppositifolius* eindeutig möglich, die Trennung von *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* allerdings schwierig, da die beiden Messdaten-Gruppen in der Darstellung eine leichte Überlappung aufweisen (siehe Abbildung 36).

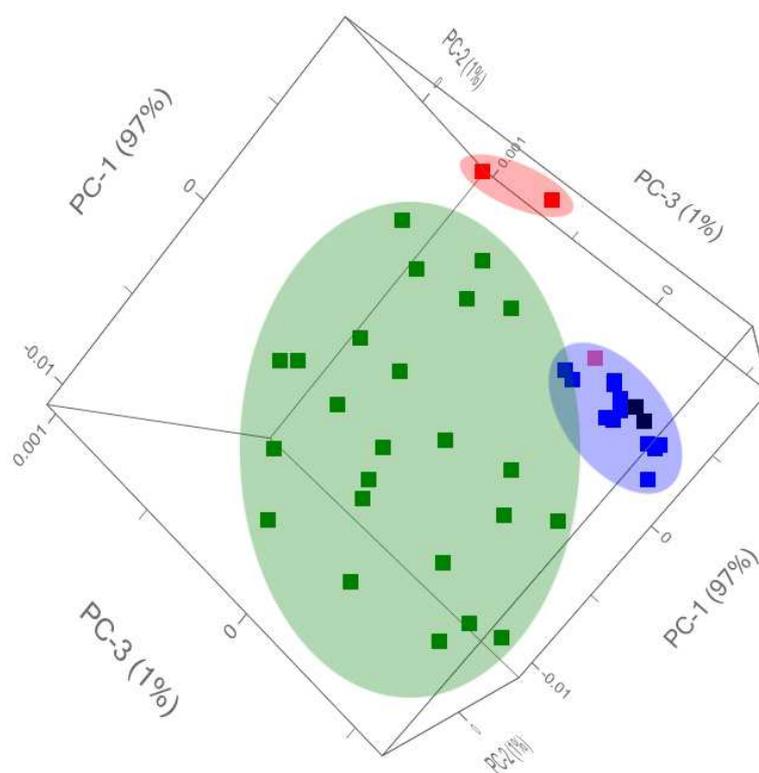


Abbildung 36. Trennung der untersuchten Arten mittels Handheld FT-NIR Spektroskopie der pulverisierten Droge (n = 41). blau – *Polygala senega*, grün – *Polygala tenuifolia*, rot – *Glinus oppositifolius*, schwarz – Kontrollprobe, rosa – RS 15 (nicht eindeutig zuzuordnen)

Mithilfe aller eingesetzten IR-spektroskopischen Techniken sind die beiden *Polygala*-Arten voneinander unterscheidbar sowie eine Abgrenzung zur Verfälschung *Glinus oppositifolius* möglich. Eine Unterscheidung der Probe RS15 von den drei untersuchten Arten, welche durch die DC problemlos möglich ist, kann mittels IR-

ERGEBNISSE

Spektroskopie allerdings nicht erreicht werden. Dennoch ergibt sich aus dieser Methode eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung der Polygala-Arten.

Das Hauptziel der Untersuchungen mittels Infrarotspektroskopie war die Unterscheidung der Wurzeln von *Polygala senega*, *Polygala tenuifolia* und *Glinus oppositifolius* aufgrund der erhaltenen Spektren. Als Nebenergebnis dieser Methode wird nachfolgend die Zuweisung von gewissen strukturellen Einheiten zu den Banden der Spektren dargestellt.

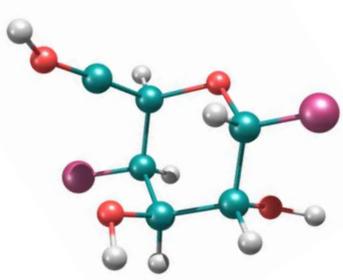
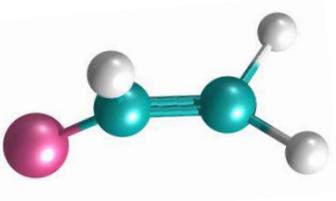
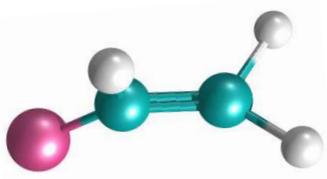
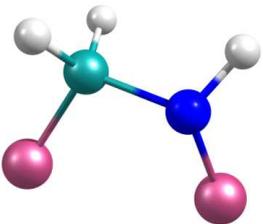
<p>4240 cm⁻¹:</p>  <p><i>R</i>-HOCH-<i>R</i>: $3 \cdot \delta_{CH}(A_1)$</p>	<p>4260 cm⁻¹:</p>  <p><i>R</i>-CH=CH₂: $\nu_{CH_2}(s, A_1) + \delta_{CH_2}(A_1)$</p>
<p>4304 cm⁻¹:</p>  <p><i>R</i>-CH=CH₂: $\nu_{CH_2}(s, as A_1, E) + \delta_{CH_2}(A_1)$</p>	<p>4336 cm⁻¹:</p>  <p><i>R</i>-CH₂-NH-<i>R</i>: $\nu_{NH}(A_1) + \delta_{CH_2}(A_1)$</p>

Abbildung 37. Zuweisung von strukturellen Einheiten zu den Banden der IR-Spektren

Bei den angegebenen Wellenzahlen konnten die vier Strukturen, wie in Abbildung 37 dargestellt, identifiziert werden.

ERGEBNISSE

4.1.2 Wertbestimmung mittels Schaumindex

Zunächst wurde die eingesetzte Methode zur Wertbestimmung der Saponine, die Ermittlung des Schaumindex (Kapitel 3.2.3 in Material und Methoden), als Vorversuch mit pulverisierter Radix Primulae (355 µm) durchgeführt. Die resultierenden Ergebnisse kann man aus Tabelle 12 entnehmen.

Tabelle 12. Fünf Messwerte der Schaumhöhe von Radix Primulae, der daraus erhaltene Mittelwert (MW), die Standardabweichung (STABW), die relative Standardabweichung (rel. STABW) und der berechnete Schaumindex (SI)

Einwaage (mg)	Schaumhöhe (ml)	Schaumhöhe (cm)
0,50	43	6,9
0,50	44	7,1
0,50	43	6,9
0,50	43	6,9
0,50	43	6,9
MW	43,2	6,94
STABW	0,45	0,09
rel. STABW	1,04	1,29
SI	195,52	192,24

Die ermittelten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Methode des Schaumindex aufgrund der reproduzierbaren Werte für die einzelnen Proben eine gute Möglichkeit zur Wertbestimmung der enthaltenen Triterpensaponine darstellt. Aufgrund der einheitlichen Schaumhöhe wurde diese Methode im Anschluss an jenem pulverisierten Drogenmaterial von *Polygala senega*, *Polygala tenuifolia* und *Glinus oppositifolius* angewandt, welches noch in ausreichender Menge für die Durchführung vorhanden war. Daher konnten nicht alle vorliegenden Proben vermessen werden.

Die resultierenden Mittelwerte des Schaumindex der Wurzeldrogen von *Polygala senega* können Tabelle 13 (Seite 56) entnommen werden, die Werte von *Polygala tenuifolia* sind in Tabelle 14 (Seite 56) aufgelistet und jene für die Verfälschung *Glinus oppositifolius* in Tabelle 15 (Seite 57). Zur Ermittlung des angegebenen Mittelwertes wurden je mindestens drei voneinander unabhängige Messungen vorgenommen, die Berechnung erfolgte anhand der ermittelten Schaumhöhe, gemessen in Milliliter.

ERGEBNISSE

Tabelle 13. Bestimmung der Werte von drei Messwiederholungen und der Mittelwerte (MW) des Schaumindex der Proben von *Polygala senega*

Probe	Wert 1	Wert 2	Wert 3	MW Schaumindex (SI)
RS11	149,36	149,36	149,36	149,36
RS16	185,56	181,04	181,04	182,55
RS27	144,83	135,78	144,83	141,81
RS29	153,88	149,36	149,36	150,87
RS30	162,93	167,46	167,46	165,95
RS31	171,98	171,98	167,46	170,47
RS34	67,89	67,89	67,89	67,89
RS37	104,10	104,10	104,10	104,10
RS38	108,62	113,15	113,15	111,64
RS39	108,62	104,10	108,62	107,11
RS42	149,36	153,88	153,88	152,37
RS46	67,89	63,36	67,89	66,38
RS47	113,15	108,62	108,62	110,13
MW gesamt:				129,28

Tabelle 14. Bestimmung der Werte von drei Messwiederholungen und der Mittelwerte (MW) des Schaumindex der Proben von *Polygala tenuifolia*

Probe	Wert 1	Wert 2	Wert 3	MW Schaumindex (SI)
RS03	153,88	153,88	153,88	153,88
RS09	176,51	181,04	171,98	176,51
RS10	144,83	149,36	144,83	146,34
RS13	40,73	45,26	45,26	43,75
RS19	122,20	126,73	117,67	122,20
RS20	40,73	40,73	40,73	40,73
RS24	27,16	27,16	27,16	27,16
RS25	27,16	27,16	27,16	27,16
RS26	36,21	36,21	36,21	30,21
RS36	153,88	149,36	153,88	152,37
RS43	90,52	90,52	90,52	90,52
RS44	95,04	99,57	99,57	98,06
RS48	72,41	76,94	72,41	73,92
RS49	104,10	104,10	104,10	104,10
RS50	81,47	81,47	81,47	81,47
RS51	90,52	85,99	90,52	89,01
RS52	95,04	95,04	99,57	96,55
RS54	126,73	131,25	126,73	128,24
MW gesamt:				93,45

ERGEBNISSE

Tabelle 15. Bestimmung der Werte von drei Messwiederholungen und der Mittelwerte (MW) des Schaumindex der Proben von *Glinus oppositifolius*

Probe	Wert 1	Wert 2	Wert 3	MW Schaumindex (SI)
RS08	131,25	135,78	131,25	132,76
RS35	153,88	158,41	158,41	156,90
MW gesamt:				144,83

Obwohl die erhaltenen Werte zwischen den Proben der gleichen Art äußerst stark variieren, liegen die Werte der mehrfach wiederholten Durchführung jeder einzelnen Probe bei einer relativen Standardabweichung von 0-3,69% und somit in einem engen Intervall. Diese abweichenden Schaumindices innerhalb der Art könnten sich durch die unterschiedlichen Anbaugelände und Zeitpunkte der Ernte als auch durch die unbekanntes Lagerzeiten und -bedingungen der untersuchten Drogen vor der Übernahme ergeben.

Zur statistischen Überprüfung der Unterschiede im Schaumindex zwischen den drei untersuchten Wurzelproben wurde eine einstufige ANOVA berechnet. Die Berechnungen erfolgten mit der Statistiksoftware SPSS Version 21. Der im Rahmen der Varianzanalyse post hoc berechnete Scheffé Test zum paarweisen Mittelwertvergleich ergab einen tendenziell signifikanten Unterschied im Schaumindex der beiden *Polygala*-Arten. Demnach ist der Schaumindex von *Polygala senega* tendenziell größer als jener von *Polygala tenuifolia* ($p = 0,087$). Der Mittelwert im Schaumindex von *Glinus oppositifolius* hingegen unterscheidet sich nicht überzufällig von *Polygala senega* ($p = 0,892$) oder *Polygala tenuifolia* ($p = 0,287$). Dabei muss die geringe Probenanzahl der Verfälschung berücksichtigt werden.

Die Werte im Vergleich zwischen *Polygala senega*, *Polygala tenuifolia* und *Glinus oppositifolius* können nicht zu einer Differenzierung zwischen den Arten herangezogen werden, da deren Messwertintervalle überlappen. Durch die Wertbestimmung mittels Schaumindex kann jedoch eine Gleichwertigkeit der untersuchten Proben hinsichtlich der enthaltenen Saponine belegt werden.

Den Untersuchungsergebnissen zufolge lassen sich die einzelnen Proben den *Polygala* Arten wie in nachfolgender Tabelle 16 (Seite 58) dargestellt zuordnen:

ERGEBNISSE

Tabelle 16. Identifizierung der untersuchten Proben (Wurzeldroge)

Kürzel	Identifikation	Kürzel	Identifikation
RS01	<i>P. tenuifolia</i>	RS31	<i>P. senega</i>
RS02	<i>P. tenuifolia</i>	RS32	<i>P. senega</i>
RS03	<i>P. tenuifolia</i>	RS33	<i>P. senega</i>
RS04	<i>P. tenuifolia</i>	RS34	<i>P. senega</i>
RS05	<i>P. tenuifolia</i>	RS35	<i>Glinus opp.</i>
RS06	<i>P. tenuifolia</i>	RS36	<i>P. tenuifolia</i>
RS07	<i>P. tenuifolia</i>	RS37	<i>P. senega</i>
RS08	<i>Glinus opp.</i>	RS38	<i>P. senega</i>
RS09	<i>P. tenuifolia</i>	RS39	<i>P. senega</i>
RS10	<i>P. tenuifolia</i>	RS40	<i>P. senega</i>
RS11	<i>P. senega</i>	RS41	<i>P. tenuifolia</i>
RS12	<i>Glinus opp.</i>	RS42	<i>P. senega</i>
RS13	<i>P. tenuifolia</i>	RS43	<i>P. tenuifolia</i>
RS15	<i>P. senega</i>	RS44	<i>P. tenuifolia</i>
RS16	<i>P. senega</i>	RS45	<i>P. senega</i>
RS17	<i>P. senega</i>	RS46	<i>P. senega</i>
RS18	<i>P. senega</i>	RS47	<i>P. tenuifolia</i>
RS19	<i>P. tenuifolia</i>	RS48	<i>P. tenuifolia</i>
RS20	<i>P. tenuifolia</i>	RS49	<i>P. tenuifolia</i>
RS21,	<i>P. tenuifolia</i>	RS50	<i>P. tenuifolia</i>
RS22	<i>Glinus opp.</i>	RS51	<i>P. tenuifolia</i>
RS23	<i>P. senega</i>	RS52	<i>P. tenuifolia</i>
RS24	<i>P. tenuifolia</i>	RS53	<i>P. tenuifolia</i>
RS25	<i>P. tenuifolia</i>	RS54	<i>P. tenuifolia</i>
RS26	<i>P. tenuifolia</i>	RS55	<i>P. senega</i>
RS27	<i>P. senega</i>	RS56	<i>P. tenuifolia</i>
RS28	<i>P. senega</i>	RS57	<i>P. tenuifolia</i>
RS29	<i>P. senega</i>	RS58	<i>P. tenuifolia</i>
RS30	<i>P. senega</i>		

4.2 Fluidextrakt

4.2.1 Prüfung auf Identität

Das untersuchte Probenmaterial (n = 8) stammt von drei verschiedenen Firmen. Um die Identität der zur Herstellung eingesetzten Wurzeldrogen festzustellen und somit zu einer der beiden Polygala-Arten bzw. zu einer Verfälschung zuordnen zu können, wurden die Fluidextrakte mittels DC untersucht.

4.2.1.1 Dünnschichtchromatographie (TLC und HPTLC)

Als Untersuchungslösung für die DC wurde 1 ml Fluidextrakt mit 2 ml Ethanol 30 % *R* (V/V) verdünnt. Die Fingerprints der Fluidextrakte wurden in beiden DC Systemen (siehe Tabelle 6, Seite 22) mit jenem der entsprechenden Drogen verglichen.

Zusätzlich zu den Referenzsubstanzen wurden bei den Fluidextrakt-Chromatogrammen zur besseren Vergleichbarkeit jeweils eine Probe des Droгенаuszugs von *Polygala senega*, *Polygala tenuifolia*, *Glinus oppositifolius* sowie der Probe RS15 aufgetragen.

Die Testung von weiteren Referenzsubstanzen für die Monographie des Polygala-Fluidextrakts ist in Abbildung 38 (Seite 60) dargestellt. Da sowohl Hyperosid, Rutin als auch Chlorogensäure im charakteristischen Bereich der Unterscheidungen zwischen den Arten liegen, werden statt der wie üblich angegeben zwei Referenzsubstanzen alle drei Standards für die Monographie im ÖAB vorgeschlagen.

ERGEBNISSE

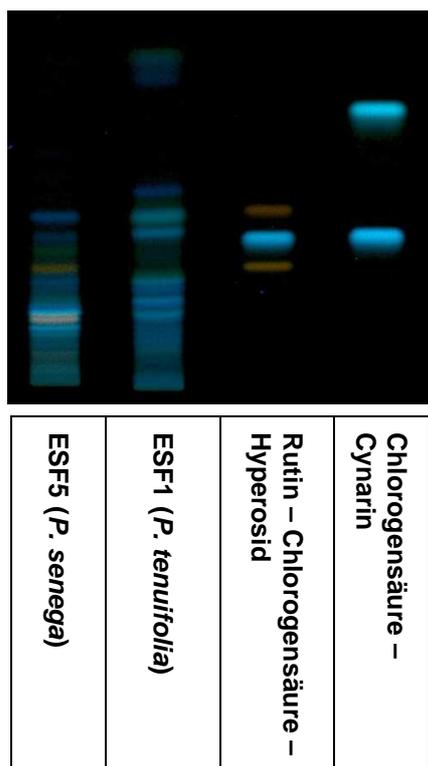


Abbildung 38. Testung der Referenzsubstanzen Rutin, Chlorogensäure, Hyperosid und Cynarin (FM2, Tabelle 6, Seite 22), 30 min nach dem Besprühen mit NST-PEG-Reagenz bei UV 366 nm

Bei nachfolgender Abbildung 39 (Seite 61) sind die Fluidextrakte (ESF1-8) im Vergleich mit entsprechendem Drogenmaterial (RS11, 28, 04, 19) im Fließmittelsystem 2 (siehe Tabelle 6, Seite 22) dargestellt. Beim Auswerten dieses Chromatogramms fiel auf, dass das Bandenmuster der Fluidextrakte von *Polygala senega* mit jenem des entsprechenden Drogenmaterials ident ist. Bei *Polygala tenuifolia* hingegen unterscheidet sich das Bandenmuster, da die in der Droge enthaltene Saccharose beim Fluidextrakt nicht erkennbar ist. Zur Erklärung dieses Phänomens wird angenommen, dass sich der enthaltene Zucker in Glucose und Fructose aufspaltet. Diese Reaktion kann auch mit den entsprechenden Referenzsubstanzen Glucose und Fructose belegt werden.

In Abbildung 39 B (Seite 61) wird die Anwesenheit von Glucose und Fructose beim Fluidextrakt aus *Polygala tenuifolia* durch rote Pfeile markiert, die Saccharose im Fluidextrakt von *Polygala senega* wird mit einem gelben Pfeil gekennzeichnet.

ERGEBNISSE

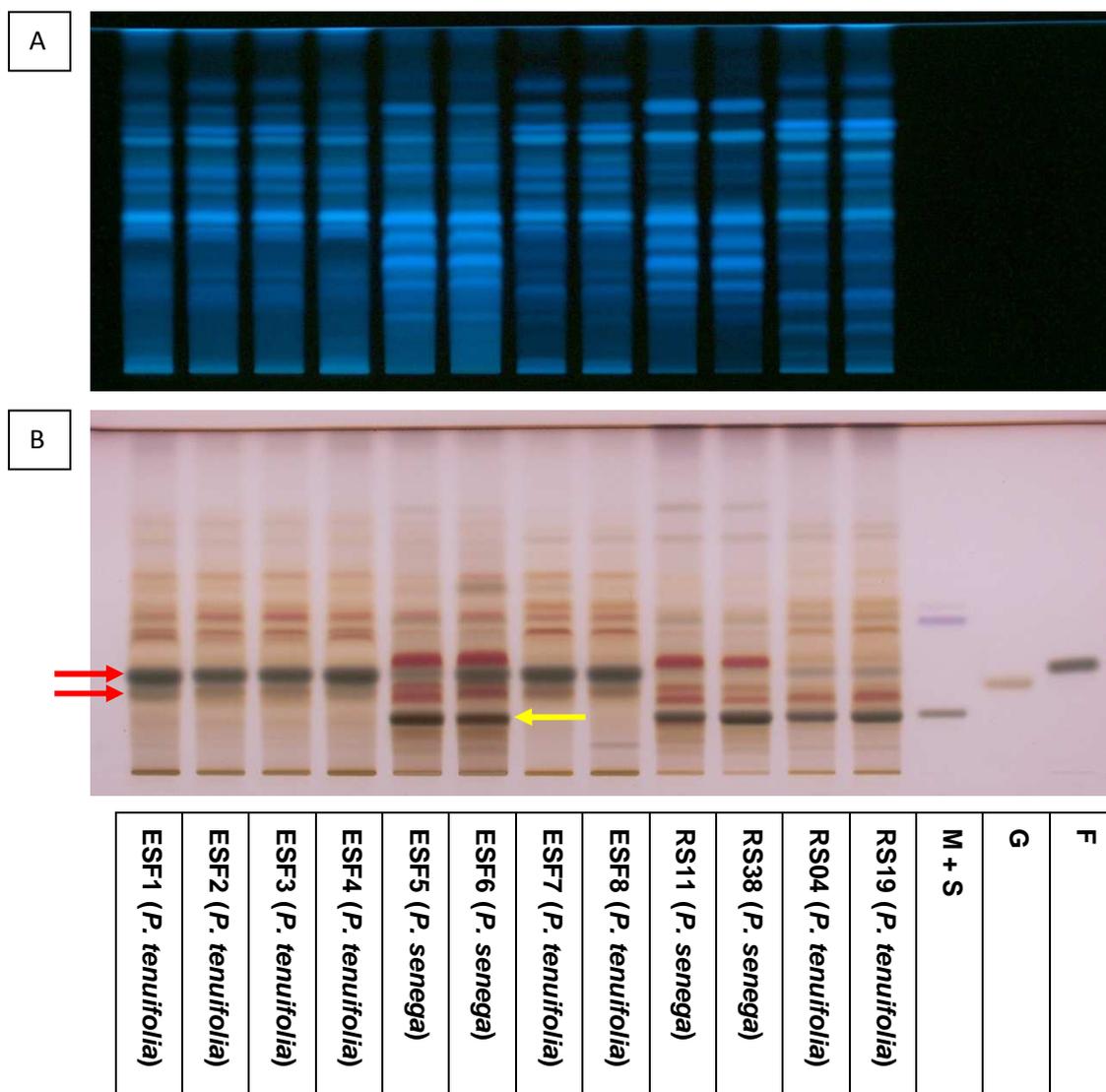


Abbildung 39. DC-Vergleich der acht Fluidextrakte mit jeweils zwei Proben von *Polygala senega* (RS11, RS38) und von *Polygala tenuifolia* (RS04, RS19) (FM1, Tabelle 6, Seite 22) vor dem Besprühen bei 366 nm (A) und nach dem Besprühen mit AAS-Reagenz im Tageslicht (B), Referenzsubstanzen: Monoammoniumglycyrrhizat (M), Saccharose (S), Glucose (G) und Fructose (F).

Eine dünnschichtchromatographische Differenzierung der *Polygala*-Arten aufgrund der enthaltenen Triterpensaponine ist eindeutig möglich. Demzufolge können die Fluidextrakte ESF1, 2, 3, 4, 7 und 8 der Stammpflanze *Polygala tenuifolia* und ESF5 und 6 *Polygala senega* zugeordnet werden.

Zur Identifizierung der *Polygala*-Fluidextrakte wurde in weiterer Folge eine dünnschichtchromatographische Auftrennung der enthaltenen Flavonoide und phenolischen Bestandteile durchgeführt. In Abbildung 40 (Seite 62) wird das Bandenmuster der Fluidextrakte aus *Polygala tenuifolia* (ESF1, 2, 3, 4, 7 und 8) mit jenem der entsprechenden pulverisierten Droge (RS04, 09 und 19) verglichen.

ERGEBNISSE

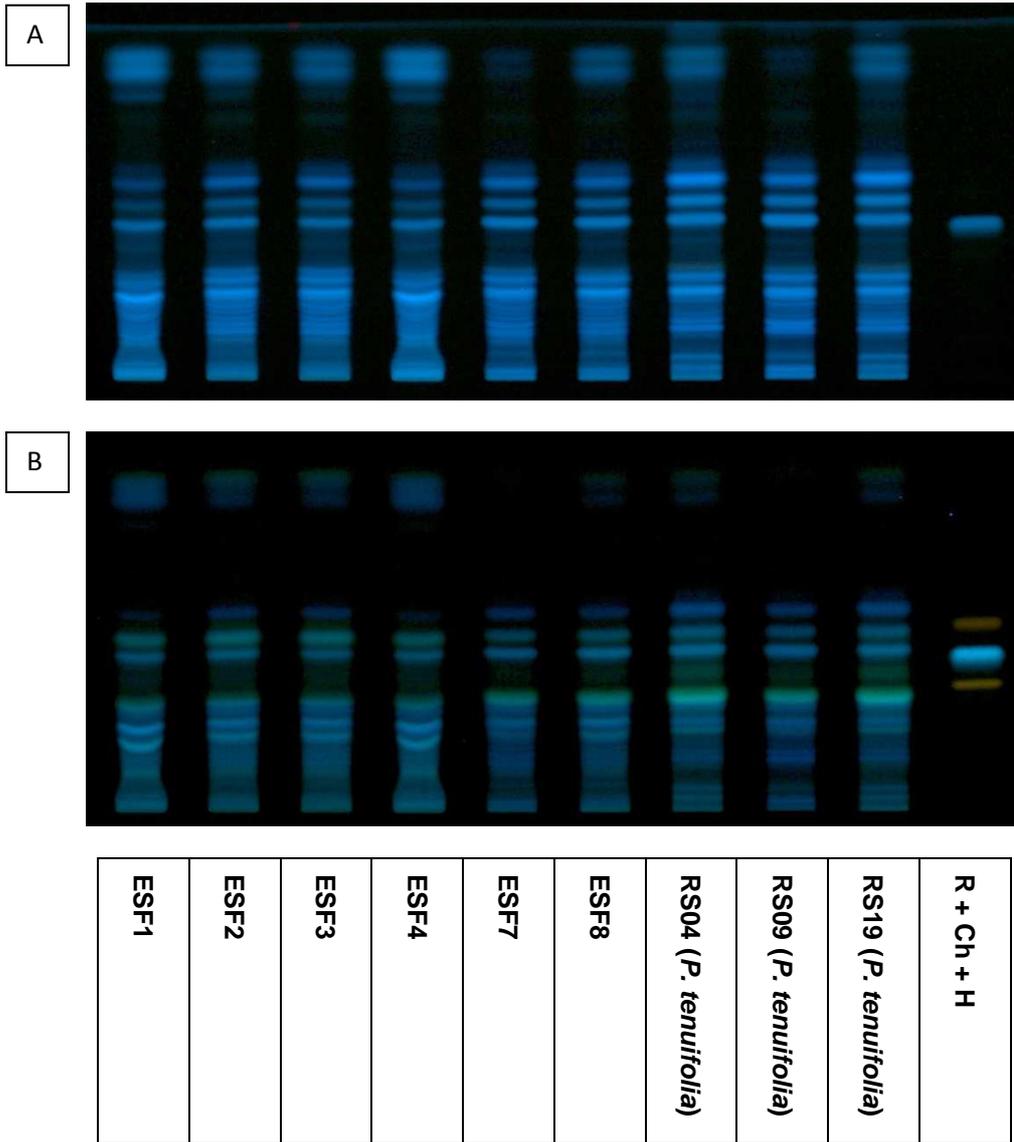


Abbildung 40. DC-Vergleich der sechs *Polygala tenuifolia*-Fluidextrakte (ESF1, ESF2, ESF3, ESF4, ESF7, ESF8) mit der pulverisierten Wurzeldroge von *Polygala tenuifolia* (RS04, RS09, RS19) nach Entwicklung mit FM2 (Tabelle 6, Seite 22) vor dem Besprühen (A) und 30 min nach dem Besprühen (B) mit NST-PEG-Reagenz jeweils bei UV 366 nm, Referenzsubstanzen: Hyperosid (H), Chlorogensäure (Ch) und Rutin (R)

Die Übereinstimmung der Bandenmuster von Fluidextrakten und Pulverdrogen ist deutlich erkennbar und demnach eine Identifizierung der Fluidextrakte als Extrakt aus *Polygala tenuifolia* möglich.

In der nachfolgenden Abbildung 41 (Seite 63) werden die Bandenmuster der Fluidextrakte aus *Polygala senega* (ESF5 und 6) im Vergleich zur pulverisierten Wurzeldroge (RS11, 38 und 40) dargestellt.

ERGEBNISSE

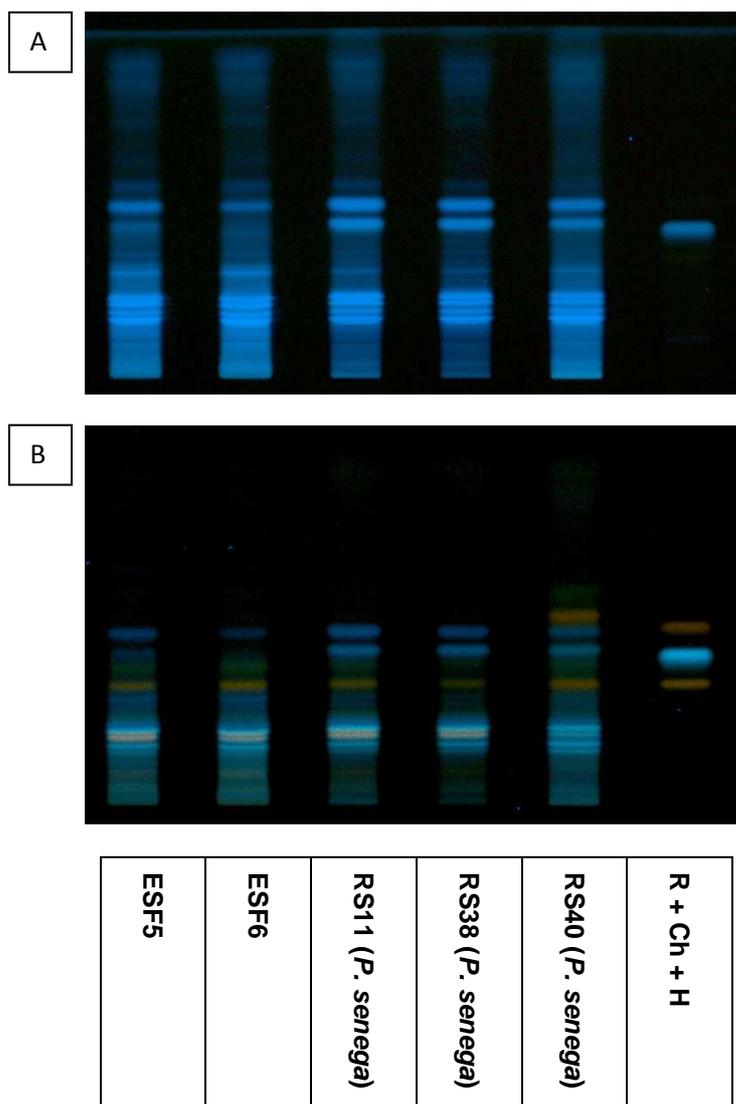


Abbildung 41. DC-Vergleich der zwei Fluidextrakte aus *Polygala senega* (ESF5, ESF6) mit der pulverisierten Wurzel Droge von *Polygala senega* (RS11, RS38, RS40) nach Entwicklung mit FM2 (Tabelle 6, Seite 22) vor dem Besprühen (A) und 30 min nach dem Besprühen (B) mit NST-PEG-Reagenz jeweils bei UV 366 nm, Referenzsubstanzen: Hyperosid (H), Chlorogensäure (Ch) und Rutin (R)

Die Übereinstimmung der Bandenmuster zwischen Fluidextrakt und pulverisierter Droge bei *Polygala senega* fällt ebenso eindeutig aus und kann somit zur dünnschichtchromatographischen Identifizierung herangezogen werden.

Das Bandenmuster der enthaltenen Flavonoide und phenolischen Verbindungen in den Fluidextrakten wird im Vergleich zu den DC-Fingerprints der pulverisierten Drogen (*Polygala senega*, *Polygala tenuifolia*, *Glinus oppositifolius*, RS15 – nicht identifiziert) in Abbildung 42 (Seite 64) dargestellt.

ERGEBNISSE

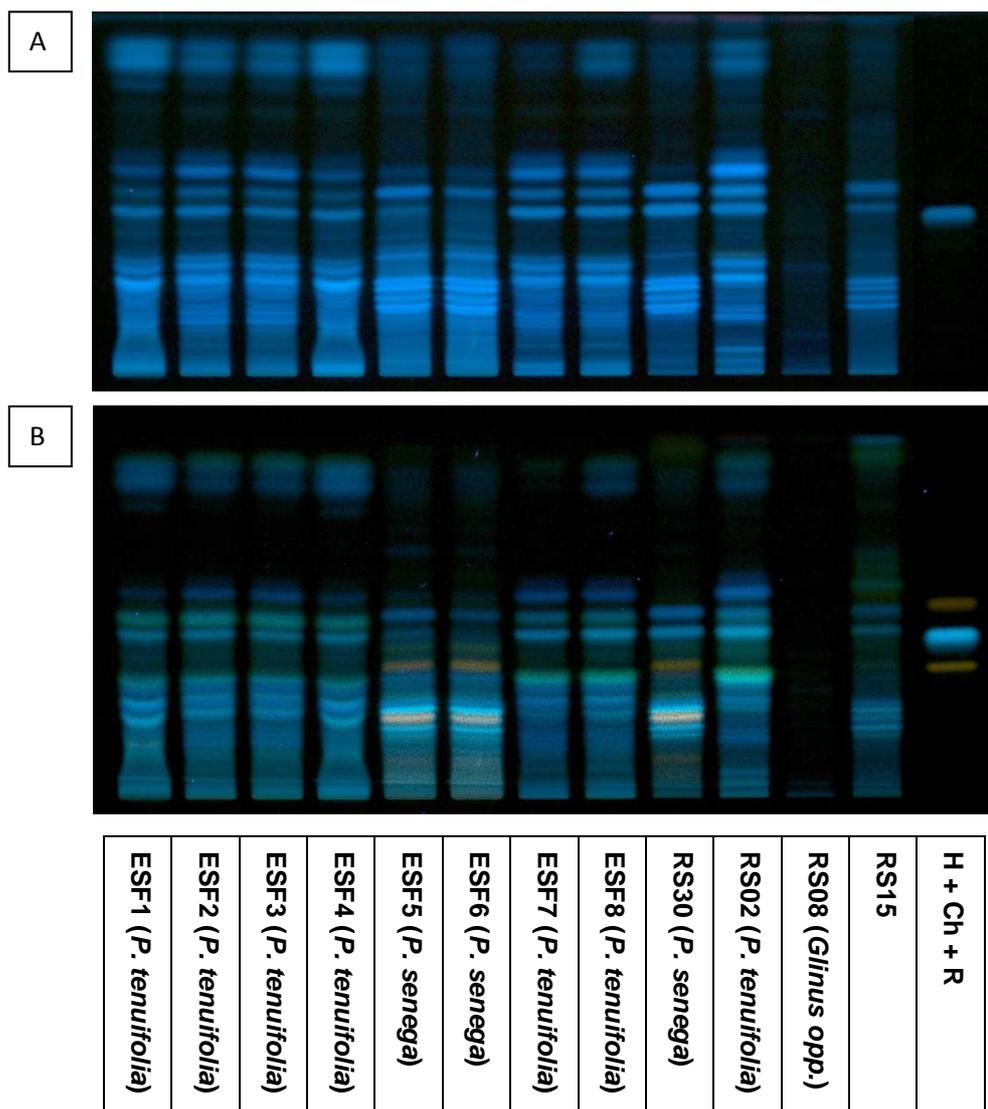


Abbildung 42. DC-Vergleich der acht Fluidextrakte mit *Polygala senega* (RS30), *Polygala tenuifolia* (RS02), *Glinus oppositifolius* (RS08) sowie RS15 nach Entwicklung mit FM 2 (Tabelle 6, Seite 22) vor dem Besprühen (A) und 30 min nach dem Besprühen (B) mit NST-PEG-Reagenz jeweils bei UV 366 nm, Referenzsubstanzen: Hyperosid (H), Chlorogensäure (Ch) und Rutin (R)

Die bereits bei der Analyse der Wurzeldroge beschriebenen charakteristischen Unterschiede zwischen *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* (blaue Doppel- vs. Dreifachbande, orange Bande auf Höhe von Rutin, zwei hellblau fluoreszierende Banden bei *Polygala senega* mit einer orange-farbenen Bande dazwischen; grüne Bande knapp kleinerer Rf-Wert als Rutin bei *Polygala tenuifolia*) sind auch bei den Fluidextrakten deutlich ersichtlich. Daher können die Fluidextrakte eindeutig den beiden *Polygala*-Arten zugeordnet werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den Triterpensaponin-Bandenmustern wurden die Fluidextrakte ESF1-4 sowie ESF7

ERGEBNISSE

und ESF8 aus der Stammpflanze *Polygala tenuifolia* hergestellt bzw. ESF5 und ESF6 aus *Polygala senega*.

Beide Inhaltsstoffmuster, sowohl von den enthaltenen Triterpensaponinen als auch von den Flavonoiden, stimmen mit den Ergebnissen der Pulverdrogen überein. Eine Identifizierung und Zuordnung der Fluidextrakte zu den beiden Polygala-Arten durch DC ist zweifelsfrei möglich.

Da im Fingerprint des Fluidextraktes von *Polygala tenuifolia* durch die gespaltene Saccharose ein Unterschied zum Drogenmaterial vorliegt, wird für die Identitätsprüfung in der ÖAB-Monographie des Fluidextrakts der Nachweis der enthaltenen Flavonoide und phenolischen Verbindungen vorgeschlagen. Nachfolgend wird das für die Monographie von Polygalae extractum fluidum empfohlene schematische Strichchromatogramm für das Flavonoidbandenmuster dargestellt.

Tabelle 17. Vorgeschlagenes Strichchromatogramm des Flavonoidbandenmusters für die ÖAB-Monographie

Oberer Plattenrand			
<p>Hyperosid: eine orange fluoreszierende Zone</p> <p>Chlorogensäure: eine blau fluoreszierende Zone</p> <p>Rutosid: eine orange fluoreszierende Zone</p>	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine orange fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> </td> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine grün fluoreszierende Bande</p> </td> </tr> </table>	<p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine orange fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p>	<p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine grün fluoreszierende Bande</p>
<p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine orange fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p>	<p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine blau fluoreszierende Bande</p> <p>eine grün fluoreszierende Bande</p>		
Referenzlösung	Untersuchungslösung		
	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;"><i>Polygala senega</i></td> <td style="width: 50%;"><i>Polygala tenuifolia</i></td> </tr> </table>	<i>Polygala senega</i>	<i>Polygala tenuifolia</i>
<i>Polygala senega</i>	<i>Polygala tenuifolia</i>		

ERGEBNISSE

4.2.1.2 Spektroskopie (NIR und MIR)

Zur spektroskopischen Untersuchung der Fluidextrakte erfolgte die Vermessung ausschließlich mittels ATR FT-MIR Spektroskopie, da in den resultierenden Spektren viele lösungsmittelassoziierte Banden (Ethanol und Wasser) zu erwarten sind.

Die erhaltenen Spektren der einzelnen Fluidextrakte ESF1-8 sind in Abbildung 43 (Seite 67) dargestellt. Der abweichende Bereich bei einer Wellenzahl von $\sim 2000 \text{ cm}^{-1}$ hat dabei keine Aussagekraft.

ERGEBNISSE

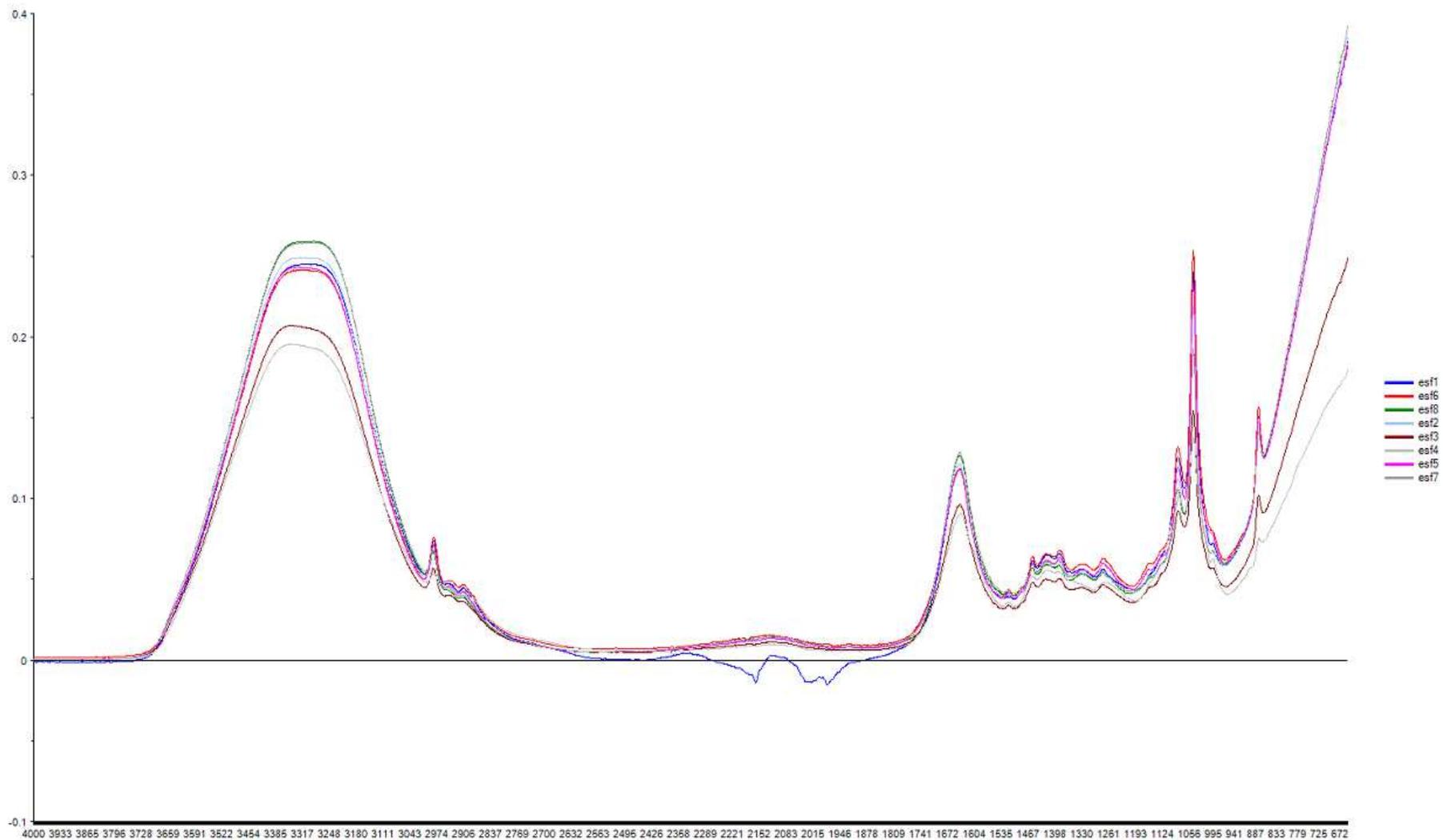


Abbildung 43. IR-Spektren der Fluidextrakte ESF 1-8 im Vergleich

ERGEBNISSE

Die Spektren in Abbildung 43 (Seite 67) erlauben keine Zuordnung der Fluidextrakte zu einer der beiden Arten, da es zu vielen Überlappungen kommt.

Für die Erstellung eines aussagekräftigen Modells zur Unterscheidung von *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* erwies sich die Anzahl von acht vorhandenen Fluidextrakt-Proben allerdings als zu gering. Die Differenzen in den Spektren sind zudem nur minimal ausgeprägt. Für eine Hauptkomponentenanalyse der Inhaltsstoffe der beiden Arten müsste weiters noch ein identischer Ethanolgehalt in den Proben vorliegen, um die Intensitäten der Hauptbanden in den erhaltenen Spektren reproduzierbar vergleichen zu können. Die gewählte Messtechnik ist zudem nicht die Methode der Wahl für eine Messung derartiger Flüssigkeiten, da der Ethanol auf dem ATR Kristall schnell verdunstet und dadurch eine Verfälschung in der Hauptkomponentenanalyse verursacht.

In der Zusammenschau der IR-spektroskopischen Resultate zeigt sich, dass die IR-Spektroskopie sehr gut für die Identifizierung des Drogenmaterials der Polygala-Arten sowohl in pulverisierter als auch in ganzer Form geeignet ist. Die Ergebnisse der IR-Messungen der Fluidextrakte hingegen lassen keine Trennung und Zuordnung der Proben zu *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* zu, da die Spektren fast ausschließlich aus lösungsmittelassoziierten Banden bestehen. Eine Weiterentwicklung dieses Modells für flüssiges Probenmaterial erscheint daher als wenig zielführend.

4.2.2 Prüfung auf Reinheit

Für die Prüfung auf Reinheit von Fluidextrakten wurde der Ethanolgehalt der Proben laut den im EuAB angegebenen Vorschriften bestimmt.

4.2.2.1 Ethanolgehalt

Für die Bestimmung des Ethanolgehalts wurden für jeden Fluidextrakt zwei Destillationen durchgeführt. Die Masse der beiden erhaltenen Destillate wurde an zwei unterschiedlichen Tagen bestimmt und die Mittelwerte der Messungen berechnet. Durch diese Vorgangsweise wurden tagesabhängige Schwankungen der Messresultate berücksichtigt und die Reliabilität der Ergebnisse erhöht. Nachfolgende Abbildung 44 (Seite 69) zeigt die Durchführung der Destillation zur Ethanolgehaltsbestimmung.

ERGEBNISSE



Abbildung 44. Destillation der Fluidextrakte zur Ethanolgehaltsbestimmung

Wie Tabelle 18 zu entnehmen ist, liegt der ermittelte Ethanolgehalt der Fluidextrakte zwischen 30,80% und 34,18%.

Tabelle 18. Vergleich des Ethanolgehalts der Fluidextrakte ESF 1-8 aus Destillation 1 (Messung 1) und Destillation 2 (Messung 2), die resultierende Mittelwerte der Bestimmungen sowie der (relativen, rel.) Standardabweichung (STABW)

	Ethanolgehalt in %								MW gesamt
	ESF1	ESF2	ESF3	ESF4	ESF5	ESF6	ESF7	ESF8	
Messung 1	30,67	31,64	32,27	31,40	34,31	31,42	31,33	30,04	
Messung 2	30,93	32,09	32,62	31,56	34,04	31,20	30,58	33,69	
MW	30,80	31,87	32,44	31,48	34,18	31,31	30,96	33,87	32,11
STABW	0,73	0,53	0,55	0,63	0,42	0,56	0,49	0,46	
rel. STABW	2,36	1,67	1,69	2,00	1,22	1,80	1,57	1,34	

ERGEBNISSE

Zwischen den Fluidextrakten von *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* konnten keine signifikanten Unterschiede im Ethanolgehalt festgestellt werden. Weiters entspricht der ermittelte Ethanolgehalt den Herstellerangaben. Generell liegen die ermittelten Werte in einem engen Bereich, daher wird im Monographievorschlag festgehalten, dass der Ethanolgehalt zwischen 95 bis 105 Prozent der in der Beschriftung angegebenen Menge betragen soll.

4.2.2.2 Vergällungsmittel

Von einer Prüfung der Polygala-Fluidextrakte auf Vergällungsmittel wurde abgesehen, da bereits die Hersteller für eine Einhaltung der Grenzwerte verantwortlich sind. Im Monographievorschlag wird dieser Grenzwert daher wie folgt festgesetzt.

Methylalkohol, iso-Propylalkohol (2.9.11):

Höchstens 0,05% (V/V) Methanol und höchstens 0,05% (V/V) iso-Propylalkohol

4.2.3. Wertbestimmung mittels Schaumindex

Die bereits beim Drogenmaterial erfolgreich durchgeführte Methode des Schaumindex wurde auch zur Wertbestimmung der enthaltenen Saponine beim Fluidextrakt angewandt. Pro Fluidextrakt wurden mindestens fünf Werte der Schaumhöhe sowohl in Centimeter (cm) als auch in Milliliter (ml) ermittelt und der Schaumindex daraus berechnet. In Abbildung 45 (Seite 71) wird die Durchführung der Wertbestimmung mittels Schaumindex dargestellt.

ERGEBNISSE

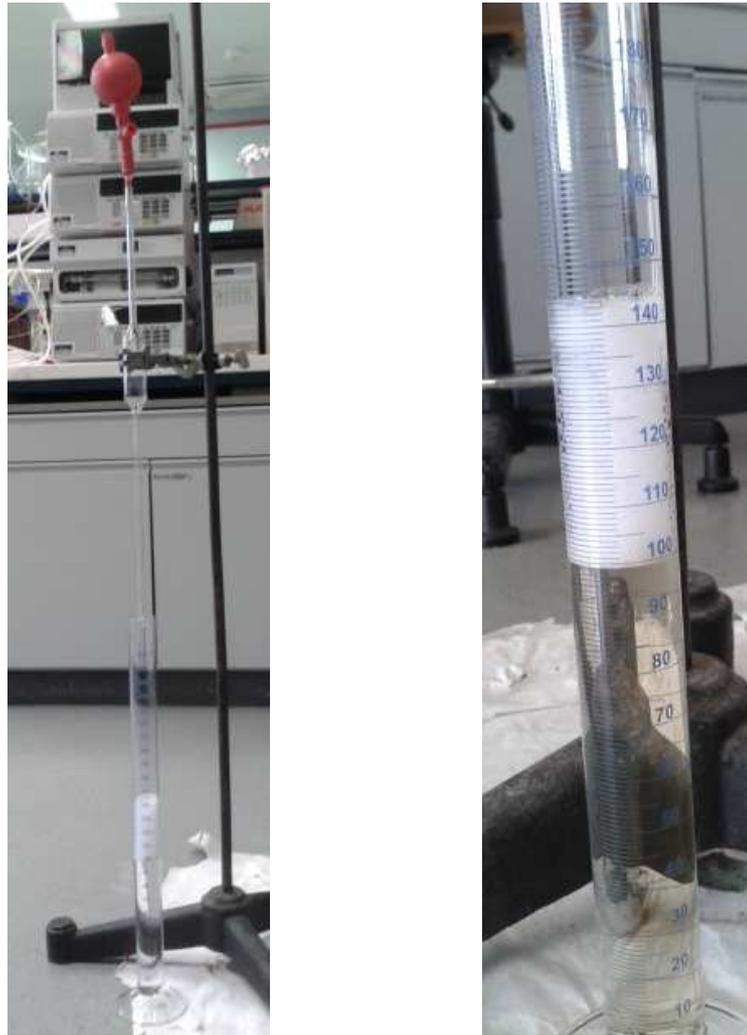


Abbildung 45. Apparatur zur Bestimmung des Schaumindex

Die Berechnung des Schaumindex (SI) erfolgte nach der unten angeführten Formel. Als Referenzlösung wurde eine 4%ige Lösung von Ammoniumlaurylsulfat verwendet und ein Referenzwert von 44,19 ml bzw. 7,22 cm ermittelt.

$$\frac{\left(\frac{P}{T}\right) * 1000}{C}$$

P = Mittelwert der Schaumhöhe aus 3 Messungen der Untersuchungslösung (cm oder ml)

T = Mittelwert der Schaumhöhe aus 3 Messungen der Referenzlösung (cm oder ml)

C = Konzentration der Untersuchungslösung in g/l

Die resultierenden Mittelwerte des Schaumindex der untersuchten Fluidextrakte ESF 1-8 können Tabelle 19 (Seite 72) entnommen werden.

ERGEBNISSE

Tabelle 19. Vergleich der Schaumhöhen (in ml und cm), des Mittelwertes (MW) der Schaumindices (SI), sowie der (relativen, rel.) Standardabweichungen (STABW) der Fluidextrakte ESF1-8

	Schaumindex							
	ESF1	ESF2	ESF3	ESF4	ESF5	ESF6	ESF7	ESF8
Schaumhöhe (ml)	41,0	40,8	40,6	41,0	47,6	40,6	43,4	42,2
Schaumhöhe (cm)	6,62	6,56	6,58	6,64	7,74	6,62	7,04	6,84
MW des SI (abhängig von ml)	92,78	92,33	91,88	92,78	107,72	91,88	98,21	95,50
STABW (ml)	1,60	1,64	1,34	1,27	0,89	2,27	1,69	0,45
rel. STABW (%)	3,93	4,12	3,46	3,21	1,86	5,45	3,98	1,06

Auch bei den Fluidextrakten ist eine Abgrenzung der beiden Polygala-Arten mithilfe der Bestimmung des Schaumindex nicht möglich, da sich die meisten Schaumindices einheitlich zwischen einem Wert von 90-100 einordnen. Für die Monographie wird daher ein Mindestwert von 90 vorgeschlagen.

Aufgrund der durchgeführten DC-Untersuchungen konnten die zur Herstellung der acht Fluidextrakte verwendeten Polygala-Wurzeldrogen eindeutig identifiziert werden (Tabelle 20, Seite 73).

ERGEBNISSE

Tabelle 20. Identifizierung der untersuchten Proben (Fluidextrakt)

Kürzel	Identifikation
ESF1	<i>Polygala tenuifolia</i>
ESF2	<i>Polygala tenuifolia</i>
ESF3	<i>Polygala tenuifolia</i>
ESF4	<i>Polygala tenuifolia</i>
ESF5	<i>Polygala senega</i>
ESF6	<i>Polygala senega</i>
ESF7	<i>Polygala tenuifolia</i>
ESF8	<i>Polygala tenuifolia</i>

Wie aus Tabelle 20 ersichtlich, kann bei sechs Proben als Ausgangsdroge *Polygala tenuifolia* nachgewiesen werden, zwei Fluidextrakte wurden aus *Polygala senega* hergestellt.

Im folgenden Kapitel 5 (Seite 74) werden die Forschungsergebnisse zu einem Monographievorschlag für *Polygalae extractum fluidum* zusammengefasst.

5. Vorschlag für die Monographie „Polygalae extractum fluidum“ (ÖAB)

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse resultiert folgender Monographievorschlag:

ÖAB xxxx/xxx

Senegawurzfluidextrakt
Polygalae extractum fluidum
Extractum Polygalae fluidum

Definition

Der aus **Senegawurzel** (*Polygalae radix*) hergestellte Fluidextrakt.

Herstellung

Der Fluidextrakt wird aus der Droge unter Verwendung von Ethanol 20-40% (V/V) nach einem geeigneten Verfahren hergestellt.

Eigenschaften

Aussehen: gelbe bis rotbraune, leicht trübe Flüssigkeit

Löslichkeit: mischbar unter Trübung mit Wasser und Ethanol 96 %

Prüfung auf Identität

Dünnschichtchromatographie (2.2.27):

Untersuchungslösung: 1 ml Fluidextrakt wird mit 2 ml Ethanol 30 % R verdünnt

Referenzlösung: 2,0 mg Rutosid R, 2,0 mg Hyperosid R und 5,0 mg Chlorogensäure R werden in 10 ml Methanol R gelöst

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

Fließmittel: Ethylacetat R, Eisessig R, wasserfreie Ameisensäure R, Wasser R (100:11:11:26 V/V/V/V)

Auftragen: 5 µl; bandförmig (10 mm) [oder 2,5 µl; bandförmig (8 mm)]

Laufstrecke: 12 cm [oder 6 cm]

Trocknen: bei 100 bis 105°C

Detektion: Die Platte wird mit einer Lösung von Diphenylboryloxyethylamin R (10 g · l⁻¹) in Methanol R und anschließend mit einer Lösung von Macrogol 400 R (50 g · l⁻¹) in Methanol R besprüht. Die Platte wird 30 min an der Luft trocknen gelassen. Die Auswertung erfolgt im ultravioletten Licht bei 365 nm.

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

Oberer Plattenrand	
Hyperosid: eine orange fluoreszierende Zone Chlorogensäure: eine blau fluoreszierende Zone	eine blau fluoreszierende Bande eine blau fluoreszierende Bande eine blau fluoreszierende Bande eine blau fluoreszierende Bande
Rutosid: eine orange fluoreszierende Zone	eine orange fluoreszierende Bande eine grün fluoreszierende Bande eine blau fluoreszierende Bande eine blau fluoreszierende Bande
Referenzlösung	Untersuchungslösung <i>Polygala senega</i> <i>Polygala tenuifolia</i>

Prüfung auf Reinheit

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

Methylalkohol, 2-Propanol (2.9.11): Höchstens 0,05 Prozent (V/V) Methanol und höchstens 0,05 Prozent (V/V) 2-Propanol

Wertbestimmung

Schaumindex: mind. 90

Referenzlösung: 3,3 g einer Ammoniumlaurylsulfatlösung ($300 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) in Wasser R werden in ein 40 ml Becherglas eingewogen und mit Wasser R auf 25,0 g verdünnt. 2,0 g dieser Lösung werden in einem 250 ml Becherglas zu 100,0 g mit Wasser R verdünnt und mit einem Spatel möglichst ohne Schaumbildung homogenisiert.

Untersuchungslösung: 1,0 g Fluidextrakt werden in einem 250 ml Becherglas mit 100,0 g Wasser R verdünnt.

50,0 ml der Referenz- bzw. Untersuchungslösung werden mit einer 50,0 ml Vollpipette entnommen und die Pipette in einer Höhe von 45 cm zum Mensurboden (250 ml, Skalierung 1 ml) befestigt. Der Rest der Referenz- bzw. Untersuchungslösung wird möglichst ohne Schaumbildung in die Mensur übergeführt. Der durch das Ablassen der Referenz- bzw. Untersuchungslösung in die Mensur entstandene Schaum wird in Zentimetern abgelesen.

Berechnung des Schaumindex:

$$\frac{\left(\frac{P}{T}\right) \cdot 1000}{C}$$

P = Mittelwert aus 3 Messungen der Untersuchungslösung

T = Mittelwert aus 3 Messungen der Referenzlösung

C = Konzentration der Untersuchungslösung in g/l

Lagerung

Vor Licht geschützt, in dicht schließenden Gefäßen.

6. Diskussion

Verschiedene *Polygala* Arten sind seit langer Zeit in medizinischer Verwendung. Die EuAB-Monographie von *Polygalae Radix* bezieht sich allerdings nur auf „*Polygala senega* und eng verwandte Arten“, ohne diese Arten näher zu spezifizieren. *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* können nach Hänsel und Sticher (2010) als medizinisch-pharmazeutisch gleichwertig angesehen werden. Beide Arten sind im Handel als Wurzel Droge erhältlich und werden für die Herstellung des Fluidextraktes eingesetzt, wobei *Polygala tenuifolia* aufgrund des günstigeren Preises am europäischen Markt überwiegend vertreten ist.

Das Ziel dieser Diplomarbeit besteht in der Erstellung eines Monographie-Vorschlags, um beide *Polygala*-Arten als Stammpflanzen zur Herstellung des Fluidextraktes ins ÖAB aufzunehmen. Um die Qualität der bereits am Markt befindlichen Fluidextrakte zu sichern, werden die folgenden Identitäts- und Reinheitsprüfungen für die ÖAB-Monographie vorgeschlagen.

Als Grundlage für die Identifizierung von *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* sowie zur Abgrenzung von der Verfälschung *Glinus oppositifolius* wurden für die vorhandenen Proben an der Wurzel Droge makroskopische und mikroskopische Charakteristika nachgewiesen, anhand derer eine Unterscheidung der Arten möglich ist.

Für eine phytochemische Identifizierung wurde die Dünnschichtchromatographie (DC) eingesetzt, da sie einfach und ökonomisch in Labors und Apotheken durchführbar ist. Dafür wurden zwei in den untersuchten *Polygala*-Arten enthaltene Inhaltsstoffgruppen ausgewählt.

Für die DC-Analyse auf vorhandene Triterpensaponine wurde die Methode aus der bereits bestehenden Monographie von *Polygalae Radix* im EuAB von Mascotti (2014) überarbeitet. Eine weitere DC-Methode zur Prüfung auf enthaltene Flavonoide und phenolische Inhaltsstoffe wurde von Prof. Frederich⁸ (Expertengruppe 13B der EDQM) vorgeschlagen und aufgrund der eindeutigen Resultate bezüglich der Identifizierung von den *Polygala*-Arten beibehalten.

⁸ Professeur Michel Frédéric; Département de Pharmacie, Université de Liège, Belgium

DISKUSSION

Beim Fluidextrakt von *Polygala tenuifolia* konnte bei der DC-Auftrennung der Saponine eine Aufspaltung der Saccharose nachgewiesen werden und es kam somit zu einem unterschiedlichen Bandenmuster im Vergleich zum pulverisierten Drogenmaterial. Die Ursache dieses Phänomens kann nicht nachvollzogen werden, da die Fluidextrakte beider Arten methodisch ident durch Mazeration gewonnen wurden. Auch eine etwaige Vorbehandlung mit *Glycyrrhiza glabra*, welche in der TCM bei der Verarbeitung von *Polygala tenuifolia* angewandt wird, kann ausgeschlossen werden, da im direkten DC-Vergleich von *Polygala tenuifolia* und *Glycyrrhiza glabra* keine Übereinstimmungen gefunden werden konnten.

Aufgrund der Abweichungen der enthaltenen Zucker im Chromatogramm sowie im Zuge der Harmonisierung mit dem EuAB wurde das Fließmittelsystem 2 (siehe Tabelle 6, Seite 22) zur Flavonoid-Auftrennung für die dünnschichtchromatographische Identifizierung der beiden Polygala-Arten in der ÖAB-Monographie vorgeschlagen. Im Zuge der Auswertungen der Chromatogramme wurden verschiedene Referenzsubstanzen getestet. Da sowohl Hyperosid, Rutin als auch Chlorogensäure gleichermaßen in einem günstigen Rf-Bereich liegen und standardmäßig in Labors vorrätig sind, werden statt der üblichen zwei Standards bei der Monographie von Polygalae extractum fluidum alle drei Standards empfohlen.

Die dünnschichtchromatographischen Ergebnisse der Wurzeldrogen als auch der untersuchten Fluidextrakte stehen in Übereinstimmung mit der Zuordnung anhand der mittels Mikroskopie gewonnenen Resultate.

Im chinesischen AB, in welchem *Polygala tenuifolia* bereits monographiert ist, werden zusätzlich zur Mikroskopie zwei DC-Methoden als Identifizierungsmöglichkeit vorgeschlagen. Die dabei eingesetzten Referenzsubstanzen Tenuifolin und auch Polygalaranthone III sind in Europa nicht erhältlich. Die verwendete mobile Phase wurde ebenfalls nicht aus dem chinesischen, sondern aus Gründen der Harmonisierung aus dem EuAB übernommen.

Aufgrund von Problemen bei der Beschaffung von Blut zur Bestimmung des obsoleten Hämolytischen Index wurde für die Wertbestimmung der enthaltenen Saponine die von PharmEuropa neu entwickelte Methode des Schaumindex eingesetzt. Dieser basiert auf der Grenzflächenaktivität der Saponine als

DISKUSSION

bestimmendes Charakteristikum, welche für die Bildung von Schäumen verantwortlich ist. Im Gegensatz zum chinesischen Arzneibuch, welches eine aufwändigere Gehaltsbestimmung mittels HPLC erfordert, begnügen sich das ÖAB und das EuAB mit einer einfacher durchführbaren Wertbestimmung. Die enthaltene Menge an Inhaltsstoffen kann durch die Methode des Schaumindex nicht bestimmt werden, relative Rückschlüsse auf die Quantität von Saponinen sind allerdings möglich.

Die gemessenen Wertebereiche der Wurzelroden von *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* weisen jedoch Überschneidungen auf, die durch unterschiedliche Lagerungszeiten bzw. -bedingungen oder verschiedene Erntezeitpunkte beeinflusst sein könnten. Der Schaumindex der Fluidextrakte, hergestellt aus beiden Polygala-Arten, liegt in einem ähnlichen Wertebereich, demnach können diese als gleichwertig angesehen werden. Eine durch den unterschiedlichen Alkoholgehalt im Fluidextrakt bedingte Messwertvarianz wurde experimentell ausgeschlossen.

Zur Qualitätssicherung von *Polygalae extractum fluidum* wurde im Monographievorschlag ein Mindestwert von 90 festgelegt. Dieser Mindestwert wurde von allen acht bereits am Markt befindlichen Fluidextrakten überschritten.

Mit der IR-Spektroskopie liegt eine weitere Methode zur Identifizierung von *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* vor. Bei der Wurzelrode ist eine Unterscheidung der beiden Arten zweifelsfrei möglich. Beim Fluidextrakt treten in den Spektren zu viele lösungsmittelassoziierte Banden auf, welche durch eine vorherige Lyophilisation eventuell umgangen werden können. Für eine exakte Untersuchung liegt allerdings mit acht Fluidextrakten eine zu kleine Probenzahl vor, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten.

Die für eine Qualitätssicherung nach ÖAB verpflichtenden Reinheitsprüfungen auf Ethanolgehalt und enthaltene Vergällungsmittel wurden aus dem EuAB übernommen. Aufgrund der einheitlichen Resultate und der geringen Varianz der Messwerte wurde der Grenzwert für Ethanol auf 95% - 105% der in der Beschriftung angegebenen Menge vorgeschlagen.

Die durchgeführten Analysen ergaben sowohl für *Polygala senega* als auch für *Polygala tenuifolia* reproduzierbare Ergebnisse, welche in einem Vorschlag für die Monographie im ÖAB zusammengefasst wurden.

DISKUSSION

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Diplomarbeit hatte die wissenschaftlich-experimentelle Erstellung eines Monographievorschlags von „*Polygalae extractum fluidum*“ für das ÖAB zum Ziel. Basierend auf einer Analyse von 57 Proben der Wurzeldrogen von *Polygala senega* und *Polygala tenuifolia* ließen sich die erhaltenen Resultate an acht am Markt erhältlichen Polygala-Fluidextrakten bestätigen.

Für die Identifizierung der Polygala-Wurzeldrogen sowie für die Abgrenzung zur Verfälschung *Glinus oppositifolius* wurden charakteristische makroskopische und mikroskopische Unterschiede nachgewiesen, welche eine eindeutige Zuordnung zu den untersuchten Arten erlauben.

Mithilfe der IR-Spektroskopie konnten die erhaltenen Resultate bezüglich der Identifizierung der Wurzeldrogen bestätigt werden.

Die Identitätsprüfung mittels DC erfolgte durch den Nachweis von zwei enthaltenen Inhaltsstoffgruppen, den Triterpensaponinen und den Flavonoiden. Ebenso zeigten die Fluidextrakte der beiden Polygala-Arten charakteristische Fingerprints.

Da beim Fluidextrakt von *Polygala tenuifolia* in DC-System zur Trennung der Triterpene ein unterschiedliches Bandenmuster im Vergleich zum pulverisierten Drogenmaterial auftrat, wurde das Fließmittelsystem zur Auftrennung der enthaltenen Flavonoide bevorzugt. Dieses wies keine Unterschiede im Fingerprint der Polygala-Fluidextrakte und Droгенаuszüge auf und wurde somit auch im Zuge der Harmonisierung mit dem EuAB für die Monographie im ÖAB vorgeschlagen.

Für die Wertbestimmung wurde anstelle der Bestimmung des Hämolytischen Index eine neue Methode des Schaumindex eingesetzt und dabei ein Mindestwert von 90 für den Fluidextrakt festgelegt.

Im Rahmen der Reinheitsprüfung wurde der Ethanolgehalt des Fluidextraktes bestimmt, dieser lieferte mit 30,80 bis 34,18 Prozent relativ einheitliche Werte. Als Grenzwert für Ethanol wurden 95% - 105% der in der Beschriftung angegebenen Menge vorgeschlagen. Aus den vorliegenden Ergebnissen konnte ein Monographievorschlag für „*Polygalae extractum fluidum*“ für das ÖAB erstellt werden.

8. Summary

This diploma thesis set out to establish the monograph of *Polygalae extractum fluidum* for the Austrian Pharmacopoeia by the use of scientific and experimental methods. The results generated by an analysis of 57 *Polygala senega* and *Polygala tenuifolia* root-drug samples could be confirmed by eight fluid extracts available on the market.

Characteristic macroscopic and microscopic differences were investigated in order to identify the *Polygala* root-drugs as well as to border the adulteration *Glinus oppositifolius*, which allowed a definite classification of the species under scrutiny.

The results with respect to the identification of the root-drug could be confirmed by IR-spectroscopy.

A TLC-analysis of the two ingredient-groups, triterpensaponins and flavonoids, allowed an allocation of the root-drugs to one of the two species. Characteristic fingerprints were detectable within the fluid extract samples, too.

Due to the presence of discrepancies between the TLC-fingerprints of the fluid extract and the powdered drug of *Polygala tenuifolia* using mobile phase 1, the mobile phase 2 (see Table 6, page 22) for the separation of the flavonoids was the preferred method. Hence, this mobile phase was proposed for the monograph in the Austrian Pharmacopoeia in the course of the harmonisation process with the European Pharmacopoeia.

A new method known as foam index was employed for valuation instead of the hemolytic index. In accordance with this approach, a minimal value of 90 was defined for the fluid extract.

Purity was determined by measuring the content of ethanol in the fluid extract, whereby relatively consistent data of between 30.8 and 34.18 were obtained. The maximum limit value of ethanol is suggested between 95%-105% of the amount specified in the inscription.

The findings of this diploma thesis enabled the development of a proposal for the monograph of "*Polygalae extractum fluidum*" for the Austrian Pharmacopoeia.

9. Literaturverzeichnis

- Bellenot D. (2014), persönliche Mitteilung zur Methode des Schaumindex; Responsable du Service Phytochimie et Normalisation, Iteipmai, Melay, Chemille
- Blaschek W. (Hrsg.) (2007), Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, Band 3, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, S.552 ff, 1023 ff
- Briggs C. J. (1988), Senega snakeroot – a traditional Canadian herbal medicine, Can. Pharm. J. 121: 199-201
- Estrada A., Katselis G.S., Laarveld B. und Barl B. (2000), Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L., Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 23 (1): 27-43
- Hänsel R. und Sticher O. (2010), Pharmakognosie – Phytopharmazie, 9. Auflage, Springer, London, S. 874-877
- Hegnauer R. (1969), Chemotaxonomie der Pflanzen V, Birkhäuser Verlag Basel, S. 357
- Heinrich M., Barnes J., Gibbons S. und Williamson E. (2004), Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy, Churchill Livingstone, Edinburgh, S. 227
- Hunnius C. (1997), Pharmazeutisches Wörterbuch, 8. Auflage, de Gruyter Verlag, Berlin, New York, S. 1103
- Jänicke C., Grünwald J. und Brendler T. (2003), Handbuch Phytotherapie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 487-488
- Kalg, A. (2009), Chinesische Arzneipflanzen – Wesensmerkmale und klinische Anwendung, Urban & Fischer Verlag/Elsevier Gmbh, S. 236-240
- Kim H.M., Lee E.H., Na H.J., Lee S.B., Shin T.Y., Lyu Y.S., Kim N.S und Nomura S. (1998), Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on the tumor necrosis factor- α secretion from mouse astrocytes, Journal of Ethnopharmacology, 61 (3): 201-208

- Klein L. C. Jr., De Andrade S. F. und Cechinel V. (2012), A Pharmacognostic Approach to the Polygala Genus: Phytochemical and Pharmacological Aspects, *Chemistry & Biodiversity* 9: 181-209
- Körfers A. und Sun Y. (2009), Traditionelle Chinesische Medizin – Arzneidrogen und Therapie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 422-423
- Lambert J.B., Gronert S., Shurvell H.F. und Lightner D.A. (2012), Spektroskopie – Strukturaufklärung in der organischen Chemie, 2. aktualisierte Auflage, Pearson Deutschland GmbH, München, S. 488-493
- Lee J.-Y., Kim K.Y., Shin K.Y., Won B.Y., Jung H.Y. und Suh Y.H. (2009), Effects of BT-11 on memory in healthy humans, *454 (2)*: 111-114
- Leistner E. und Breckle S.-W. (2000), Pharmazeutische Biologie – Grundlagen und Systematik, Band 1, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 393
- Lv J., Jia H., Jiang Y., Ruan Y., Liu Z., Yue W., Beyreuther K., Tu P. und Zhang D. (2009), Tenuifolin, an extract derived from tenuigenin, inhibits amyloid-beta secretion in vitro, *Acta Physiologica* 196 (4): 419-25
- Mascotti S. (2014), Erstellung der Monographie Calendulae extractum fluidum sowie Identifizierung von Polygalae radix für das Österreichische Arzneibuch, Diplomarbeit, Universität Wien
- Nagai T., Suzuki Y., Kiyohara H., Susa E., Kato T., Nagamine T., Hagiwara Y., Tamura S., Yabe T., Aizawa C. und Yamada H. (2001), Onjisaponins, from the roots of *Polygala tenuifolia* Willdenow, as effective adjuvants for nasal influenza and diphtheria-pertussis-tetanus vaccines, *Vaccine*, 19: 4824-4834
- Pharmacopoea Europaea (2011), 7. Ausgabe Grundwerk 2011, Amtliche österreichische Ausgabe, Verlag Österreich, S. 1863-1864
- Pharmacopoeia of The People's Republic of China (2010), Band 1, People's Medical Publishing House, S. 342-343
- Rahfeld B. (2009), Mikroskopischer Farbatlas pflanzlicher Drogen, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 242-243

- Rao K.S. und Rajput K.S. (2003), Cambial variants in the roots of *Glinus lotoides* L. and *G. oppositifolius* (L.) A. DC. (Molluginaceae), *Acta Botanica Hungarica* 45 (1-2): 183-191
- Schilcher H., Kammerer S. und Wegener T. (2007), *Leitfaden Phytotherapie*, 3. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, S. 237-238
- Shi T., Li Y., Jiang Y. und Tu P. (2013), Isolation of flavonoids from the aerial parts of *Polygala tenuifolia* Willd. and their antioxidant activities, *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 22: 36-39
- Shin K.Y., Lee J.-Y., Won B.Y., Jung H.Y., Chang K.-A., Koppula S. und Suh Y.-H. (2009), BT-11 is effective for enhancing cognitive functions in the elderly humans, *Neuroscience Letters* 465 (2): 157-159
- Tang W. und Eisenbrand G. (1992), *Chinese Drugs of Plant Origin – Chemistry, Pharmacology and Use in Traditional and Modern Medicine*, *Polygala tenuifolia* Willd., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 781-786
- Teuscher E., Melzig M. F. und Lindequist U. (2012), *Biogene Arzneimittel – Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 251
- Van Wyk B.E., Wink C. und Wink M. (2004), *Handbuch der Arzneipflanzen – Ein illustrierter Leitfaden*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 250
- Wagner H. (1999), *Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe*, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 208
- Wagner H. und Wiesenauer M. (2003), *Phytotherapie – Phytopharmaka und pflanzliche Homöopathika*, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 124
- Wichtl M. [Hrsg], (2009), *Teedrogen und Phytopharmaka – Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage*, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 521-523
- Xue W., Hu J.-F., Yuan Y.H., Sun J.-D., Li B.-Y., Zang D.-M., Li C.-J. und Chen N.-H. (2009), Polygalasaponin XXXII from *Polygala tenuifolia* root improves

hippocampal-dependent learning and memory, *Acta Pharmacologica Sinica* 30:
1211-1219

Zhang H., Han T., Zhang L., Yu C.H., Wan D.G., Rahman K., Qin L.P. und Peng C.
(2008), Effects of tenuifolin extracted from radix polygalae on learning and
memory: a behavioral and biochemical study on aged and amnesic mice,
Phytomedicine 15 (8): 587-94

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Sarah Katharina KUDERER

Staatsbürgerschaft: Österreich

Familienstand: ledig

Ausbildungsgang

1997 – 2001 Volksschule Prückelmayrgasse, Wien

2001 – 2005 Bundesrealgymnasium Anton-Krieger-Gasse, Wien

2005 – 2009 Bundesoberstufenrealgymnasium mit naturwissenschaftlichem
Schwerpunkt, Anton-Krieger-Gasse, Wien

2009 Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

seit 2009 Studium der Pharmazie

09/2013 – 03/2014 Universität Wien, Department Pharmakognosie (Diplomarbeit)

Anhang:

Manuskript "Vibrational spectroscopic discrimination of *Polygala senega*, *Polygala tenuifolia* and *Glinus oppositifolius*"

CREATED USING THE RSC LaTeX PCCP ARTICLE TEMPLATE – SEE www.rsc.org/electronicfiles FOR DETAILS

COMMUNICATION

www.rsc.org/xxxxxx | XXXXXXXX

Vibrational spectroscopic discrimination of *Polygala senega*, *Polygala tenuifolia* and *Glinus oppositifolius*

Cornelia K. Pezzei,^a Oliver M.D. Lutz,^a Sarah Kuderer,^b Brigitte Kopp,^b Günther K. Bonn,^a Christian W. Huck^{a*}

Received Xth XXXXXXXXXX 20XX, Accepted Xth XXXXXXXXXX 20XX

First published on the web Xth XXXXXXXXXX 200X

DOI: 10.1039/b0000000x

The non-invasive discrimination of powdered root material belonging to the *Polygala* genus (i.e. *Polygala senega* and *Polygala tenuifolia*) and an adulterant (i.e. *Glinus oppositifolius*) is presented. The quality of the approach is assessed for attenuated total reflectance mid-infrared spectroscopy and diffuse reflectance near infrared spectroscopy. Due to the pharmaceutical importance of *Polygala* related plant material, conclusions are drawn towards a laboratory independent discrimination of the samples.

Analytical methods employing infrared spectroscopy have become indispensable tools in the field of natural product analysis, rapidly delivering results of high accuracy and robustness^{1–6}.

The *Polygalaceae* family is known to contain pharmaceutically important plants and especially the genus *Polygala* is of medicinal importance as many *Polygala* species are used in folk medicine⁷. Two important medicinal plants of the *Polygala* genus are *Polygala tenuifolia* and *Polygala senega*.

The root of *Polygala tenuifolia* is a well-known traditional Chinese medicine herb and is used as an expectorant, tranquilizer, antipsychotic agent⁸ and for the treatment of neurological disorders like dementia, amnesia and neurasthenia⁹. *Polygalae radix* contains triterpenic saponins, and the dominating compounds are tenuifolin and triterpene saponins with *Polygalacic* acid as sapogenin. Furthermore xanthone derivatives and oligosaccharides can be isolated⁸.

Polygala senega roots show expectorant and antitussive effects and are used to treat chronic bronchitis, cough and tracheitis^{10,11}. Moreover an immunopotentiating activity was proved¹². The root contains up to 12% triterpenic saponins with presenegenin as sapogenin. Further compounds are lipids, xanthone derivatives and oligosaccharides¹¹.

On the European market different *Polygala* adulterants are known. One of these adulterants is *Glinus oppositifolius* (family: *Molluginaceae*) also known as Indian Senega Root¹³ which is applied in Indian medicine for the treatment of skin diseases because of its antiseptic and antidermatitic properties¹⁴.

The aim of this study is to establish a simple and rapid authentication method of *Polygala radix* samples employing commercially available mid- and near-infrared benchtop spectrometers alongside a topical laboratory independent hand-held near-infrared device.

The discrimination models have been set up with 38 reference samples. 24 *Polygala tenuifolia*, 12 *Polygala senega* and 2 *Glinus oppositifolius* root samples have been subjected to mid- and near-infrared analysis. For the mid-infrared measurements at a resolution of 4 cm⁻¹ (1 cm⁻¹ data point interval), a Spectrum 100 spectrometer (Perkin Elmer, Seer Green, United Kingdom), equipped with a universal attenuated total reflectance (uATR) sampling accessory, was operated between 3000 and 650 cm⁻¹, accumulating 16 scans for each spectrum. Near-infrared analysis was performed with a NIRFlex N500 spectrometer (Büchi, Flawil, Switzerland) operated at a resolution of 8 cm⁻¹ (4 cm⁻¹ data point interval). 64 scans have been accumulated for the spectral region between 10000 and 4000 cm⁻¹. The laboratory independent measurements have been realized with a MicroPhazir GP 4.0 (Thermo Scientific, United States of America) which was operated between 6267 and 4173 cm⁻¹ at a resolution of 21 cm⁻¹. For each spectrum, 10 scans have been accumulated. The data pre-treatment and the qualitative cluster analysis were performed with the Unscrambler 10.3 software package (Camo Software AS, Oslo, Norway) employing principal component analysis (PCA) with the non-linear iterative partial least squares algorithm. Every sample was measured in triplicate and during the near-infrared measurements, the sample compartment was rotated by 120° each time in order to average over the coarse grain of the ground samples. Prior to the multivariate analysis, an average spectrum was calculated for each set of replicates.

Besides full cross validation, the discrimination models

^a Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry, University of Innsbruck, Innrain 80-82, 6020 Innsbruck, Austria

^b Department of Pharmacognosy, University of Vienna, Alhansstraße 15, 1090 Vienna, Austria

* Corresponding author: Christian W. Huck Tel: +43 512 507 57304; Fax: +43 512 507 57399; E-mail: christian.w.huck@uibk.ac.at

were validated with two double-blind samples. After the spectroscopic analysis, the two double-blind samples were identified as *Polygala senega* root material via thin layer chromatography¹⁵.

Bench-top near-infrared As data pretreatment, full multiplicative scatter correction and a 2nd derivative with nine smoothing points was employed. The spectral region >6150 cm⁻¹ was excluded from multivariate analysis due to the absence of significant absorptions. The inter-spectral variance is optimally described with five latent variables of which the first, third and fifth variables have been found to correlate with the investigated problem. Figure 1 shows the three-dimensional score plot, indicating appropriate clustering of the samples. The two double-blind samples were correctly ascribed to the *Polygala senega* cluster. Apparently, the different grain size of the samples is sufficiently well accounted for by rotating the sample cuvette and by multiplicative scatter correction.

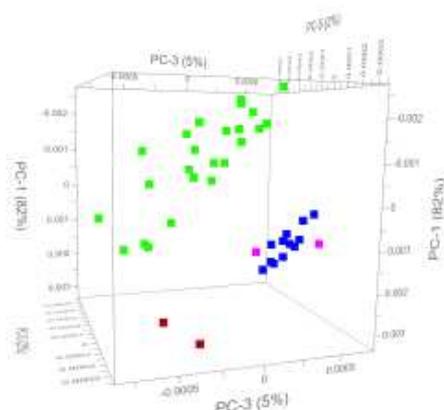


Fig. 1 PCA score plot obtained with the bench-top near-infrared spectrometer. Green: *Polygala tenuifolia*, blue: *Polygala senega*, red: *Glinus oppositifolius*, pink: double-blind samples.

Bench-top mid-infrared Since the samples were pressed firmly onto the uATR sampling accessory, the influence of the grain size can be considered to be of subordinate importance in this approach. Hence, only a 2nd derivative with 21 smoothing points was employed for the selected wavenumber regions 3000 - 2666 cm⁻¹ and 1864 - 650 cm⁻¹. The region between 2665 and 1865 cm⁻¹ was excluded due to the absence of absorption bands and the fact that the spectrometer's deuterated triglycine sulfate detector exhibits an impaired signal-to-noise ratio in this region. Figure 2 attests an inferior quality to the mid-infrared derived score plot, especially considering that

one outlier has been excluded from the sample group. While the two double-blind samples were correctly assigned to the *Polygala senega* cluster, the *Polygala tenuifolia* samples are distributed largely over the score plot. For the fact that also the near-infrared derived score plot (Figure 1) exhibits a wide distribution of the *Polygala tenuifolia* samples, the grain size may be ruled out from having a significant influence on the qualitative cluster analysis. Since the ATR technique inherently defines the penetration depth of the incident light, an impaired performance of this mid-infrared based approach seems plausible, especially considering that near-infrared light *per se* allows for a larger sample thickness due to the higher energy.

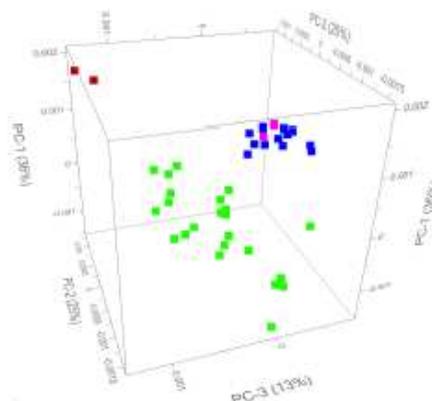


Fig. 2 PCA score plot obtained with the bench-top mid-infrared spectrometer. Green: *Polygala tenuifolia*, blue: *Polygala senega*, red: *Glinus oppositifolius*, pink: double-blind samples.

Mobile near-infrared As a consequence of the promising performance of the bench-top near-infrared spectrometer, a commercially available mobile device was employed to investigate the in-field applicability of the approach. The principal component analysis in Figure 3 is based on spectra that have been subjected to multiplicative scatter correction and a 2nd derivative with 5 smoothing points. Considering the lower resolution and the limited spectral region, the most important spectral features necessary for a successful discrimination still seem to be captured with success. The absorption features responsible for the discrimination are summarized in Table 1 and have been identified from the loadings plots that were obtained during principal component analysis.

Since the distribution of the *Polygala tenuifolia* samples is much more evident as observed for the benchtop NIR score plot, more samples would be required until definitive conclusion can be drawn towards applicability of the mobile appliance. As a tentative indicator of the discrimination's plausi-

Table 1 Characteristic absorption features responsible for the successful discrimination of the samples

Band center	Assignment	Functionality
4240 cm^{-1}	$3-\delta_{\text{CH}}$	R-CHOH-R'
4260 cm^{-1}	$\nu_{\text{CH}_2, \text{r}} + \delta_{\text{CH}_2}$	R-CH=CH ₂
4300 cm^{-1}	$\nu_{\text{CH}_2, \text{as}} + \delta_{\text{CH}_2}$	R-CH=CH ₂
4340 cm^{-1}	$\nu_{\text{NH}} + \delta_{\text{CH}_2}$	R-CH ₂ -NH-R'

bility, however, the two double-blind samples could still be ascribed to the appropriate group successfully.

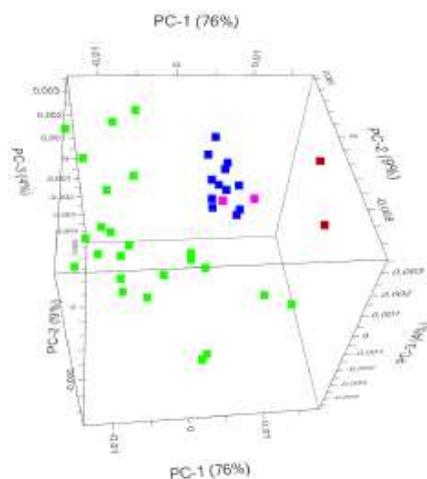


Fig. 3 PCA score plot obtained for the mobile near-infrared spectrometer. Green: *Polygala tenuifolia*, blue: *Polygala senega*, red: *Glinus oppositifolius*, pink: double-blind samples.

From the data presented, it is concluded that a non-invasive discrimination of the two important *Polygala* species and an adulterant is plausible when employing spectroscopic techniques. Even though the data obtained with the mobile near-infrared spectrometer is less precise, the recent development of microchip-based infrared sensors¹⁶ can be considered an important step towards reliable laboratory independent identification of pharmaceutically relevant herbs. Moreover, such mobile devices are currently being applied in industrially relevant qualitative² and quantitative^{1,17} contexts, emphasizing the demand for in-field spectroscopic techniques.

Acknowledgments

Special thanks are given to Bionorica SE (Prof. Popp, Dr. Krolizek; Neumarkt/Oberpfalz, Germany), the Ministry for Science and Research and the Ministry for Health, Family

and Youth (Vienna, Austria) (Novel analytical tools for quality control of immunomodulatory, anti-inflammatory and neuro-protective agents in Traditional Chinese Medicine).

References

- 1 M. Alcalá, M. Blanco, D. Moyano, N. Broad, N. O'Brien, D. Friedrich, F. Pfeifer and H. Siesler, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2013, **21**, 445 – 457.
- 2 N. O'Brien, C. Hulse, F. Pfeifer and H. Siesler, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2013, **21**, 299 – 305.
- 3 M. Popp, G. Bonn, C. Huck and W. Guggenbichler, *Method for classifying wine and coffee*, 2003, WO Patent App. PCT/EP2002/004,988.
- 4 M. Schmutzler and C. W. Huck, *Vibrational Spectroscopy*, 2014, **72**, 97 – 104.
- 5 I. M. Reid, C. P. O'Donnell and G. Downey, *Trends in Food Science & Technology*, 2006, **17**, 344 – 353.
- 6 B. M. Nicola, K. Beulens, E. Bobelyn, A. Peirs, W. Saeys, K. I. Theron and J. Lammertyn, *Postharvest Biology and Technology*, 2007, **46**, 99 – 118.
- 7 L. C. Klein Júnior, S. Faloni de Andrade and V. C. Filho, *Chemistry and Biodiversity*, 2012, **9**, 181 – 209.
- 8 W. Tang and G. Eisenbrand, *Pharmacology, Toxicology*, 2011, **2**, 919 – 922.
- 9 H.-M. Chang, P. P. But, S.-C. Yao, L. Wang and S. Yeung, *book reviews*, 2000, **1**, 174 – 177.
- 10 E. Steinegger and R. Hänsel, *Pharmakognosie*, Springer, pp. 212 – 213.
- 11 M. Wichtl, J. A. Brinckmann and M. P. Lindenmaier, *Schweizer Zeitschrift für Ganzheitsmedizin*, 2002, **4**, 464 – 466.
- 12 A. Estrada, G. S. Katselis, B. Laarveld and B. Barl, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2000, **23**, 27 – 43.
- 13 R. Hegnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Springer, 1964, pp. 30 – 35.
- 14 B. N. Sastri, *The wealth of India, raw materials, Council of scientific and industrial research*, New Delhi, 1962, vol. 6, pp. 396 – 397.
- 15 S. Kuderer, *Wissenschaftliche Erstellung der Monographie Polygalae extractum fluidum fr das österreichische Arzneibuch*, Diploma thesis, University of Vienna, 2014.
- 16 N. A. O'Brien, C. A. Hulse, D. M. Friedrich, F. J. V. Milligen, M. K. von Gunten, F. Pfeifer and H. W. Siesler, *SPIE DSS 2012, Baltimore, Maryland*, 2012.
- 17 O. M. Lutz, G. K. Bonn, B. M. Rode and C. W. Huck, *Analytica Chimica Acta*, 2014, **826**, 61 – 68.

