



universität  
wien

## DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Überarbeitung der ÖAB Monographie ‚Eingestellter Süßholzwurzelfluidextrakt‘ inklusive Methodvalidierung der Prüfung auf Ochratoxin A des Europäischen Arzneibuchs für die österreichische Monographie“

verfasst von / submitted by

Marie Mezzgolits

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

Wien, 2017 / Vienna, 2017

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

A 449

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

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ernst Urban

## *Danksagung*

Zu allererst möchte ich mich recht herzlich bei Herrn ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ernst Urban und Frau Mag. Dr. Julia Moessler für ihre beispiellose Betreuung und ihren Einsatz bedanken. Die beiden haben mir nicht nur eine tolle Diplomarbeitsstelle bei der AGES ermöglicht, ich konnte auch während der gesamten Zeit immer auf ihre tatkräftige Unterstützung und ein offenes Ohr für all meine Fragen und Sorgen bauen.

Als nächstes bedanke ich mich bei Herrn Mag. Roman Macas und Herrn DI Thomas Lang von der Abteilung für Medizinmarktaufsicht der AGES, die meine praktische Arbeit vor Ort betreut haben und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Verfügung standen. Ebenso bei allen Mitarbeitern der MEA dafür, dass ich vom ersten Tag an Teil eines wundervollen Teams sein durfte.

Mein ganz besonderer Dank gilt selbstverständlich meiner Familie sowie meinen Freunden und Studienkollegen, die während des gesamten Studiums für mich da waren und mir moralischen sowie seelischen Beistand geleistet haben. Meiner Mutter, Elisabeth Pacher, die mich immer motiviert hat, an mich selbst zu glauben und mir stets den Rücken gestärkt hat und meinem Stiefvater, Johann Pacher, möchte ich für ihr Engagement danken. Meinem Freund, Jacques Foric, möchte ich dafür danken, dass er mir während der letzten Jahre immer zur Seite gestanden ist und stets für mich da war.

Und zu guter Letzt bedanke ich mich insbesondere bei Alexander Franz Perhal, Corina Nermuth, Iris Hörner, Nicole Rammesmayr und Petra Köfinger – Studienkollegen und –Kolleginnen, die im Laufe der Jahre zu sehr engen Freunden wurden und ohne die ich das Alles nie geschafft hätte. Danke für die tolle Studienzeit!

## Inhaltsverzeichnis

<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
1.1. SÜßHOLZWURZEL.....	5
1.1.1. <i>Botanische Beschreibung</i> .....	5
1.1.2. <i>Stammpflanzen und verwendete Pflanzenteile</i> .....	5
1.1.2. <i>Inhaltsstoffe und pharmazeutische Verwendung von Süßholzwurzel</i> .....	6
1.1.3. <i>Marktsituation in Österreich</i> .....	8
1.2. MONOGRAPHIEN IM VERGLEICH.....	9
1.2.1. <i>Derzeitige ÖAB Monographie</i> .....	9
1.2.2. <i>Vergleich mit dem Europäischen Arzneibuch</i> .....	9
1.3. OCHRATOXIN A .....	11
1.3.1. <i>Eigenschaften und Vorkommen</i> .....	11
1.3.2. <i>Toxizität des Mycotoxins</i> .....	12
1.3.3. <i>Mechanismen der Toxizität</i> .....	13
<b>2. FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>14</b>
<b>3. HAUPTTEIL - METHODENVALIDIERUNG</b> .....	<b>16</b>
3.1. VORBEREITUNG .....	16
3.1.1. <i>Qualifizierung des Fluoreszenzdetektors</i> .....	16
3.1.2. <i>Säulentest zur Überprüfung der Trennleistung</i> .....	19
3.2. AUSWAHL DER PRÜFFPARAMETER FÜR DIE VALIDIERUNG .....	22
3.2.1. <i>Richtigkeit</i> .....	24
3.2.2. <i>Präzision</i> .....	24
3.2.3. <i>Spezifität</i> .....	25
3.2.4. <i>Nachweis- und Bestimmungsgrenze</i> .....	25
3.2.5. <i>Linearität</i> .....	26
3.2.6. <i>Dynamischer Messbereich</i> .....	26
3.2.7. <i>Robustheit</i> .....	26
3.3. VORBEREITUNGSSCHRITTE .....	27
3.3.1. <i>Vorbereitung der Glasgeräte</i> .....	27
3.3.2. <i>Benötigte Reagentien</i> .....	27
3.3.3. <i>Probenvorbereitung</i> .....	28
3.3.4. <i>Dekontamination der Glasgeräte</i> .....	30
3.4. DURCHFÜHRUNG DER VALIDIERUNG .....	30
3.4.1. <i>Richtigkeit</i> .....	30
3.4.2. <i>Präzision</i> .....	31
3.4.3. <i>Spezifität</i> .....	32
3.4.4. <i>Nachweis- und Bestimmungsgrenze</i> .....	33
3.4.5. <i>Linearität</i> .....	34
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>36</b>
4.1. ERGEBNISSE DER VALIDIERUNG .....	36
4.1.1. <i>Richtigkeit</i> .....	36
4.1.2. <i>Spezifität</i> .....	39
4.1.3. <i>Nachweis- und Bestimmungsgrenze</i> .....	41
4.1.4. <i>Präzision</i> .....	43
4.1.5. <i>Linearität</i> .....	46
4.2. ZUSAMMENFASSUNG DER VALIDIERUNGSERGEBNISSE .....	47
4.3. GESAMTBEURTEILUNG DER METHODENVALIDIERUNG .....	47
<b>5. DISKUSSION</b> .....	<b>48</b>
5.1. DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	48

5.2. GRENZWERTFINDUNG.....	50
5.2.1. Allgemeines .....	50
5.2.2. Grenzwert des Ausgangsmaterials und Herstellung des Extraktes.....	52
5.2.3. Entscheidung der ÖAB-Expertengruppe.....	53
5.3. WEITERE ANPASSUNGEN DER MONOGRAPHIE .....	54
5.3.1. Korrektur der Bezeichnung des Extrakttyps .....	54
5.3.2. Relative Dichte .....	55
5.3.3. Trockenrückstand .....	55
5.4. NEUE MONOGRAPHIE .....	55
5.5. FAZIT .....	59
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>60</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>61</b>
<b>6. ANHANG.....</b>	<b>62</b>
<b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>70</b>
<b>8. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>72</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Süßholzwurzel

#### 1.1.1. Botanische Beschreibung

Das Süßholz (*Glycyrrhiza glabra* L.) aus der Familie der Hülsenfrüchtler (*Fabaceae*), einer Unterfamilie der Schmetterlingsblütler (*Fabales*,) ist eine häufig verwendete Arzneipflanze. Die holzige, mehrjährige Staude, welche vor allem im Mittelmeerraum beheimatet ist, trägt zahlreiche unpaarig gefiederte, dunkelgrüne Fiederblätter. Die typischen Schmetterlingsblüten sind meist blauviolett gefärbt.<sup>i</sup>



Abbildung 1 zeigt den Blütenstand von Süßholz, besonders auffällig sind die zygomorphen weiß bis violett gefärbten Blüten in kurzen, aufstehenden Ähren.

Im Hintergrund sind die für Hülsenfrüchtler typischen unpaarig gefiederten Blätter zu sehen. Die Staude ist hauptsächlich im Mittelmeerraum sowie in Asien, unter anderem in Russland und China heimisch.<sup>ii</sup>

Abb. 1 – Blütenstand von Süßholz (*Glycyrrhiza glabra*)<sup>iii</sup>

#### 1.1.2. Stammpflanzen und verwendete Pflanzenteile

Zu arzneilichen Zwecken, aber auch in der Lebensmittelindustrie werden die getrockneten Wurzeln und Ausläufer des Süßholzes (*Liquiritiae radix*, Ph.Eur.) verwendet. Diese werden in geschältem oder ungeschältem Zustand, meist geschnitten, eingesetzt. Gemäß dem europäischen Arzneibuch sind für die medizinische Verwendung drei verschiedene Stammpflanzen, *Glycyrrhiza glabra* L., *Glycyrrhiza inflata* Batalin und *Glycyrrhiza uralensis* Fisch zulässig.<sup>iv</sup>

Die Süßholzwurzel weist einen intensiv-süßlichen Geschmack auf, weshalb sie sehr häufig als Geschmackskorrigens in Teemischungen und -zubereitungen eingesetzt wird, oder auch in Form eines Trockenextraktes in vielen Arzneispezialitäten zu finden ist. Wird die pflanzliche Droge ausgekocht und eingedickt, erhält man den Süßholz- oder Lakritzensaft, welcher zu der weltweit bekannten Süßigkeit Lakritze weiterverarbeitet wird.

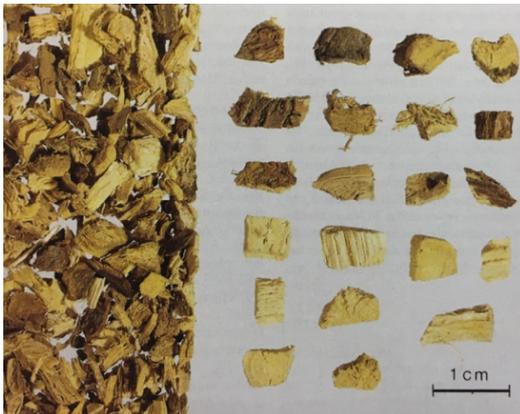


Abbildung 2 zeigt die Schnittdroge *Liquiritiae radix*. Rechts oben ist die ungeschälte Droge mit einer dünnen graubraunen Korksicht zu sehen, rechts unten in geschälter Form.

Die Wurzeln und Ausläufer sind grob würfelig geschnitten, besonders charakteristisch sind der intensiv-süßliche Geschmack, sowie der radiale zitronengelbe Holzkörper.<sup>v</sup>

Abb. 2 – Süßholzwurzel getrocknet und geschnitten<sup>vi</sup>

### 1.1.2. Inhaltsstoffe und pharmazeutische Verwendung von Süßholzwurzel

Süßholzwurzel enthält eine Vielzahl an pharmakologisch interessanten Inhaltsstoffen. Neben den wirksamkeitsbestimmenden Triterpensaponinen, wie etwa der Glycyrrhizinsäure, und Flavonoiden bzw. Isoflavonoiden, beispielsweise Liquiritin und Isoliquiritin, beinhaltet sie Polysaccharide, Sterine und Cumarinderivate.<sup>vii</sup> Als Teedroge oder als Fluidextrakt in zahlreichen Phytopharmaka wird Süßholzwurzel vor allem bei Katarrhen der oberen Atemwege, sowie bei Magenbeschwerden oder Zwölffingerdarmgeschwüren eingesetzt. Man findet sie daher häufig als Komponente in Erkältungs- und Hustenmitteln sowie in Magentees und Ulcuspräparaten. Auch gegen Infektionen mit dem problematischen Keim *Helikobakter pylori*, der

unbehandelt das Risiko für eine Erkrankung an Magenkrebs stark erhöht, wird sie sehr erfolgreich unterstützend in Kombination mit diversen Antibiotika eingesetzt.<sup>viii, ix</sup>

Den für die Wirkung entscheidenden Inhaltsstoff stellt dabei die 18 $\beta$ -Glycyrrhizinsäure dar, ein pentacyclisches Triterpen, das in Position 3 mit 2 Molekülen D-Glucuronsäure glykosiliert in der Pflanze vorliegt. Das Aglykon, also der Grundkörper ohne Zuckerreste, wird als „Glycyrrhetin“ bezeichnet; die Glycyrrhizinsäure selbst liegt oft als Kalium- oder Calciumsalz vor und wird in dieser Form „Glycyrrhizin“ genannt.

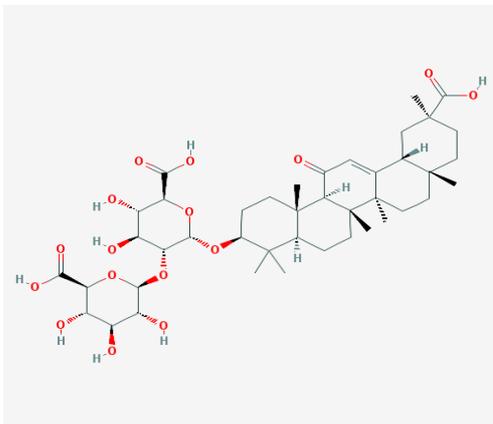


Abbildung 3 zeigt die Strukturformel der 18 $\beta$ -Glycyrrhizinsäure, welche für die schleimlösende und auswurfördernde Wirkung von Süßholz verantwortlich ist.

Das Triterpen, welches aus 5 Ringen besteht, liegt in der Pflanze glycoisidisch gebunden vor.

Abb. 3 – Strukturformel der Glycyrrhizinsäure<sup>x</sup>

Neben einer Süßkraft (eine dimensionslose Zahl, welche die Intensität des süßen Geschmacks einer Substanz im Vergleich zu Saccharose mit einer Süßkraft von 1 angibt) von 150, weist Glycyrrhetin saponinartige Eigenschaften und somit eine expektorierende und sekretolytische Wirkung auf die Bronchialschleimhaut auf. Dadurch wird das Abhusten von zähem Schleim während Erkältungen oder grippalen Infekten deutlich erleichtert.<sup>xi</sup>

Da die 18 $\beta$ -Glycyrrhizinsäure einen so wichtigen Inhaltsstoff der Süßholzwurzel darstellt, wird laut Arzneibuch ein Gehalt von mindestens 4,0%, bezogen auf die getrocknete Droge, gefordert.<sup>xii</sup> Weitere Inhaltsstoffe der Süßholzwurzel, hauptsächlich Flavonoide, wirken zusätzlich protektiv auf die Magenschleimhaut und begünstigen dadurch das Abheilen von Magengeschwüren.<sup>xiii</sup>

### 1.1.3. Marktsituation in Österreich

Derzeit gibt es eine Vielzahl an Arzneispezialitäten in Österreich, welche Süßholzwurzelfluidextrakt als wirksamen Bestandteil oder auch als Geschmackskorrigens enthalten. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über in der Austria Codex Fachinformation aufscheinende Produkte mit Süßholzwurzelfluidextrakt:

<i>Kräuter-Hustensaft</i>	<i>Apotheker Wimmers Hustensaft</i>
<i>Solvopulmin schleimlösender Kinderhustensaft</i>	<i>Apotheker Auer's Bronchitis-Elixier Husten-Saft</i>
<i>Mixtura solvens</i>	<i>Apotheker Auer's Bronchialtropfen</i>
<i>Mixtura solvens forte</i>	<i>Plantosyl Hustentropfen</i>
<i>Sidroga 1-2-3 Husten &amp; Bronchial Teeaufgusspulver</i>	<i>Schwedischer Kräuterbitter Apotheke zum Rothen Krebs *)</i>
<i>Mönchkirchner Bronchialsirup</i>	<i>Schwedenbitter Apotheke Rosenauer *)</i>
<i>Ischler Hustentropfen für Erwachsene</i>	<i>Schwedentropfen *)</i>
<i>Gebirgskräuter Bronchitis Elixier</i>	<i>Iberogast Flüssigkeit zum Einnehmen *)</i>

Tab. 1 - Spezialitäten mit Süßholzwurzelfluidextrakt, Daten aus der Austria Codex Fachinformation

Die meisten der oben genannten Präparate werden bei Erkältungskrankheiten oder grippalen Infekten, vorwiegend zum Abhusten des zähen Schleims, eingesetzt. Die mit \*) gekennzeichneten Spezialitäten werden dagegen typischerweise bei Magenbeschwerden, beispielsweise Gastritis oder Unwohlsein, Übelkeit etc., verwendet.

## 1.2. Monographien im Vergleich

### 1.2.1. Derzeitige ÖAB Monographie

Das österreichische Arzneibuch (ÖAB) beinhaltet momentan (Stand ÖAB 2015) die Monographie *Eingestellter Süßholzwurzelfluidextrakt*. Der derzeitige Text beinhaltet folgende Punkte:

- Definition: Fluidextrakt aus *Liquiritiae radix* (0277)
- Herstellung: Gemäß *Extracta* (0765) durch Extraktion der Droge mittels Ethanol, Wasser und Ammoniak
- Eigenschaften: Dunkelbraune, klare oder schwach trübe Flüssigkeit, Geschmack süß
- Prüfung auf Identität mittels Dünnschichtchromatographie einer zuvor gemäß der Vorschrift hergestellten Untersuchungslösung unter der Verwendung von Glycyrrhetinsäure und Thymol als Referenzsubstanzen
- Prüfung auf Reinheit:

Ethanolgehalt	10-25% (V/V)
relative Dichte	1,05-1,10
pH-Wert	4,5-7,0
Methanol	höchstens 0,05% (V/V)
2-Propanol	höchstens 0,05% (V/V)
Trockenrückstand	mindestens 20,0% (m/m)
- Gehaltsbestimmung mittels Flüssigchromatographie einer zuvor hergestellten Untersuchungslösung mit Monoammoniumglycyrrhizinat CRS als Referenzsubstanz

### 1.2.2. Vergleich mit dem Europäischen Arzneibuch

Neben den derzeitigen Monographien *Süßholzwurzel* und *Süßholzwurzeltrockenextrakt* aus dem Europäischen Arzneibuch (*Pharmacopoeia europea, Ph.Eur.*) gab es bis vor kurzem noch die Monographie *Eingestellter, ethanolischer Süßholzwurzelfluidextrakt*, welche der ÖAB Monographie sehr ähnlich war. Die beiden Texte unterscheiden sich

jedoch in der Reinheitsprüfung durch den Test auf Ochratoxin A, welcher im Österreichischen Arzneibuch nicht gefordert ist.

	Ph.Eur. 8.0/1536	ÖAB 2015
<i>Bezeichnung des Extraktes</i>	Der aus Süßholzwurzel ( <i>Liquiritiae radix</i> ) hergestellte, eingestellte, ethanolische Fluidextrakt	Der aus <i>Liquiritiae radix</i> hergestellte, eingestellte Fluidextrakt
<i>Herstellung</i>	Mit 70% (V/V) <i>Ethanol</i> mittels geeignetem Verfahren aus der pflanzlichen Droge hergestellt	Gemäß <i>Extracta</i> (0765) aus der Droge durch Extraktion mit <i>Ethanol</i> , <i>Wasser und Ammoniak</i> hergestellt
<i>Gehalt</i>	3-5% 18 $\beta$ -Glycyrrhizinsäure	0,6-1,7% Glycyrrhizinsäure

Tab. 2 - Vergleich der Arzneibuchmonographien: links die obsoleete Ph.Eur. Monographie, rechts jene aus dem ÖAB

Tabelle 2 stellt die bereits gestrichene Monographie zu Süßholzwurzelfluidextrakt des Ph.Eur. jener aus dem ÖAB gegenüber. Die gewonnenen Extrakte unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Herstellungsmethode, Zusammensetzung der Extraktionsmittel, sowie in der Konzentration an Glycyrrhizinsäure, welche standardisiert werden soll. Trotz dieser kleinen Unterschiede kann man davon ausgehen, dass die Inhaltstoffspektren der gewonnenen Produkte miteinander vergleichbar sind. Dies gilt allerdings nicht nur für arzneilich wirksame Komponenten, sondern auch für potentiell schädigende Substanzen.

Während das europäische Arzneibuch im Rahmen der Prüfung auf Reinheit für sämtliche Zubereitungen aus Süßholzwurzel, sowie für deren Ausgangsmaterial, die pflanzliche Droge selbst, die Methode *Bestimmung von Ochratoxin A in pflanzlichen Drogen* (Ph.Eur. 2.8.22) vorschreibt, findet man im ÖAB keine solche Vorschrift. Da allerdings die Süßholzwurzel, wie alle Wurzelrogen, sehr anfällig für den Befall mit Pilzen und Mikroorganismen ist und in diesem Zusammenhang besonders häufig eine Kontamination mit Ochratoxin nachgewiesen werden kann, sollte nicht nur die Droge selbst, sondern auch alle daraus gewonnenen Zubereitungen auf das gefährliche Mykotoxin getestet werden

## 1.3. Ochratoxin A

### 1.3.1. Eigenschaften und Vorkommen

Gemeinsam mit 5 anderen Verbindungen, Ochratoxin B und C, Viomellein, Xanthomegnin und Viriditoxin, bildet Ochratoxin A eine Gruppe von Mykotoxinen, also eine von Pilzen gebildeten Giftstoffen. Der Grundkörper der Ochratoxine besteht aus aus fünf Acetateinheiten, sie werden daher zu den Pentaketiden gezählt.

Die farblose, hitzestabile Substanz Ochratoxin A wird von verschiedenen Aspergillus-Arten (hauptsächlich *Aspergillus ochraeus*), sowie Penicillium-Arten (vorrangig *Penicillium verrucosum*) produziert.<sup>xiv</sup>

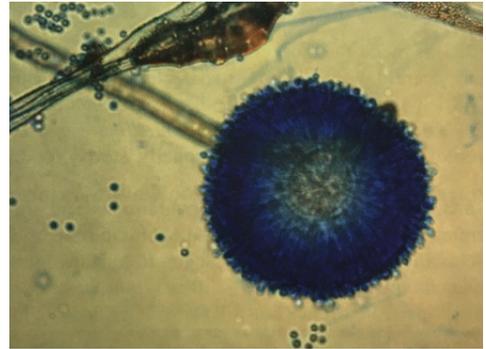


Abb. 4 – *Aspergillus ochraeus* im Lichtmikroskop, 400x vergrößert<sup>xv</sup>

Viele Lebensmittel wie Getreide, Hülsenfrüchte, Kaffeebohnen, Wein, Rosinen und anderen Trockenfrüchte oder Bier können mit Ochratoxin A belastet sein. Aufgrund seiner hohen Stabilität wird das Toxin kaum abgebaut und daher über die Nahrungskette weitergereicht. So kann, je nach Belastung des Tierfutters, das Pilzgift auch in Hühner- oder Schweinefleisch übergehen.

*Mais*<sup>xvi</sup>

Rindfleisch hingegen ist kaum betroffen, da die Substanz im Pansen mikrobiell abgebaut wird.<sup>xvii</sup> Auch die Süßholzwurzel kann häufig mit Ochratoxin A kontaminiert sein. Da die Verbindung in Ethanol gut löslich ist, geht sie bei der während der Extraktion mit Ethanol-Wasser-Mischungen in die hergestellten Extrakte über. Aufgrund der hohen Stabilität gegenüber Hitze und der guten Wasserlöslichkeit von Ochratoxinsalzen, gelangt das Toxin ebenfalls in Teezubereitungen, die Süßholzwurzel beinhalten.



Abb. 5 – mit *Penicillium* befallener

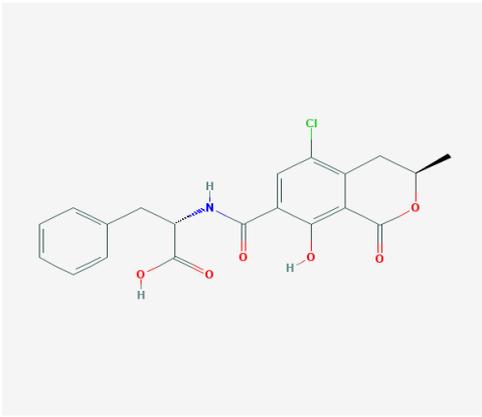


Abb. 6 – Strukturformel von Ochratoxin A<sup>xviii</sup>

Abbildung 6 stellt die chemische Struktur des Mykotoxins dar, welches häufig in Süßholzwurzel und den daraus gewonnenen Zubereitungen zu finden ist. Ochratoxin A ist gut in Ethanol löslich und zeigt bei Anregung mit 360 nm eine blaue Fluoreszenz, die es ermöglicht, OTA sehr empfindlich mittels Fluoreszenzdetektor zu detektieren.

### 1.3.2. Toxizität des Mycotoxins

Zahlreiche Studien zeigen, dass Ochratoxin A diverse toxische Effekte auf verschiedene Tierarten aufweist. Das Toxin wirkt unter anderem nephrotoxisch, teratogen und immunotoxisch.<sup>xix</sup> Beispielsweise kam es bei Schweinen und Hühnern nach der Aufnahme von OTA zu Nephropathien und bei männlichen und weiblichen Ratten traten vermehrt Lebertumore auf, bei weiblichen Ratten wurde ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von OTA und dem Auftreten von Nierentumoren sowie Brustdrüsentumoren festgestellt.<sup>xx,xxi</sup> Obwohl es derzeit kaum Studien über die Humantoxizität von Ochratoxin A gibt, wird vermutet, dass es auch für den Menschen gesundheitsgefährdend ist, da sich die Substanz nach peroraler Aufnahme besonders im Nierengewebe anreichert und mit einer Halbwertszeit von über 35 Tagen sehr lange im Blut nachweisbar bleibt.<sup>xxii</sup>

In der Niere kommt es zur Degeneration von Endothelzellen des proximalen Tubulus und zur interstitiellen Fibrose, also Vernarbung des Nierengewebes, und es tritt Polyurie auf.<sup>xxiii</sup>

Die *International Agency for the Research of Cancer*, IARC, stuft OTA als Karzinogen der Stufe 2B ein, also als eine Substanz, die für Menschen als potentiell karzinogen gilt.<sup>xxiv</sup>

Lange Zeit wurde OTA als Ursache der Balkan-Nephropathie verdächtigt, einer mysteriösen Erkrankung, die erstmals um 1950 in Bosnien, Bulgarien, Kroatien, Rumänien und Serbien auftrat. Es handelt sich dabei um eine Form der chronischen interstitiellen Nephritis mit einschleichendem Beginn und langsamem Fortschreiten bis

zum Nierenversagen ohne Zusammenhang mit Bluthochdruck oder Natriumretention.<sup>xxv</sup>

Auch die *European Food and Safety Agency*, EFSA, geht davon aus, dass Ochratoxin A vermutlich durch die Bildung von freien Radikalen über zellulären oxidativen Stress nieren-, sowie gentoxisch wirkt und so zur Entstehung von Nieren- und Lebertumoren beitragen kann. Da OTA auch in die Muttermilch übergeht, werden vor allem genauere Expositionsdaten für Säuglinge und Kleinkinder, die als besonders gefährdet für Mykotoxine gelten, gefordert. Im Jahr 2006 hat die EFSA schließlich ein umfassendes Gutachten veröffentlicht, welches zu dem Schluss kommt, dass OTA nach peroraler Aufnahme in der Niere angereichert wird und dort toxisch wirkt.

Als tolerierbare wöchentliche Aufnahmemenge (*TWI, Tolerable Weekly Intake*) an OTA wurden 120 ng/kg Körpergewicht festgelegt, wobei die EFSA davon ausgeht, dass über die Nahrung bereits etwa 15-60 ng/kg Körpergewicht pro Woche aufgenommen werden.<sup>xxvi</sup>

### 1.3.3. Mechanismen der Toxizität

Es gibt bereits zahlreiche Studien, die sich mit den molekularen Mechanismen, denen die Schädlichkeit von OTA zu Grunde liegen, auseinandergesetzt haben. Dabei wurde eine Reihe potentieller Ursachen für Organschäden, vor allem die Leber und die Niere betreffend, identifiziert.

Beispielsweise kommt es aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit der Aminosäure Phenylalanin kompetitiven Hemmung der tRNA-Synthetase und somit zur Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese.<sup>xxvii</sup> Außerdem beeinträchtigt Ochratoxin A die Funktion des Immunsystems auf verschiedenen Ebenen. Die Aktivität und Funktion von NK Zellen (*Natürlichen Killerzellen*) und T-Helferzellen wird gehemmt und die Synthese von Antikörpern, sowie die Produktion von IL-2 (*Interleukin 2*) und die Expression von IL-2 Rezeptoren auf aktivierten T-Lymphozyten stark beeinträchtigt.<sup>xxviii</sup> Das Toxin selbst ist zwar vermutlich nicht gentoxisch, jedoch entstehen durch oxidative Dechlorierung Chinone und Hydrochinone, welche DNA-Addukte bilden können und so Einzelstrangbrüche verursachen.<sup>xxix</sup> Des Weiteren gelten die Störung der

Calciumhomöostase sowie die Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung als wichtige Mechanismen der Toxizität von Ochratoxin A.<sup>xxx</sup>

## 2. Fragestellung

Aufgrund der vielen Studienergebnisse, die alle zu dem selben Schluss kommen – dass Ochratoxin A nachweislich ein hohes Risiko für die Gesundheit darstellt und die tägliche Zufuhr damit kontaminierter Lebens- sowie Arzneimittel unbedingt reduziert und kontrolliert werden sollte – besteht hinsichtlich der ÖAB Monographie *eingestellter Süßholzwurzelfluidextrakt*, in welcher der Ochratoxin A-Gehalt nicht geregelt ist, dringender Handlungsbedarf.

In Österreich sind derzeit 9 Fertigprodukte sowie 5 apothekeneigene Spezialitäten mit Süßholzwurzelfluidextrakt am Markt (Stand Mai 2016, Daten aus der Austria Codex Fachinformation), ebenso wird der Extrakt in häufig verwendeten magistralen Zubereitungen wie zum Beispiel der *Mixtura solvens* eingesetzt.

Ist der Gehalt an Ochratoxin im Süßholzwurzelfluidextrakt nicht geregelt, so kann dies Patienten einem gesundheitlichen Risiko aussetzen. Folglich ist daher ist eine Anpassung der Monographie, insbesondere eine Erweiterung der Prüfungen auf Reinheit um einen Test auf Ochratoxin A zwingend erforderlich.

Diese Maßnahme dient dazu, um bei neuen und bestehenden Präparaten, sowie magistralen Zubereitungen auf dem Markt eine maximale Patientensicherheit zu gewährleisten, in Respekt auf den aktuellsten Stand wissenschaftlicher Erkenntnisse hinsichtlich Ochratoxin A.

Neben diesem gravierenden Grund hinsichtlich Arzneimittelsicherheit besteht ein weiteres Motiv, die Monographie des eingestellten Süßholzwurzelfluidextrakts zu überarbeiten. So ist es beispielsweise Ziel der Expertengruppe der Österreichischen Pharmacopoea (mit welcher die Überarbeitung der Monographie in Zusammenarbeit durchgeführt wurde), die bestehenden Monographien im österreichischen Arzneibuch an den Standard des europäischen anzupassen, dies im Besonderen hinsichtlich der

Prüfmethoden. Für Süßholzwurzel fordert das Europäische Arzneibuch einen Test auf Ochratoxin A, somit ist auch die Aufnahme dieser Überprüfung für die betroffene Monographie dringendst empfehlenswert.

In der Europäischen Pharmacopoea ist bereits eine valide Methode zu der Bestimmung von Ochratoxin A enthalten. Im Hinblick auf die angestrebte Harmonisierung der Methoden wäre es anzustreben, für die Monographie im Österreichischen Arzneibuch ebendiese Methode zu verwenden. Dies hätte den Vorteil, dass sämtliche Süßholzwurzelprodukte, welche im Europäischen oder Österreichischen Arzneibuch aufgeführt sind, mit derselben Methode auf die Verunreinigung mit Ochratoxin überprüft werden können. Ob diese bereits vorhandene Methode aus der Ph.Eur. für den im Österreichischen Arzneibuch enthaltenen eingestellten Süßholzwurzelfluidextrakt anwendbar ist und gänzlich übernommen werden kann, soll unter anderem in dieser Diplomarbeit gezeigt werden; dazu wird im Rahmen dieser Diplomarbeit eine Methodvalidierung durchgeführt. Neben dieser entscheidenden Erweiterung der Monographie werden auch kleine Korrekturen, bzw. Anpassungen der Monographie auf den aktuellsten Standard der EDQM (*European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, die Europäische Arzneibuchkommission*) vorgenommen.

Ziel dieser Diplomarbeit ist es folglich, die alte Monographie „Eingestellter Süßholzwurzelfluidextrakt“ auf eine neue Monographie „Quantifizierter Süßholzwurzelfluidextrakt“ des neuesten Stands anzuheben; Dies sowohl in Bezug auf die aktuellsten Erkenntnisse hinsichtlich Toxizität von Ochratoxin A und auf eine Überprüfung auf Verunreinigung mit ebendiesem, als auch in Anpassung an die Standards des Europäischen Arzneibuchs und der EDQM.

So soll weiterhin in Österreich durch eine Monographie auf dem aktuellsten Stand der Wissenschaft für Süßholzwurzelfluidextrakt eine maximale Rohstoff- und folglich Produkt-bzw. Arzneimittelsicherheit für den Patienten gewährleistet sein.

## 3. Hauptteil - Methodvalidierung

### 3.1. Vorbereitung

Um die Richtigkeit und Genauigkeit der erzielten Messwerte durch die verwendeten Geräte gewährleisten zu können, müssen vor der eigentlichen Validierung noch einige Tests durchgeführt werden. Im Zuge dieser Vorbereitungsschritte wurde der Fluoreszenzdetektor qualifiziert und ein Säulentest an der verwendeten HPLC-Säule durchgeführt. Die folgenden Vorbereitungsschritte wurden nach AGES-internen Vorschriften durchgeführt, welche im Anhang der Diplomarbeit zu finden sind.

#### 3.1.1. Qualifizierung des Fluoreszenzdetektors

Zur Qualifizierung des Fluoreszenzdetektors werden zunächst ein Anregungs- und ein Emissionsscan (ohne Säule) durchgeführt, um die Genauigkeit der Wellenlängen zu überprüfen. Bei diesem Test wird HQ-Wasser (*High Quality*, für die HPLC geeignet) durch den Detektor geleitet, welches bei einer Anregung bei 350 nm ein Emissionsmaximum bei 397 nm zeigen sollte und umgekehrt bei einem Scan mit der Emissionswellenlänge 397 nm ein Anregungsmaximum von 350 nm (*Raman-Signal* von Wasser). Anschließend soll die Empfindlichkeit des Detektors mittels Chininlösung überprüft werden.

##### 3.1.1.1. Wellenlängengenauigkeit Anregung

Die Flusszelle wird mit HQ-Wasser gefüllt, gespült und anschließend wird ein „excitation scan“ bei der Anregungswellenlänge 350 nm durchgeführt. In der Emissionskurve wird das Maximum bestimmt und davon 397 abgezogen. Regt man Wasser bei 350 nm an, so liegt sein Emissionsmaximum bei 397 nm. Zieht man nun diesen Soll-Wert vom tatsächlichen Wert ab, so liegt das Ergebnis bei  $\pm 0$ . Die Abweichung darf höchstens  $\pm 3$  nm betragen.

##### 3.1.1.2. Wellenlängengenauigkeit Emission

Die Flusszelle wird wie oben vorbereitet. Dann wird ein „emission scan“ mit der Emissionswellenlänge 397 nm durchgeführt. Hier wird jene Wellenlänge detektiert, die

bei einer Emissionswellenlänge von 397 nm, also dem Emissionsmaximum von Wasser, maximal anregt, also theoretisch 350 nm. Das Anregungsmaximum wird bestimmt und davon 350 abgezogen. Wiederum liegt die erlaubte Abweichung bei  $\pm 3$  nm. *Tabelle 3* fasst die Ergebnisse der Wellenlängengenauigkeit zusammen.

	<i>Anregungsscan</i>	<i>Emissionsscan</i>
<i>Erlaubte Abweichung</i>	$\pm 3$ nm	$\pm 3$ nm
<i>Ergebnis</i>	-2 nm	0 nm

Tab. 3 - Ergebnisse zur Wellenlängengenauigkeit

### 3.1.1.3. Empfindlichkeit des Detektors

Um festzustellen, mit welcher Empfindlichkeit der Detektor ein bestimmtes Signal noch vom Untergrundrauschen unterscheiden kann, wird zunächst eine stark verdünnte Lösung von Chinin-HCl x 2H<sub>2</sub>O (*Chininhydrochlorid-Dihydrat*) mit der Konzentration 15 ppb (*parts per billion*), also umgerechnet 15 µg/L in folgender mobilen Phase hergestellt:

*mobile Phase:* 6,8 g Kaliumdihydrogenphosphat R und 3,0 g Hexylamin R werden in 700 mL Wasser gelöst und mit verdünnter Phosphorsäure R auf einen pH-Wert von 2,8 eingestellt, mit 90 mL Acetonitril versetzt und mit Wasser auf 1000,0 mL aufgefüllt.

*Einwaage:* 15,01 mg Chininhydrochlorid-Dihydrat (entspricht 15 ppb Chinin)

Anschließend wird, unter der Verwendung einer Trennsäule, die nach Vorschrift hergestellte Chininlösung in die HPLC eingespritzt, die Peakhöhe sowie die Retentionszeit  $t_R$  bestimmt und danach mit dem Spektrum einer ebenfalls injizierten Blindlösung, der zuvor bereiteten mobilen Phase, verglichen. Dabei wird die Peakhöhe von Chinin (engl. *signal*, das Signal) im Verhältnis mit dem Hintergrundrauschen (engl. *noise*, das Rauschen) gesetzt und so das sogenannte S/N-Verhältnis (*signal to noise ratio*) ermittelt. Dabei geht man davon aus, dass ein Substanzpeak mindestens dreimal so hoch wie das Rauschen bei der entsprechenden Retentionszeit der Substanz sein

muss. Die Höhe des Rauschens wird dabei mindestens über die fünffache Breite des Substanzpeaks gemessen.<sup>xxx</sup>

*Vorgehensweise:* 10 µL Chininlösung eingespritzt und die Peakhöhe  $H$  messen.  
10 µL mobile Phase (Blindlösung) einspritzen und die Höhe des Rauschens  $h$  bestimmen.

Die Analyse wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Mobile Phase: Pufferlösung, wie oben beschrieben
- Trennsäule: RP-18, 250 x 4,6mm, 5 µm Korngröße
- Flussrate: 1,2 mL/min
- Anregungswellenlänge: 350 nm
- Emissionswellenlänge: 397 nm

*Berechnung:* Die Peakhöhe  $H$  wird durch den dreifachen Wert des Rauschens  $h$  dividiert, dabei erhält man einen Faktor  $F$ . Dividiert man nun wiederum die Konzentration der Chininlösung durch diesen Faktor, so erhält man die Empfindlichkeit des Detektors.

Dabei wird jene Konzentration (in ppb) berechnet, bei der ein theoretischer Peak mit der dreifachen Höhe des Rauschens noch mit ausreichender Sicherheit detektiert werden kann. Man geht davon aus, dass selbst bei sehr geringen Analytkonzentrationen Substanzmenge und Peakhöhe sowie –fläche direkt proportional zueinander sind.

*Peakhöhe Chinin:*  $H = 7,4 \text{ cm}$

*Höhe des Rauschens:*  $h = 0,4 \text{ cm}$

*Faktor:*  $F = \frac{H}{3h} = 6,61$

*Empfindlichkeit des Detektors:*  $\frac{15 \text{ ppb}}{6,61} = 2,43 \text{ ppb}$

*Anforderungen:*  $\leq 3 \text{ ppb}$

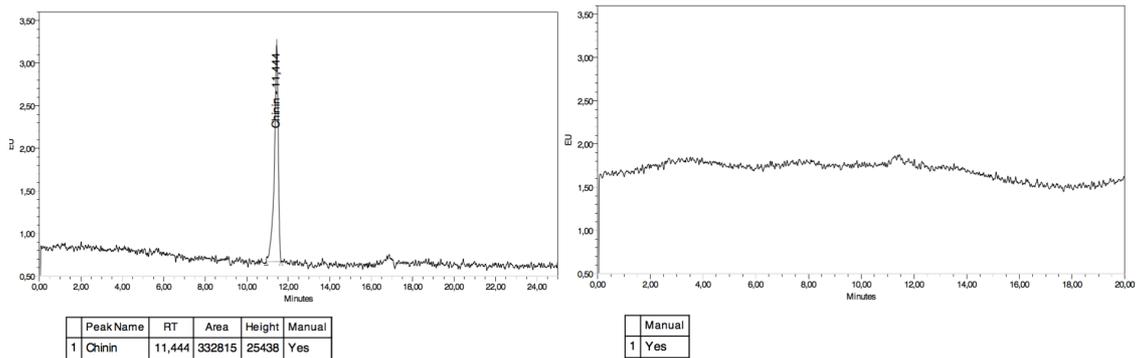


Abb. 7 und 8 – links: Peak von Chinin 15 ppb bei ca. 11,5 min, rechts: Hintergrundrauschen nach Injektion der Blindlösung (Chromatogramme in Originalgröße inkl. Ermittlung der Werte H und h, s. Anhang)

Wie den Abbildungen 7 und 8 zu entnehmen ist, zeigt Chinin einen Peak bei einer Retentionszeit von ca. 11,5 min. Die Blindlösung hingegen zeigt in diesem Bereich keine Peaks.

### 3.1.2. Säulentest zur Überprüfung der Trennleistung

Laut Ph.Eur. 2.8.22 soll zur Durchführung der Prüfung auf Ochratoxin A mittels HPLC eine Säule mit folgenden Eigenschaften verwendet werden:

- stationäre Phase RP-18,
- durchschnittliche Korngröße 5 µm
- Länge und Durchmesser: 150 x 4,6 mm

Um zu gewährleisten, dass die benutzte Säule eine gute Trennung mit entsprechender Auflösung liefert, wird vor der eigentlichen Analyse ein Säulentest durchgeführt. Dazu wird die Säule zunächst mit einer geeigneten mobilen Phase konditioniert und anschließend zur Trennung einer Referenzlösung, die vier Analyten mit unterschiedlich starker Retention enthält, verwendet. Die Referenzlösung muss zunächst aus einer vorgefertigten Stammlösung verdünnt werden. Aus dem erhaltenen Testchromatogramm kann man die Auflösung zwischen den benachbarten Peaks, sowie die Peaksymmetrien der einzelnen Substanzen berechnen.

#### Säulentest

<i>Mobile Phase</i>	60 Teile Acetonitril + 40 Teile HQ-Wasser
<i>Stammlösung</i>	0,3 mL Benzol, 10 mg Naphthalin, 2 mg Biphenyl und 2 mg Anthracen in 100,0 mL Methanol gelöst

<i>Referenzlösung</i>	3 Teile Stammlösung mit Methanol auf 10 Teile aufgefüllt
<i>Säulentemperatur</i>	40°C
<i>Injektionsvolumen</i>	10 µL der Referenzlösung

Tab. 4 - Vorschrift zur Durchführung des Säulentests: Einstellungen und Zusammensetzung der Untersuchungslösung

#### 3.1.2.1. Anforderungen an die Trennsäule

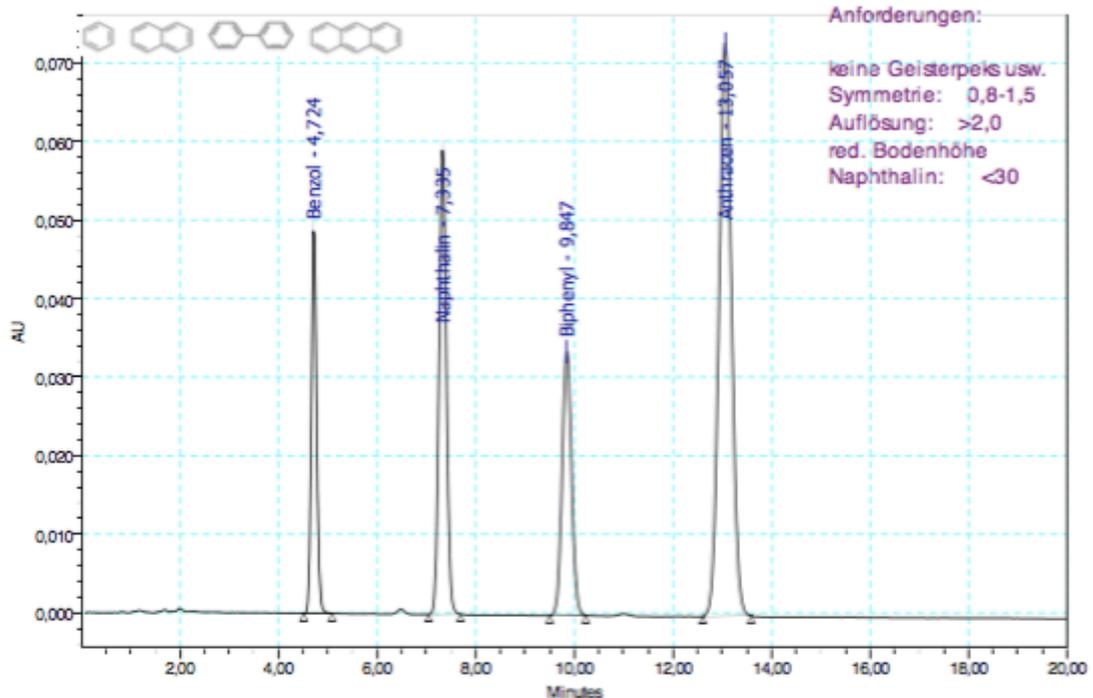
Das Chromatogramm der Referenzlösung soll 4 Signale liefern. Dabei darf die Auflösung zwischen zwei benachbarten Peaks nicht kleiner als 2,0 sein und die Symmetriefaktoren der jeweiligen Peaks müssen im Bereich von 0,8-1,5 liegen (weder Fronting noch Tailing). Außerdem muss auf das Auftreten von etwaigen Unregelmäßigkeiten wie z.B. zusätzliche Peaks oder Geisterpeaks, also Signale, die nicht reproduzierbar sind, geachtet werden.

### 3.1.2.2. Chromatogramm des Säulentests

Bezeichnung: TREN-CAZ33 2016-02-01  
 Position/Vial: 6  
 Injektion: 1  
 SampleWeight 1,0000  
 Injektionsvolumen: 10,0 uL  
 Solvent  
 Volumen\_mm<sup>3</sup> 2492 Porengrösse\_μ 5,0 Länge\_mm 150 ID\_mm 4,6

Art der Probe: Unknown  
 Laufzeit: 50,00 Minutes  
 Dilution 1,0000  
 A btastfrequenz: 1 per sec  
 Bemerkung: Atlantis C18 150 \* 4,6 mm 5μ

Processing Method Id 4380 Wellenlänge: PDA 254,0 nm  
 Auswertungsmethode: Säulentest\_kurz  
 Sample Set/Sequenz:  
 Instrument Method Name 40b60c  
 Projektbezeichnung: MEA Projekte\Säulentest 2015  
 Bemerkung: Atlantis C18 150 \* 4,6 mm 5μ



Bezeichnung: TREN-CAZ33 2016-02-01; Vial/Pos. 6; Injektion 1; injiziert am: 01.02.2016 14:52:31 CET

psi: 560 Maximaldruck\_peak

RT	Name	Fläche	% Fläche	Boden-Zahl	reduzierte Bodenhöhe	Auf-Lösung	Symm.-Faktor	1. Suche Spekt. Name	1. Suche Winkel
1	4,7	Benzol	363401	13,4	9357	3,2	1,08	Benzol (Säulentest 5μ)	11,69
2	7,3	Naphthalin	609051	22,4	11705	2,6	11,23	Naphthalin (5μ; CAZ29)	7,81
3	9,8	Biphenyl	449669	16,5	12521	2,4	8,08	Biphenyl (0,006; 5μ)	1,94
4	13,1	Anthracen	1295158	47,7	12410	2,4	7,84	Anthracen ( 0,006; 5μ)	7,53

Abb. 9 – Chromatogramm der 4 Analyten Benzol, Naphthalin, Biphenyl und Anthracen im Säulentest

Wie *Abbildung 9* zeigt, enthält das Chromatogramm die erwarteten 4 Peaks mit ausreichender Auflösung und Symmetrie, es treten keine zusätzlichen Peaks auf. Die Säule entspricht allen Anforderungen und kann zur Analyse verwendet werden.

### 3.2. Auswahl der Prüfparameter für die Validierung

Nach erfolgreicher Systemtestung wurde festgelegt, wie die Validierung ablaufen soll und vor allem, welche der sogenannten Prüfparameter analysiert werden sollten.

Dafür wurden die *ICH Guidelines Q2 (R1)* zu Rate gezogen. *Tabelle 5* zeigt, welche Parameter je nach Art der analytischen Prozedur zu testen sind.<sup>xxxii</sup>

Tab. 5 – Auswahl der Validierungsparameter, Übersicht aus den *ICH-Guidelines*<sup>xxxiii</sup>

Type of analytical procedure	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES	ASSAY - dissolution (measurement only) - content/potency
characteristics		quantitat. limit	
Accuracy	-	+ -	+
Precision			
Repeatability	-	+ -	+
Interm.Precision	-	+ (1) -	+ (1)
Specificity (2)	+	+ +	+
Detection Limit	-	- (3) +	-
Quantitation Limit	-	+ -	-
Linearity	-	+ -	+
Range	-	+ -	+

- signifies that this characteristic is not normally evaluated

+ signifies that this characteristic is normally evaluated

(1) in cases where reproducibility (see glossary) has been performed, intermediate precision is not needed

(2) lack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s)

(3) may be needed in some cases

Bevor jedoch die Parameter ausgewählt werden können, wird entschieden, welche Art analytischer Prozess validiert werden soll. Da der betroffene Extrakt später darauf geprüft werden soll, ob ein bestimmter festgelegter Grenzwert an Ochratoxin überschritten oder eingehalten wird, liegt es nahe, die Parameter für die Limitation einer Verunreinigung zu wählen. Demnach wäre lediglich die Überprüfung der

Spezifität (*specifity*) sowie der Nachweisgrenze (*detection limit*) notwendig. Da es sich bei OTA allerdings um eine sehr gefährliche und auch in kleinsten Mengen hoch toxische Verbindung handelt, wurden die Parameter für eine Quantifizierung ausgewählt.

Folgende Parameter werden für die Quantifizierung verwendet:

<i>Parameter engl.</i>	<i>Parameter dt.</i>	<i>Aussage</i>
<i>Accuracy</i>	Richtigkeit	systematische Fehler
<i>Precision</i>	Präzision	zufällige Fehler
<i>Specifity</i>	Spezifität	die Fähigkeit, eine Substanz(klasse) ohne Störung durch andere Komponenten zu bestimmen
<i>Detection Limit</i>	Nachweisgrenze	die kleinste nachweisbare Menge/Konzentration
<i>Quantitation Limit</i>	Bestimmungsgrenze	die kleinste quantifizierbare Menge/Konzentration
<i>Linearity</i>	Linearität	Mathematischer Zusammenhang zwischen Signal und Probenkonzentration
<i>Range</i>	Dynamischer Messbereich	Konzentrationsbereich für akzeptable Angaben über Richtigkeit, Präzision, Linearität, Selektivität und Robustheit

Tab. 6 - Übersicht der zu überprüfenden Validierungsparameter für die Quantifizierung einer Verunreinigung<sup>xxxiv</sup>

Table 6 gibt eine kurze Übersicht über die Prüfparameter. Neben dem englischen und deutschen Begriff werden die jeweiligen Parameter kurz erläutert.

### 3.2.1. Richtigkeit

Die *accuracy* oder Richtigkeit ist der komplexeste Prüfparameter eines Validierungsprozesses. Sie soll vor allem Aufschluss darüber geben, inwiefern der erhaltene Messwert mit dem tatsächlich wahren Wert korreliert.

### 3.2.2. Präzision

Generell beschreibt die Präzision inwiefern sich zufällige Fehler während der Aufarbeitung und der Analyse auf das Ergebnis auswirken. Dabei kann weiters zwischen Mess- und Methodenpräzision unterschieden werden, da sowohl das Analysengerät (Injektion, Detektion etc.) als auch die Probenvorbereitung (Einwaage, Extraktion, Verdünnung, Festphasenextraktion) Einfluss auf die Streuung der Ergebnisse haben.

- *Messpräzision* gibt Aufschluss über die Schwankungen, die das Analysegerät verursacht z.B. Abweichung der injizierten Menge oder eine ungenaue Detektion. Ermittlung z.B. durch sechsfache Injektion eines Standards und anschließenden Vergleich der Peakflächen (relative Standardabweichung, %RSD).
- *Methodenpräzision* Schwankungen durch die Probenaufarbeitung (z.B. Einwaage, Extraktion, ...) werden ermittelt, in dem *dieselbe* Probe sechsfach aufgearbeitet wird (6 Einwaagen!) und anschließend die Peakflächen (%RSD) verglichen werden.

Die sogenannte *Repeatability*, also Wiederholpräzision (siehe Tab. 3) bezieht sich auf die Wiederholbarkeit unter folgenden Bedingungen: 1 Prüfer, 1 Probe, 1 Gerät. Offen bleibt allerdings, ob die Mess-, die Methodenpräzision, oder beide zu überprüfen sind. Da die Methodenpräzision zeigt, wie stark sich die Arbeitsschritte auf das Ergebnis auswirken, scheint es auf jeden Fall sinnvoll diese Prüfung durchzuführen. Bestimmt man zusätzlich noch die Messpräzision, kann man ausschließen, dass große Schwankungen der Ergebnisse z.B. durch einen Defekt des Injektors verursacht

werden. Daher empfiehlt es sich, beide Prüfpunkte in die Validierung einzuschließen.<sup>xxxv</sup>

### *3.2.3. Spezifität*

Die Spezifität beschreibt die Möglichkeit, einen einzelnen Analyten - beispielsweise eine bestimmte Verunreinigung – störungsfrei neben anderen Komponenten wie Verunreinigungen, Abbauprodukten etc. nachzuweisen. Will man eine bestimmte Substanz via HPLC quantifizieren, so muss zunächst ausgeschlossen werden, dass eine andere Verbindung im Bereich der Analyten-Retentionszeit eluiert wird und somit die Messwerte verfälscht.<sup>xxxvi</sup>

Eine Möglichkeit, die Spezifität nachzuweisen, wäre ein direkter Vergleich zweier Chromatogramme, wobei der Analyt in der einen Probe enthalten ist und in der anderen fehlt. So kann man feststellen, ob Peaks von anderen Komponenten bei der selben Retentionszeit auftreten. Gibt es jedoch keine Probe ohne den Analyten, da es sich wie bei Ochratoxin um eine schwer vermeidbare Verunreinigung im ppb-Bereich handelt, muss die Bestimmung der Spezifität anders, z.B. durch Anwendung des Standardadditionsverfahrens, erfolgen. Hier wird, ähnlich wie bei der erstgenannten Methode, eine Probe mit unbekannter Menge des Analyten mit der selben Probe, der eine bekannte Menge Analyt zugesetzt wurde, verglichen.

### *3.2.4. Nachweis- und Bestimmungsgrenze*

Will man eine Substanz quantifizieren, so müssen zuerst die Nachweis- und Bestimmungsgrenze bestimmt werden. Die beiden Parameter geben Aufschluss darüber, welche Menge oder Konzentration des Analyten noch mit ausreichender Sicherheit zuverlässig bestimmt bzw. quantifiziert werden kann. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die beiden Prüfpunkte zu bestimmen, am häufigsten verwendet wird die Ermittlung des S/N-Verhältnisses (siehe Empfindlichkeit des Detektors), also des Verhältnisses der Höhe des Substanzpeaks bei einer bestimmten Konzentration des Analyten zur Höhe des Untergrundrauschens bei Injektion einer Blindlösung.

Als Bestimmungsgrenze (auch *Limit of Detection, LOD*) gilt laut ICH-Guidelines ein S/N-Verhältnis von 2-3:1, für die Nachweisgrenze (*Limit of Quantification, LOQ*) ist ein Verhältnis von 10:1 vorgeschrieben.<sup>xxxvii</sup>

### 3.2.5. Linearität

Die Linearität beschreibt den Zusammenhang zwischen Analytkonzentration und Peakfläche im Chromatogramm. Gerade bei der Quantifizierung sehr geringer Substanzmengen ist es sehr wichtig im linearen Bereich zu arbeiten, da die Messung sonst sehr ungenau sein kann. Für die Ermittlung der Linearität werden mindestens 5 verschiedene Konzentrationen des reinen Analyten welche den gesamten Arbeitsbereich abdecken und idealerweise durch Verdünnung einer Stammlösung hergestellt wurden, vermessen. Anschließend werden die Peakflächen als Funktion der jeweiligen Analytenkonzentration dargestellt und eine Regressionsgerade durch die erhaltenen Punkte gelegt. Idealerweise schneidet die dabei erhaltene Gerade sowohl alle erhaltenen Punkte als auch den Nullpunkt. Anschließend wird das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  gemessen, welches via lineare Regression ein Maß für die Linearität der Gerade darstellt.<sup>xxxviii</sup>

### 3.2.6. Dynamischer Messbereich

Der dynamische Messbereich, oder auch *Range*, beschreibt jenen Konzentrationsbereich des Analyten, für den ein akzeptables Maß an Linearität, Genauigkeit und Präzision erwiesen ist. Da es sich bei der Ph.Eur. Methode *Bestimmung von Ochratoxin A in pflanzlichen Drogen* um eine bereits validierte Methode handelt und die Bestimmung des dynamischen Messbereiches außerdem den Rahmen einer Diplomarbeit deutlich sprengen würde, wurde auf die Bestimmung verzichtet.

### 3.2.7. Robustheit

Ein weiterer häufig verwendeter Validierungsparameter, die sogenannte Robustheit, wird hier nur kurz erwähnt. Sie beschreibt die Anfälligkeit der Methode äußere Einflüsse wie z.B. Veränderungen oder Schwankungen von pH-Wert oder Temperatur.

Eine Methode gilt dann als robust, wenn sie trotz schwankender physikalischer oder chemischer Parameter reproduzierbare Ergebnisse liefert. Da für die zu testende Methode bereits eine umfangreiche Validierung vorgenommen und im Zuge dieser auch die Robustheit nachgewiesen wurde, ist es nicht notwendig sie erneut zu testen.

### 3.3. Vorbereitungsschritte

Noch vor der eigentlichen Analyse sind noch einige vorbereitende Schritte durchzuführen. Zunächst müssen sämtliche Glasgeräte vorbehandelt werden. Auch die Probe selbst wird vor der HPLC-Analyse extrahiert und aufgereinigt. Sämtliche vorbereitenden Maßnahmen werden im Detail beschrieben.

#### 3.3.1. Vorbereitung der Glasgeräte

Alle verwendeten Glasgeräte müssen aus Braunglas und frei von Detergentienrückständen sein, hierfür werden sie vor Verwendung zunächst mit 10%iger Schwefelsäure R gespült und anschließend mit destilliertem Wasser R gründlich nachgespült.

#### 3.3.2. Benötigte Reagentien

- $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, 3%: Lösung von Natriumhydrogencarbonat R in Wasser R (30 g/L)
- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 10% (V/V) Lösung von Schwefelsäure R in Wasser R
- Lösung A: 80 Volumsteile Wasser mit Ameisensäure R (wasserfrei) auf pH 2,3 gestellt + 20 T Acetonitril R
- Natriumchloridhaltige Pufferlösung pH 7,4 R1: 0,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  R + 6,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  R + 5,85 g NaCl R werden mit Wasser R auf 1000,0 mL aufgefüllt und falls erforderlich der pH Wert eingestellt
- Wasser R: verwendet wurde HQ-Wasser (entspricht Ph. Eur. *Aqua valde purificata*)
- Acetonitril R: verwendet wurde Acetonitril mit HPLC-Qualität
- Methanol R: verwendet wurde Methanol mit HPLC-Qualität

### *3.3.3. Probenvorbereitung*

Die Probe, also der zu testende Süßholzwurzelfluidextrakt, wird zunächst durch vorsichtiges Schütteln homogenisiert. Anschließend erfolgen die Extraktion von Ochratoxin A mittels Natriumhydrogencarbonat-Lösung im Ultraschallbad sowie die Zentrifugation um mögliche pflanzliche Rückstände oder unlösliche Bestandteile abzutrennen, da diese die HPLC-Apparatur verstopfen könnten.

#### *3.3.3.1. Arbeitsschritte für die Extraktion*

- 2,00 g Probe einwiegen und mit 80 mL einer Lösung von Natriumhydrogencarbonat R (30 g/L) versetzen
- 30 min. im Ultraschallbad extrahieren (nach 15 min. das Wasser im Bad wechseln)
- Auf Raumtemperatur abkühlen lassen und mit der NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. Auf 100,0 mL auffüllen
- Zentrifugieren, 5,0 mL des klaren Überstandes entnehmen und mit 30 mL NaCl-haltiger Pufferlösung pH 7,4 R1 versetzen

#### *3.3.3.2. Aufreinigung mittels Festphasenextraktion*

Im nächsten Arbeitsschritt wird Ochratoxin angereichert, indem ein Aliquot der vorgereinigten Probe durch eine Immunoaffinitätssäule mit Antikörpern gegen OTA geleitet wird. Nach mehreren Waschsritten wird das Toxin mit Methanol in ein HPLC-Vial (1,5 mL Fassungsvermögen, aus Braunglas!) eluiert. Methanol wird danach unter Inertbegasung (N<sub>2</sub>) zur Trockene eingedampft und der Rückstand sorgfältig in Lösung A gelöst. Sofern die erhaltene Lösung klar ist, kann sie ohne weitere Behandlung injiziert werden. Andernfalls muss sie noch durch ein Filter, welches OTA nachweislich nicht zurückhält, z.B. aus Teflon, filtriert werden.

#### *3.3.3.3. Arbeitsschritte für die Festphasenextraktion*

- Die vorbereitete Probe wird auf die Immunoaffinitätssäulen mit Antikörpern gegen Ochratoxin A aufgetragen und mit einer Durchflussrate von max. 3 mL/min. durchgeleitet.

- Bei einer Durchflussrate von max. 5 mL/min. wird zunächst 1x mit 10 mL Pufferlösung pH 7,4 und anschließend je 2x mit je 10 mL Wasser R gewaschen.
- Die Säule wird durch kurzes Anlegen von Vakuum oder 10 sek. langes Durchblasen von Luft mittels Injektionsspritze getrocknet.
- Die Probe wird 3x mit je 0,5 mL Methanol R in eine Probenflasche unter Einwirkung der Schwerkraft eluiert, dazwischen wird jeweils 30 sek. gewartet.
- Nochmals wird kurz Vakuum angelegt oder Luft durchgeblasen, um möglichst viel Eluat zu gewinnen.
- Die vereinigten Eluate werden anschließend unter Stickstoff am Blockheizgerät (40°C) eingedampft.
- Der Rückstand wird in 0,5 mL Lösung A aufgenommen.

*Analysebedingungen*

<i>Säulentemperatur</i>	45°C
<i>Flussrate</i>	0,8 mL / min.
<i>Mobile Phase A</i>	Wasser R mit 85%iger Phosphorsäure auf pH 2,3 eingestellt
<i>Mobile Phase B</i>	Acetonitril R
<i>Detektion</i>	Mittels Fluoreszenzdetektor
<i>Anregungswellenlänge</i>	330 nm
<i>Emissionswellenlänge</i>	460 nm

*Tab. 7 - Beschreibung der Analysebedingungen laut Ph.Eur. 2.8.22*

*3.3.3.4. Elution*

Die Elution erfolgt mittels Gradient, das bedeutet, die Verhältnisse der zwei mobilen Phasen A und B werden laufend verändert. In der ersten Phase überwiegt A, also der Phosphatpuffer, dann wird der Gradient sukzessive in Richtung B verschoben. Zum Schluss werden die ursprünglichen Verhältnisse wiederhergestellt. *Tabelle 8* zeigt den Gradienten für die Elution.

<i>Zeit (min.)</i>	<i>Mobile Phase A (% V/V)</i>	<i>Mobile Phase B (% V/V)</i>
0 - 30	80 → 40	20 → 60
30 - 35	40 → 20	60 → 80
35 - 37	20	80
37 - 40	20 → 80	80 → 20

Tab. 8 - Gradientenelution: Verhältnisse der beiden mobilen Phasen A und B in Abhängigkeit von der Zeit

### 3.3.4. Dekontamination der Glasgeräte

Sämtliche Glasgeräte, welche mit Ochratoxin A in Berührung gekommen sind, müssen zur Dekontamination gemäß Ph.Eur. 2.8.22 zunächst mit Methanol gespült, anschließend für mindestens 2 Stunden in Natriumhypochlorit-Lösung R eingelegt und danach mit Wasser gründlich ausgewaschen werden.

## 3.4. Durchführung der Validierung

### 3.4.1. Richtigkeit

Zur Ermittlung der Richtigkeit der Analyseergebnisse wurden mittels Standardadditionsverfahren, also zugeben bestimmter Mengen an Analyt zur Probe, 3 verschiedene OTA-Konzentrationen vermessen. Üblicherweise wird dafür zunächst eine Zielkonzentration gewählt, welche als 100% angesehen wird. Davon ausgehend werden 3 Konzentrationen des Analyten vermessen – meistens 50%, 100% und 150%. Da der Ochratoxin-Grenzwert der ehemaligen Monographie des Ph.Eur. bei 80 µg/kg Fluidextrakt lag, wurde dieser Wert als Anhaltspunkt gewählt (80 µg/kg =100%). Die aufgearbeiteten Proben wurden mit soviel Standard (Stammlösung 1, c = 0,5 µg/L) versetzt, dass sich folgende Konzentrationen ergeben:

- 2 g Droge + 160 µL OTA-SL 1 → 50% (40 µg/kg)
- 2 g Droge + 320 µL OTA-SL 1 → 100% (80 µg/kg)
- 2 g Droge + 480 µL OTA-SL 1 → 150% (120 µg/kg)
- 2 g Droge + 320 µL Lösung A → 0% als Vergleichslösung

Es wurden jeweils 2 getrennte Einwaagen mit der selben Menge Stammlösung 1 versetzt und eine zusätzlich mit Lösung A (Volumen entspricht 100% OTA) um mögliche Volumseffekte ausschließen zu können. Als Vergleich wurde außerdem noch die Probe alleine ohne Zugabe von OTA oder Lösung A extrahiert und vermessen, damit der Gehalt an Ochratoxin aus der Probe miteinberechnet werden kann.

<i>Einwaage</i>	<i>Zugabe von SL 1</i>	<i>Entspricht % vom Zielwert</i>
2,003 g	160 µL	50%
2,004 g	160 µL	50%
1,996 g	320 µL	100%
2,002 g	320µL	100%
2,009 g	480 µL	150%
1,998 g	480 µL	150%
2,007 g	320 µL (Lösung A)	0%

Tab. 9 - Übersicht zur Prüfung auf Richtigkeit: Einwaagen, Menge an zugegebener OTA-Lösung etc.

### 3.4.2. Präzision

#### 3.4.2.1. Messpräzision

Für die Bestimmung der Messpräzision wurde eine Lösung von Ochratoxin-Standard (Referenzlösung 4,  $c = 5 \text{ ng/mL}$ ) sechsmal injiziert. Anschließend erfolgen ein optischer Vergleich der Peaks sowie die Berechnung der relativen Standardabweichung (% RSD, relative standard deviation) der sechs Peakflächen.

#### 3.4.2.2. Methodenpräzision

Um die Effekte der Probenvorbereitung und Aufarbeitung auf das Analysenergebnis aufzudecken wurden sechs Ansätze der selben Probe, also sechs verschiedene Einwaagen aus der selben Flasche Süßholzwurzelfluidextrakt, jeweils mit jener Menge an OTA versetzt, die einer Konzentration von  $80 \text{ µg OTA pro kg Fluidextrakt}$  entspricht. Dazu wurde jede aufgearbeitete Probe mit  $320 \text{ µL Stammlösung 1}$  versetzt (s. Präzision). Die erhaltenen Peaks wurden, wie auch bei der Messpräzision, optisch verglichen und ihre relative Standardabweichung berechnet.

Einwaage	Zugabe von OTA	Berechneter Gehalt an OTA
2,007 g	320 µL	80,28 µg/kg
2,002 g	320 µL	80,08 µg/kg
1,998 g	320 µL	79,92 µg/kg
2,009 g	320 µL	80,36 µg/kg
2,005 g	320 µL	80,20 µg/kg
2,001 g	320 µL	80,04 µg/kg

Tab. 10 - Methodenpräzision: theoretischer OTA-Gehalt, berechnet über die Einwaage sowie die Menge zugegebener OTA-Stammlösung 1 ( $c = 0,5 \mu\text{g/L}$ )

### 3.4.3. Spezifität

Die Spezifität kann im Normalfall ganz einfach ermittelt werden, indem zwei Probenansätze analysiert werden, wobei der gesuchte Analyt in einem Ansatz vorhanden ist, in dem Anderen jedoch fehlt. Durch den anschließenden Vergleich der Chromatogramme, insbesondere um die Retentionszeit des Analyten herum, kann sehr einfach und zuverlässig überprüft werden, ob es Komponenten in der Probe gibt, welche bei derselben Retentionszeit eluiert werden und somit die Analyse stören können.

In diesem Fall ist die Methode nicht anwendbar, da dafür ein Süßholzwurzelfluidextrakt nötig wäre, welcher definitiv kein Ochratoxin enthält. Da es sich dabei um biologisches Material handelt, kann das Vorhandensein von OTA niemals gänzlich ausgeschlossen werden.

Eine andere Möglichkeit die Spezifität zu bestimmen wäre die Analyse mit einer anderen Methode. Daher wurde zunächst versucht, den Analyten mittels Massenspektrometrie zu erfassen und zu quantifizieren. Anschließend könnte der ermittelte Gehalt an OTA mit beiden Methoden verglichen werden. Zunächst wurde ein Massenspektrum des Standards (50 µg/mL in Benzoesäure und Essigsäure 99:1) aufgenommen. Der einzige dabei erhaltene Peak von OTA wies eine starke Intensität auf war gut zu erkennen. Im Anschluss daran wurden Spektren verschiedener Verdünnungen im Bereich um die Grenzkonzentration aufgenommen, die allerdings

keine Peaks zeigten. Daraus lässt sich schließen, dass die Massenspektrometrie unter den gewählten Umständen zu unempfindlich für OTA ist.

Letztlich blieb noch die Möglichkeit des Standardadditionsverfahrens, also einer Probe mit unbekannter Analytkonzentration verschiedene definierte Mengen an Analyt zuzusetzen und die anschließend die Peakflächen zu vergleichen. Da im Zuge der Prüfung auf Richtigkeit ohnehin ein solches Verfahren zur Anwendung kam, können die Ergebnisse der Bestimmung für die Beurteilung der Spezifität herangezogen werden.

#### 3.4.4. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die beiden Parameter Nachweis- und Bestimmungsgrenze lassen sich am einfachsten und schnellsten ermitteln, indem eine oder mehrere niedrig konzentrierte Lösungen des Analyten injiziert werden. Anschließend wird eine Blindlösung (in diesem Fall *Lösung A*) ebenfalls injiziert und die Chromatogramme im Bereich um die Retentionszeit des Analyten genauer untersucht werden.

Folgende Lösungen wurden untersucht:

- Referenzlösung 6 ( $c = 0,5 \text{ ng/mL}$ )
- Referenzlösung 7 ( $c = 0,1 \text{ ng/mL}$ )

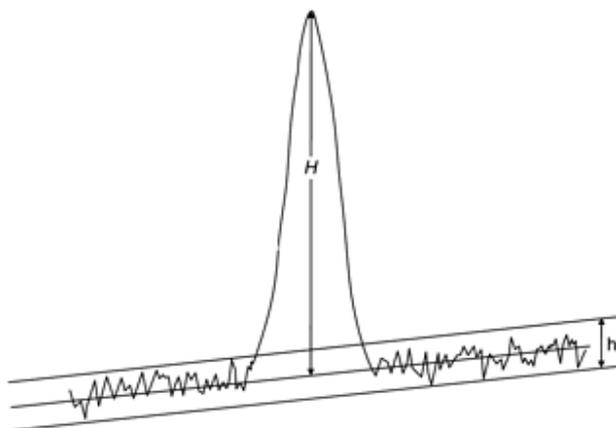


Abbildung 10 stellt die Ermittlung der Höhe des Analytenpeaks  $H$  ausgehend von der Basislinie sowie der Höhe des Rauschens  $h$ , das über mindestens die fünffache Peakbreite des Analytpeaks gemessen wird, dar. Im Anhang sind die Chromatogramme der Referenzlösungen 6 und 7 Originalgröße enthalten.

Abb. 10 – Darstellung der Ermittlung von Peakhöhe und Höhe des Rauschens (Ph.Eur. 2.2.46)<sup>xxxix</sup>

Die Höhe des Peaks H wird, wie in der Abbildung dargestellt, von der mittleren Höhe des Hintergrundrauschens bis zur Peakspitze gemessen, wobei die Höhe des Rauschens über mindestens die fünffache Analytenpeakbreite betrachtet wird.

Die erhaltenen Chromatogramme wurden ausgedruckt und die jeweiligen Peakhöhen der OTA-Lösungen mittels Lineal abgemessen (s. Anhang); beim Chromatogramm der Blindlösung wurde im Bereich um die Retentionszeit von Ochratoxin über die fünffache Peakbreite der Standards die Höhe des Hintergrundrauschens auf die selbe Weise ermittelt. Gemäß den ICH-Guidelines wird das S/N-Verhältnis folgendermaßen berechnet:

- $S/N = \frac{2H}{h}$
- H.... Peakhöhe nach Injektion des Standards
- h.... Höhe des Hintergrundrauschens bei Injektion des Blindwertes

Davon ausgehend, dass Analytkonzentration und Peakhöhe sich direkt proportional verhalten und die Höhe des Hintergrundrauschens gleichbleibt, können die Parameter Nachweis- und Bestimmungsgrenze durch Schlussrechnungen berechnet werden. (s. Parameter)

#### 3.4.5. Linearität

Zur Bestimmung der Linearität wurde eine Kalibriergerade gemäß der Vorschrift aus der Monographie *Bestimmung von Ochratoxin A in pflanzlichen Drogen* erstellt. Dazu wurden sieben OTA-Lösungen (Referenzlösung 1-7) hergestellt, welche einen Konzentrationsbereich von 0,5 bis 250 µg/kg Droge abdecken. Die Referenzlösungen wurden jeweils zweimal injiziert und anschließend die relative Standardabweichung berechnet. Eine Kalibriergerade wurde erstellt und die Linearität ermittelt.

Die folgende Tabelle aus dem Europäischen Arzneibuch zeigt die Herstellung der Referenzlösungen 1-7 sowie die jeweilige Endkonzentration an Ochratoxin A, die Lösungen 1-5 werden ausgehend von der primären OTA-Stammlösung (c = 0,5 µg/mL),

die Lösungen 6 und 7 ausgehend von der sekundären OTA-Stammlösung ( $c = 5 \mu\text{g/mL}$ ) zu jeweils 50,0 mL verdünnt.

Tab. 2.8.22-1: Ochratoxin-A-Referenzlösungen

Ochratoxin-A-Referenzlösung	Volumen der primären Ochratoxin-A-Stammlösung ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration von Ochratoxin A in der Referenzlösung ( $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ )
1	5000	50
2	2500	25
3	1000	10
4	500	5
5	250	2,5
Ochratoxin-A-Referenzlösung	Volumen der sekundären Ochratoxin-A-Stammlösung ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration von Ochratoxin A in der Referenzlösung ( $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ )
6	500	0,5
7	100	0,1

Tab. 11 - Referenzlösungen 1-7 für die Erstellung der Kalibriergerade (Ph. Eur. 2.8.22)

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse der Validierung

#### 4.1.1. Richtigkeit

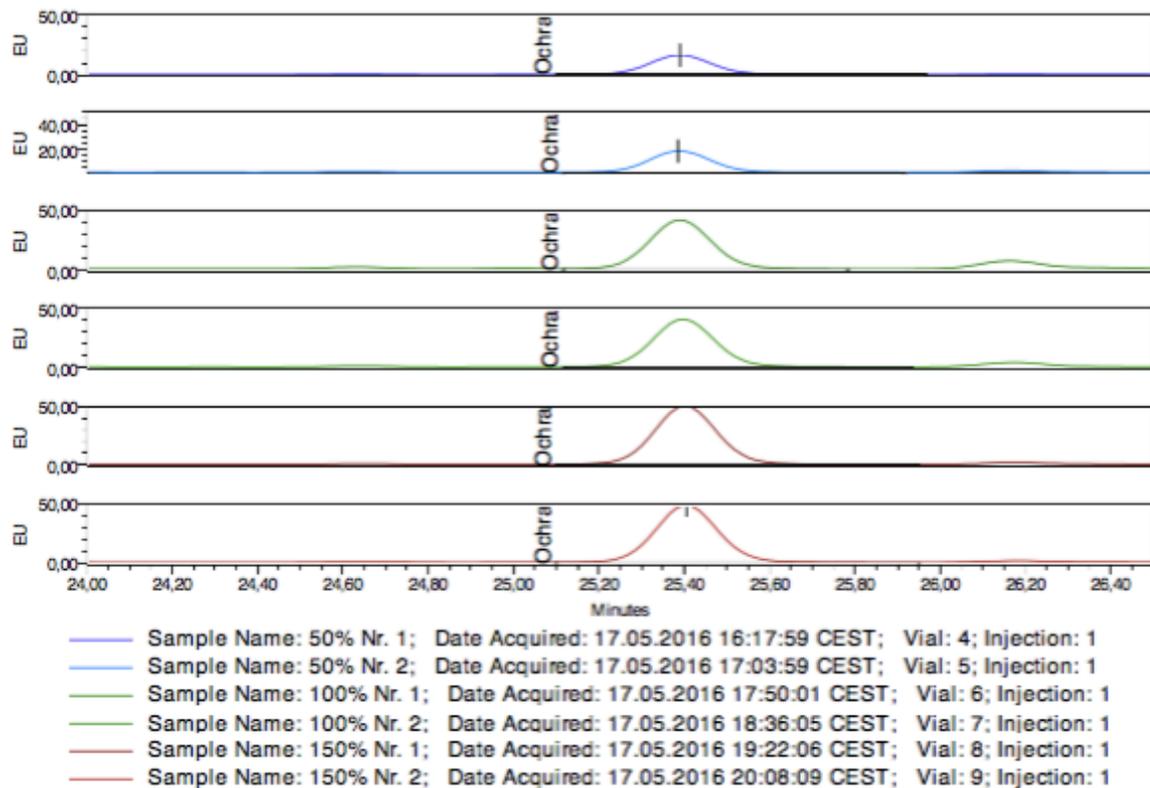


Abb. 11 – Wiederfindungsrate Chromatogramme der Probe gespiked mit OTA (50%, 100%, 150%)

Abbildung 11 zeigt die die Peakpaare der Probe gespiked mit 50, 100 bzw. 150% Analytkonzentration. In *Abbildung 12* werden die beiden Peaks bei 100% der Analytkonzentration genauer dargestellt. Die Peaks von Ochratoxin A sind bei einer Retentionszeit von ca. 25,5 min. zu sehen, wobei die Peakfläche direkt proportional zur OTA-Konzentration ansteigt.

4.1.1.1. Ergebnisse für die Probenausbeute bei 100% (80µg/kg)

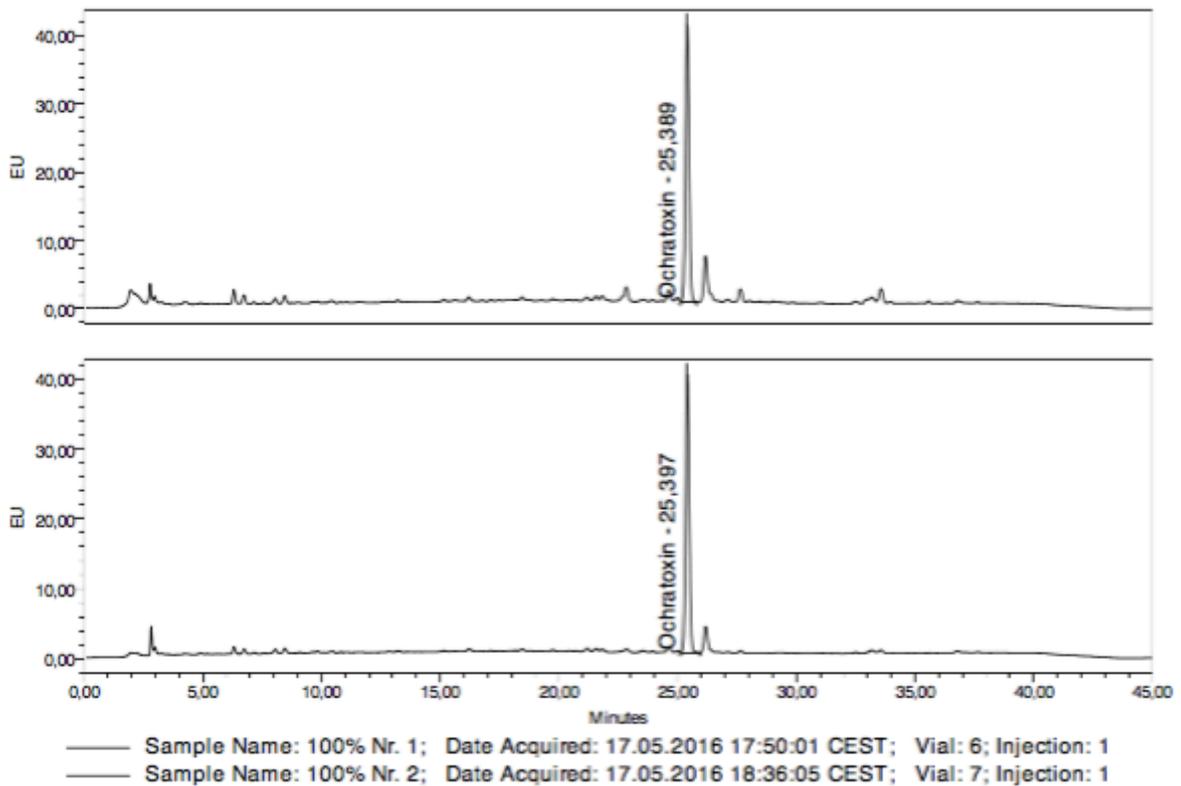


Abb. 12 – Wiederfindungsrate: Chromatogramme der Probe mit 100% Analyt

**Peak Summary with Statistics**  
Name: Ochratoxin

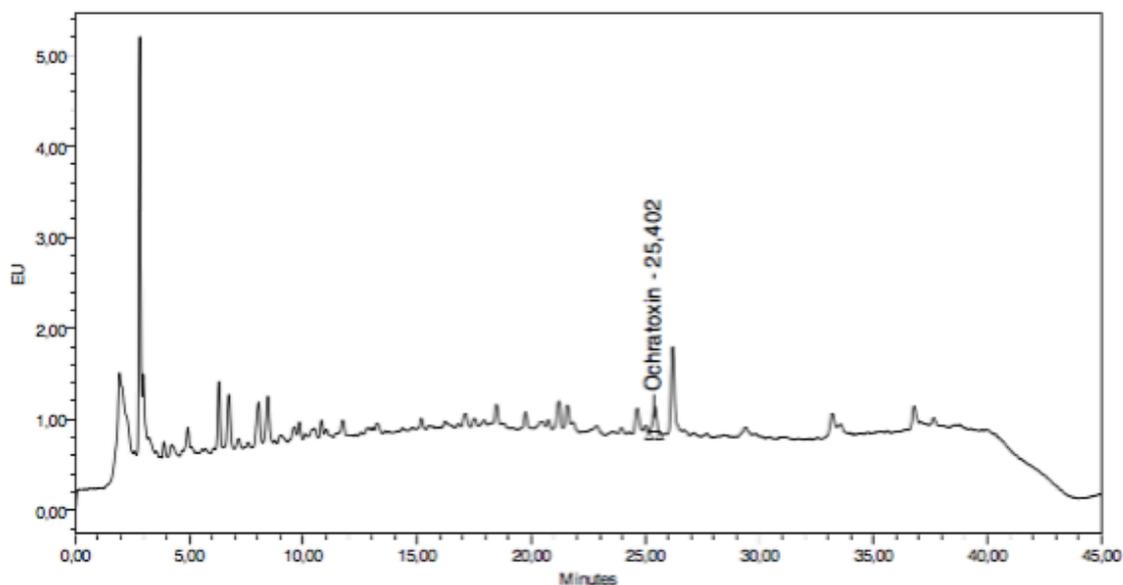
	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	Amount	Units	Manual
1	6	1	Ochratoxin	25,39	4278892	14,9468	ng/mL	Yes
2	7	1	Ochratoxin	25,40	4159522	14,5372	ng/mL	Yes
Mean				25,3932	4219207,2	14,7420		
% RSD				0,02	2,00	1,96		

Tab. 12 - Peakflächen und berechneter OTA-Gehalt bei 100% Analytkonzentration

- durchschnittlicher OTA-Gehalt: 14,74 ng/mL
- entspricht umgerechnet 73,71 µg/kg OTA
- Umrechnung ng/mL → µg/kg:  $\frac{V1 \cdot V2}{m \cdot Vi} \cdot C = \frac{100,0 \text{ mL} \cdot 0,5 \text{ mL}}{2,00 \text{ g} \cdot 5,0 \text{ mL}} \cdot C = 5 \cdot C$
- Umrechnungsfaktor: ng/ml \* 5 → µg/kg

Kürzel	Bedeutung der Abkürzung, zugehörige Einheit
<i>m</i>	Einwaage des Extraktes (2,00 g)
<i>V1</i>	Volumen des mit NaHCO <sub>3</sub> verdünnten Extrakts (100,0 mL)
<i>V<sub>i</sub></i>	Volumen des klaren Überstandes nach dem Zentrifugieren, welches auf die Immunoaffinitätssäule aufgetragen wird (5,0 mL)
<i>V2</i>	Volumen an Lösung A zur Aufnahme des Rückstandes (0,5 mL)
<i>C</i>	gemessene OTA-Konzentration (ng/mL)

Tab. 13 - Erklärung der verwendeten Formel<sup>xl</sup>



	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units	Manual
1	Ochratoxin	25,402	31709	2870	0,373	ng/mL	Yes

Abb. 13 – Chromatogramm der Probe ohne Zugabe von OTA-Standard (= 0%) zum Vergleich

Abbildung 13 zeigt das Chromatogramm der Probe ohne weitere Zugabe von OTA.

Auch hier ist ein Peak von Ochratoxin A bei  $t_R$  25,5 min. zu sehen.

Da die Probe selbst Ochratoxin A enthält, muss für die korrekte Berechnung der Wiederfindung die ursprüngliche OTA-Menge des Ausgangsmaterials abgezogen werden, da das Ergebnis sonst falsch zu hoch wäre.

- Ochratoxingehalt der Probe 0,37 µg/kg
- Istwert = Gehalt nach der Extraktion – Ursprungsgehalt der Probe
- Istwert = 73,34 µg/kg
- Sollwert (100%) = 80 µg/kg
- $\frac{73,34}{80} = 0,917 \rightarrow 92\%$  Wiederfindungsrate
- %RSD = 2,00

#### 4.1.1.2. Probenausbeute bei 50% und 150%

Bei 50% der Zielkonzentration wurden nach Abzug des ursprünglichen OTA-Gehalts 5,88 ng/mL (umgerechnet 29,41 µg/kg) gefunden, was 74% des Sollwertes entspricht. Bei 150% wurden 17,28 ng/mL (umgerechnet 86,38 µg/kg) gefunden. Das entspricht einer Wiederfindung von 72%.

#### 4.1.2. Spezifität

##### 4.1.2.1. Massenspektrum des unverdünnten Standards

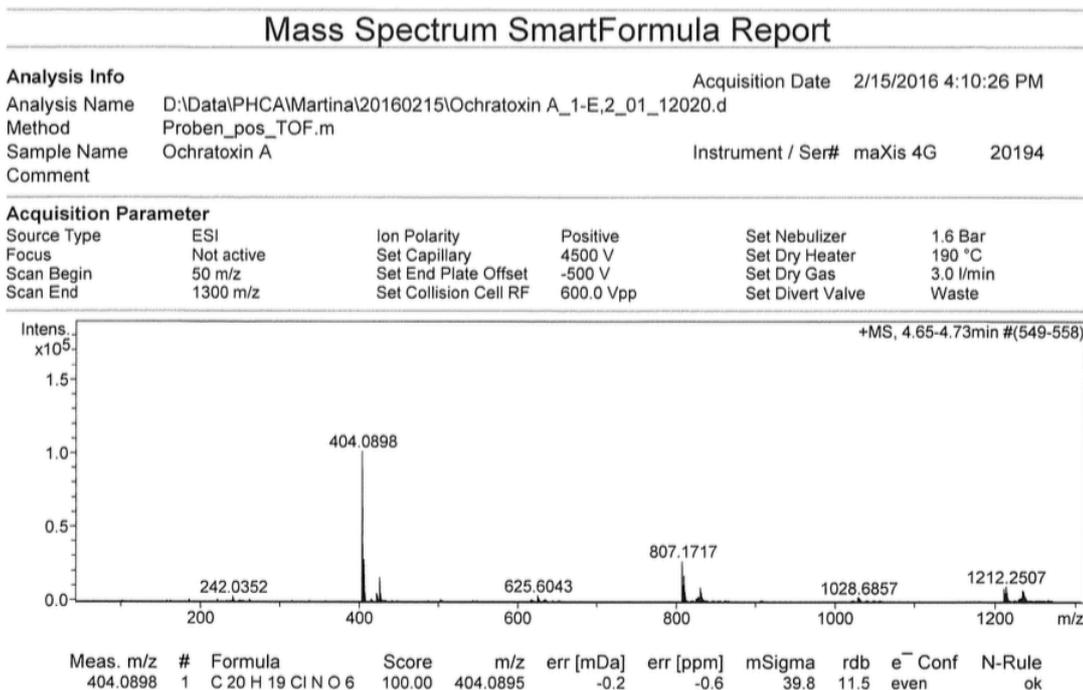


Abb. 14 – Massenspektrum des unverdünnten OTA-Standards, c = 50 µg/mL in Benzol : Essigsäure (99:1)

- Basispeak bei m/z = 404,1
- Summenformel: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClNO<sub>6</sub>

#### 4.1.2.2. TOF-Analyse des verdünnten Standards, der Blindlösung sowie der Probe

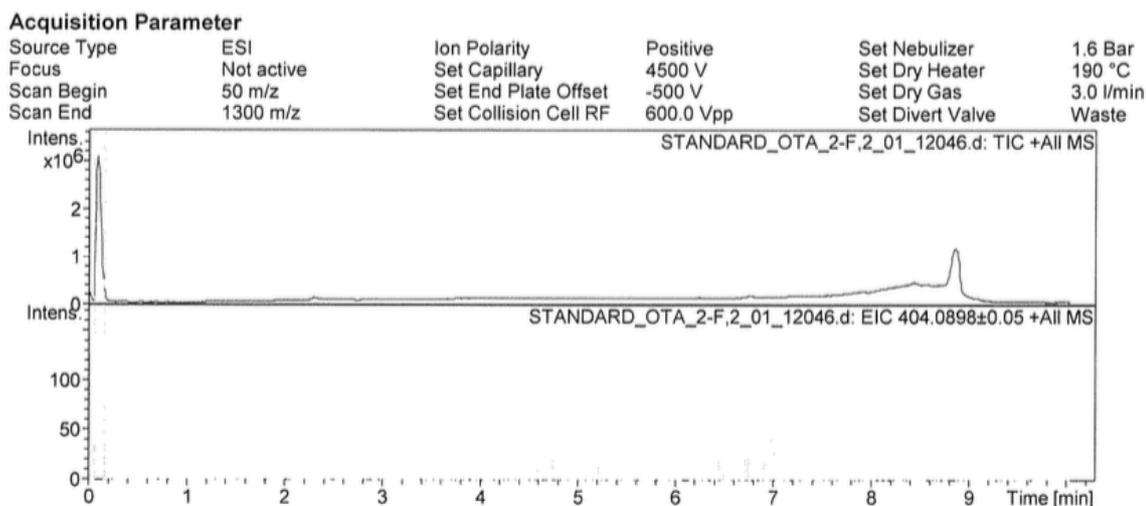


Abb. 15 – UV/Vis Spektrum des verdünnten OTA-Standards ( $c = 16 \text{ ng/mL}$ ) im TOF-Analysator

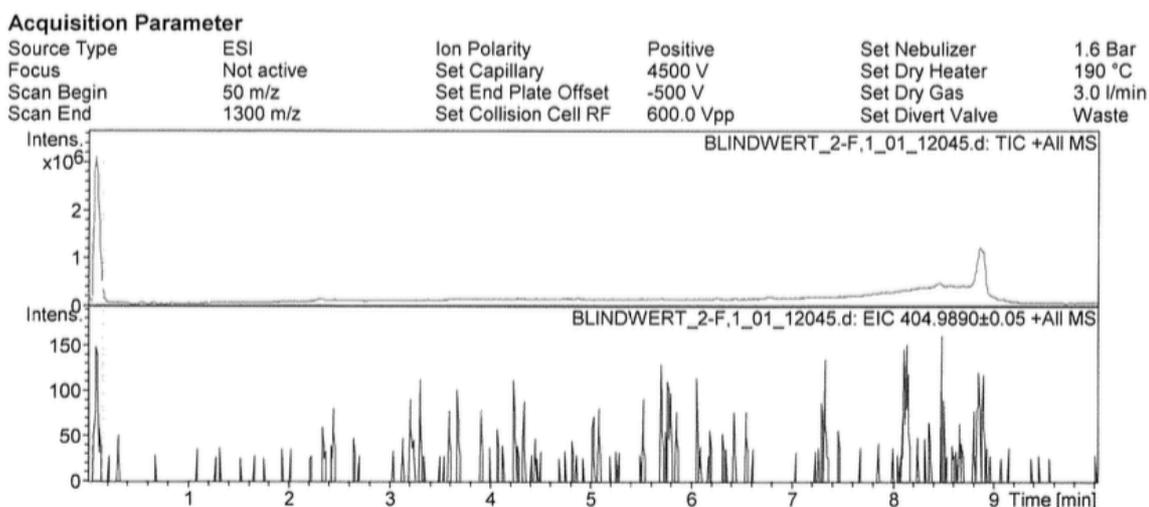


Abb. 16 – UV/Vis Spektrum des Blindwertes (Lösung A) im TOF-Analysator

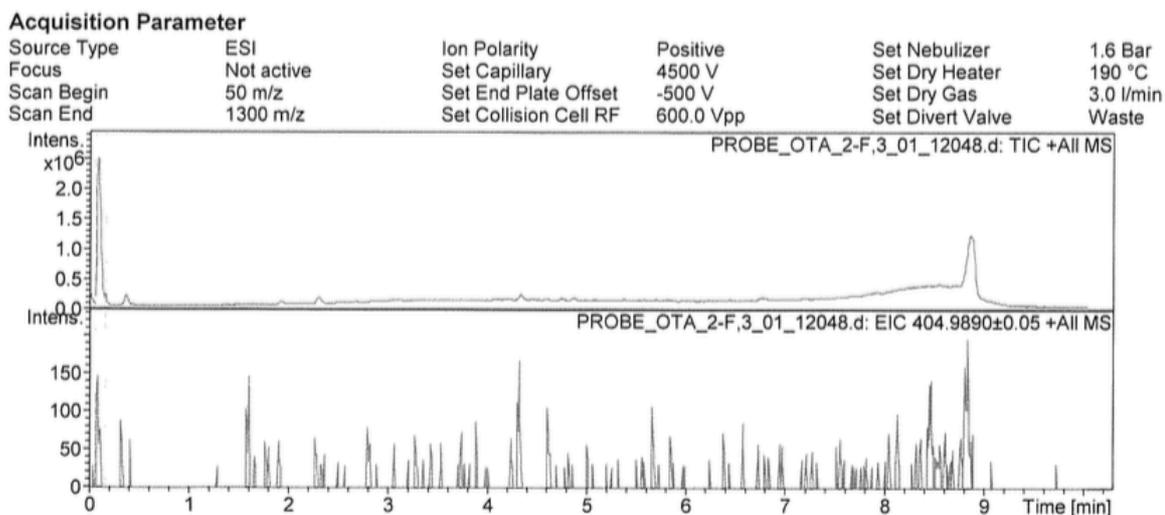


Abb. 17 – UV/Vis Spektrum der Probe im TOF-Analysator

Abbildung 15, 16 und 17 zeigen die UV/Vis-Spektren des verdünnten Standards, der Blindlösung sowie der Probe im Vergleich. Alle drei Spektren sind identisch, weder der Standard noch die Probe zeigen einen OTA-Peak.

#### 4.1.3. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

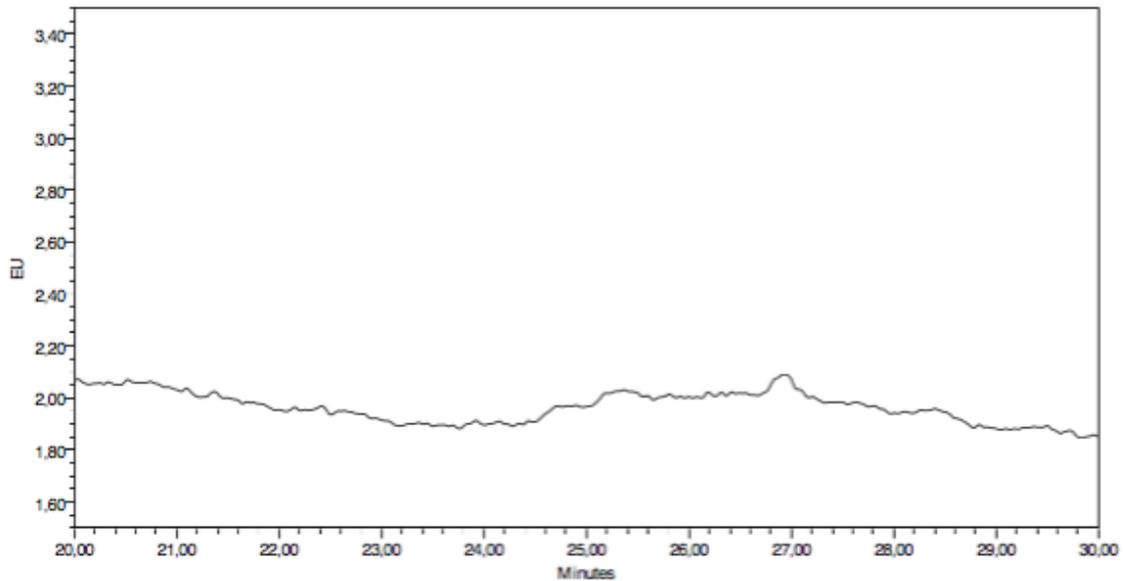


Abb. 18 – Chromatogramm der Blindlösung, Höhe des Rauschens  $h = 0,4$  cm

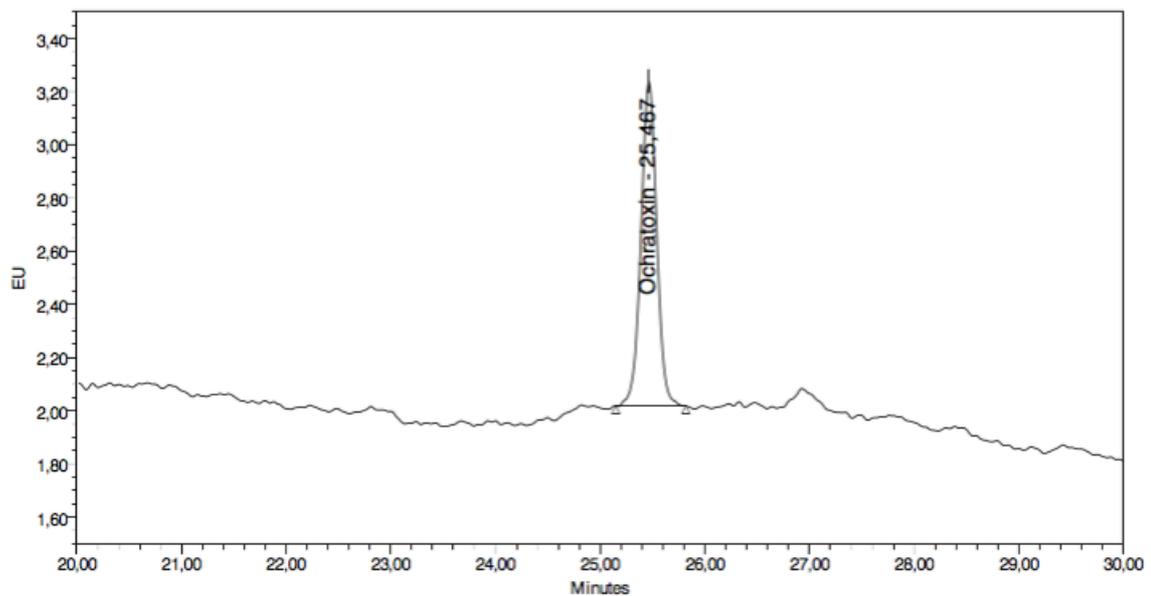


Abb. 19 – Chromatogramm der Referenzlösung 6, Peakhöhe  $H = 5,4$  cm

Abbildung 18 und 19 zeigen die Chromatogramme zur Ermittlung des S/N-Verhältnisses, über welches die Parameter LOD und LOQ berechnet werden können.

#### 4.1.3.1. Berechnung von LOD und LOQ ausgehend von Referenzlösung 6

Die Berechnung der beiden Parameter Nachweisgrenze (*LOD*) und Bestimmungsgrenze (*LOQ*) erfolgt mittels Schlussrechnung. Als Nachweisgrenze wird jene Konzentration bezeichnet, bei der das S/N-Verhältnis 3 beträgt, als Bestimmungsgrenze ein S/N-Verhältnis von 10.

- Peakhöhe OTA:  $H = 5,4 \text{ cm}$
- Rauschen Blindwert:  $h = 0,4 \text{ cm}$
- $S/N = \frac{2H}{h} = 10,8/0,4 = 27$

Bei einer Konzentration von 0,5 ng/mL entspricht das Verhältnis zwischen Signal und Rauschen einem Wert von 27.

- 0,5 ng/mL..... S/N = 27
- 0,19 ng/mL..... S/N = 10 (LOQ)
- 0,06 ng/mL..... S/N = 3 (LOD)

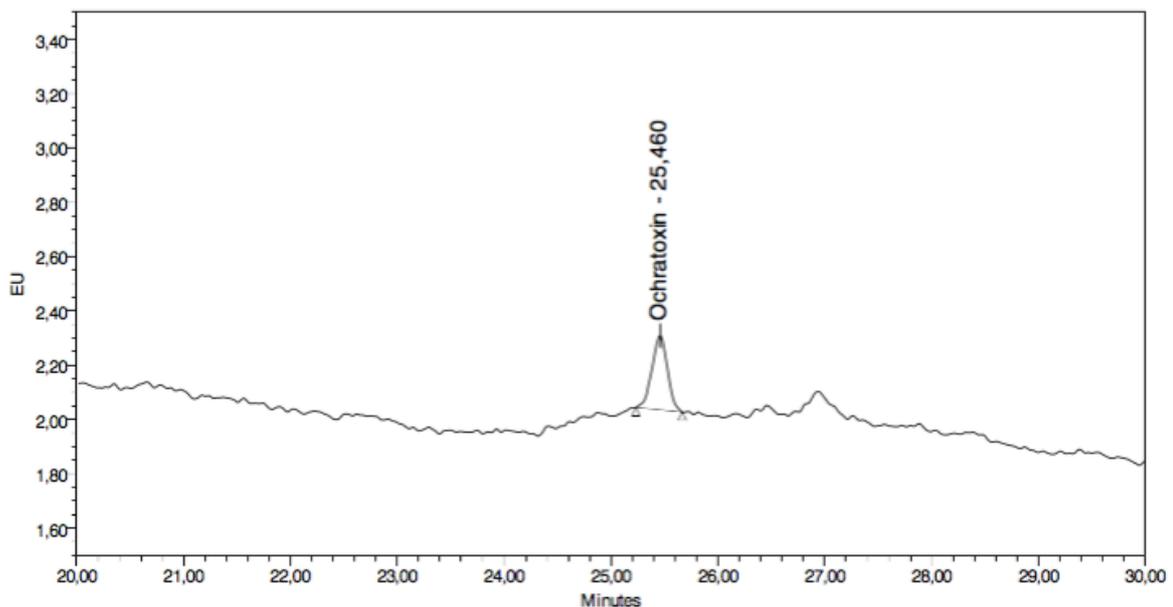


Abb. 20 – Chromatogramm der Referenzlösung 7, Peakhöhe  $H = 1,3 \text{ cm}$

#### 4.1.3.2 Berechnung von LOD und LOQ ausgehend von Referenzlösung 7

- Peakhöhe OTA:  $H = 1,3 \text{ cm}$
- Rauchen Blindwert:  $h = 0,4 \text{ cm}$
- $S/N = \frac{2H}{h} = 2,6/0,4 = 6,5$

Bei einer Konzentration von 0,1 ng/mL entspricht das Verhältnis zwischen Signal und Rauschen einem Wert von 6,5.

- 0,1 ng/mL.....  $S/N = 6,5$
- 0,15 ng/mL.....  $S/N = 10$  (LOQ)
- 0,05 ng/mL.....  $S/N = 3$  (LOD)

#### 4.1.4 Präzision

##### 4.1.4.1. Messpräzision

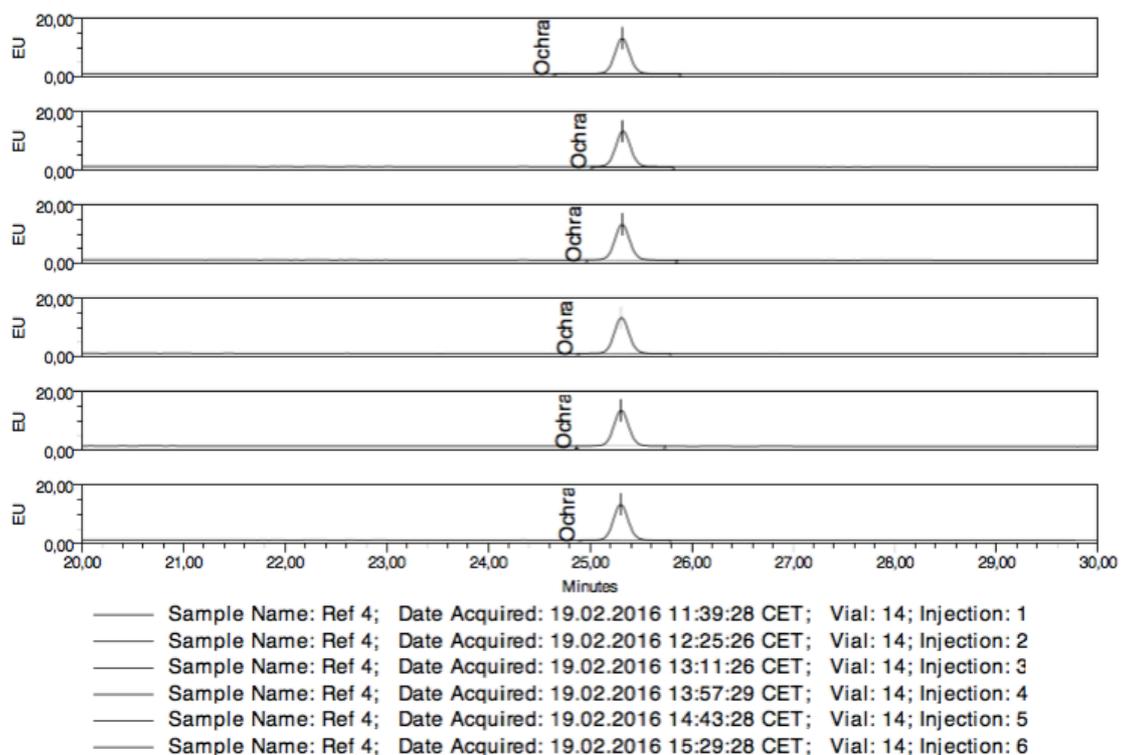


Abb. 21 – Chromatogramm der Messpräzision, 6 Injektionen derselben Lösung von OTA

Abbildung 21 zeigt die Peaks der sechsfachen Injektion des Standards aus demselben HPLC-Vial, in Tabelle 14 sind die dazugehörigen Peakflächen sowie die entsprechenden Mengen an OTA aufgelistet.

**Peak Summary with Statistics**  
**Name: Ochratoxin**

	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	Amount	Units	Manual
1	14	1	Ochratoxin	25,32	1283516	5,2429	ng/mL	No
2	14	2	Ochratoxin	25,32	1269277	5,1841	ng/mL	No
3	14	3	Ochratoxin	25,32	1265855	5,1700	ng/mL	No
4	14	4	Ochratoxin	25,31	1285879	5,2526	ng/mL	No
5	14	5	Ochratoxin	25,31	1285848	5,2525	ng/mL	No
6	14	6	Ochratoxin	25,30	1282317	5,2379	ng/mL	No
Mean				25,3125	1278781,8	5,2233		
% RSD				0,03	0,69	0,70		

Tab. 14 - Messpräzision: Peakflächen der 6 Injektionen inklusive Standardabweichung

- durchschnittliche Peakfläche: 1278781,8
- relative Standardabweichung der Peakflächen %RSD = 0,69

#### 4.1.4.2. Methodenpräzision

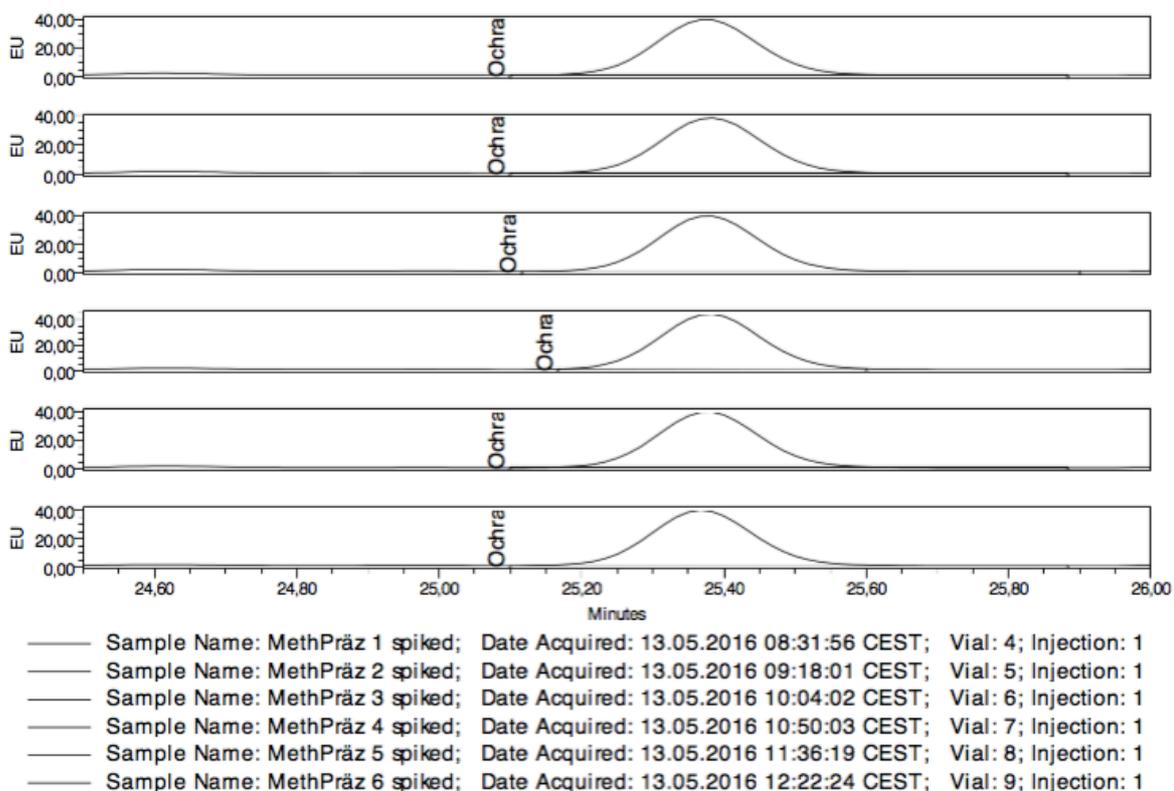


Abb. 22 – Chromatogramme der Methodenpräzision, 6 getrennte Aufarbeitungen

### Peak Summary with Statistics Name: Ochratoxin

	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	Amount	Manual
1	4	1	Ochratoxin	25,37	4105871	14,3731	Yes
2	5	1	Ochratoxin	25,38	3919793	13,7352	Yes
3	6	1	Ochratoxin	25,38	4139841	14,4895	Yes
4	7	1	Ochratoxin	25,38	4295209	15,0221	Yes
5	8	1	Ochratoxin	25,38	4045898	14,1675	Yes
6	9	1	Ochratoxin	25,37	4116852	14,4107	Yes
Mean				25,3762	4103910,8	14,3663	
% RSD				0,02	2,99	2,93	

Tab. 15 - Methodenpräzision: Peakflächen der 6 Aufarbeitungen inklusive Standardabweichung

Abbildung 22 zeigt die Peaks der sechs getrennten Aufarbeitungen derselben Probe. Es wurden sechs getrennte Einwaagen analysiert. Tabelle 15 zeigt die dazugehörigen Peakflächen.

- durchschnittliche Peakfläche: 4103910,8
- relative Standardabweichung der Peakflächen %RSD = 2,99

#### 4.1.5. Linearität

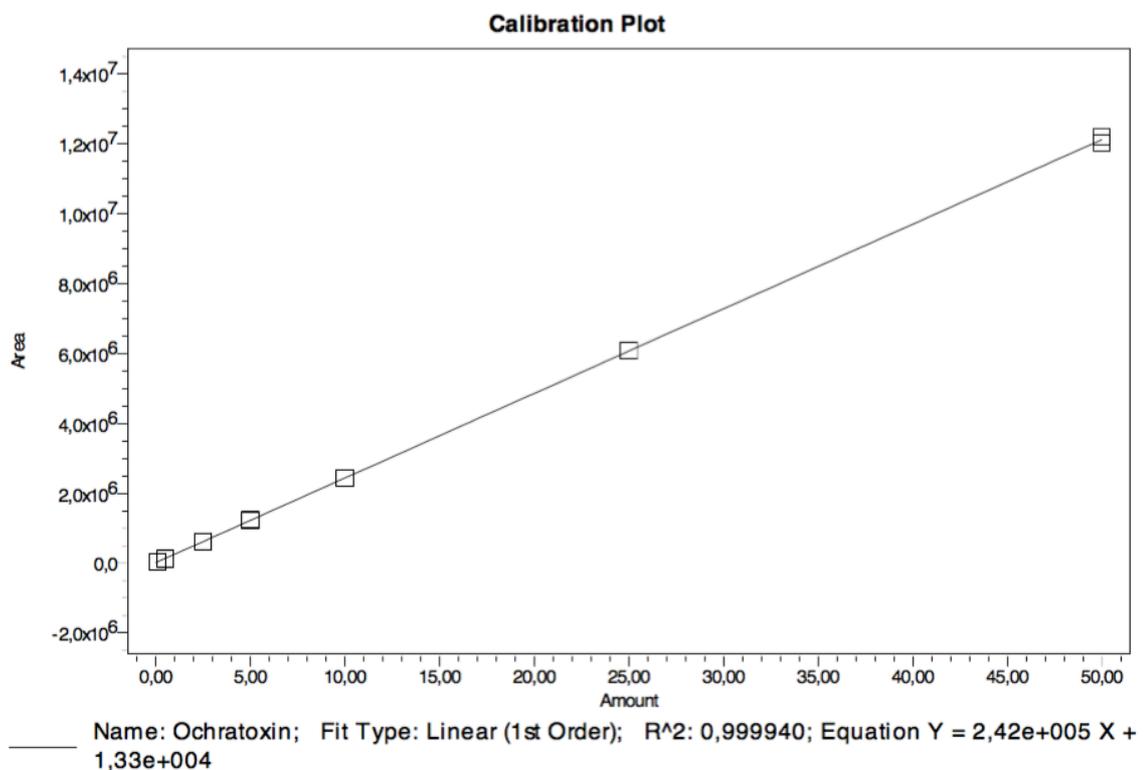


Abb. 23 – Kalibriergerade aus den Referenzlösungen 1-7, Doppelbestimmung

Referenzlösung	Peakflächen	% RSD
Ref. 1 (50 ng/mL)	12203529,53 / 12040073,74	0,95
Ref. 2 (25 ng/mL)	6086518,32 / 6071227,98	0,18
Ref. 3 (10 ng/mL)	2434014,36 / 2438026,94	0,12
Ref. 4 (5 ng/mL)	1225133,87 / 1240485,88	0,88
Ref. 5 (2,5 ng/mL)	618987,60 / 627063,29	0,92
Ref. 6 (0,5 ng/mL)	129454,61 / 127522,52	1,06
Ref. 7 (0,1 ng/mL)	28186,05 / 27686,54	1,26

.Tab. 16 - Übersicht über die Peakflächen der Referenzlösungen inklusive der Standardabweichung der jeweiligen Peakpaare (Doppelbestimmung)

- $r^2 = 0,999940$
- durchschnittliche %RSD = 0,77

## 4.2. Zusammenfassung der Validierungsergebnisse

Validierungsparameter	Definition	Ergebnis
Richtigkeit	Probenausbeute bei 100%	92% Wiederfindung
	Probenausbeute bei 50%	74% Wiederfindung
	Probenausbeute bei 150%	72% Wiederfindung
Spezifität	MS Unverd. Standard	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> ClNO <sub>6</sub> , m/z = 404,1
	MS verd. Standard	Kein OTA-Peak
	MS Blindlösung	Kein OTA-Peak
	MS Probe	Kein OTA-Peak
Nachweisgrenze	Mittelwert LOD	0,17 ng/mL
Bestimmungsgrenze	Mittelwert LOQ	0,06 ng/mL
Präzision	Messpräzision	%RSD = 0,69
	Methodenpräzision	%RSD = 2,99
Linearität	Bestimmtheitsmaß	r <sup>2</sup> = 0,999940
	Flächen der Peakpaare	%RSD = 0,77

Tab. 17 - Zusammengefasste Ergebnisse aus den Validierungsexperimenten

## 4.3. Gesamtbeurteilung der Methodvalidierung

Die Ergebnisse der Validierung zeigen, dass die Methode des Europäischen Arzneibuchs zur Prüfung auf Ochratoxin A ohne weitere Adaption problemlos auf den Süßholzwurzelfluidextrakt des ÖAB anwendbar ist. Somit kann die Reinheitsprüfung zu *Eingestellter Süßholzwurzelfluidextrakt* aus dem Österreichischen Arzneibuchs um den Test auf Ochratoxin A erweitert, und so die Monographie an europäische Standards angepasst werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Prüfung auf Richtigkeit via Ermittlung der Wiederfindungsrate an Ochratoxin, welches vor der Extraktion und Aufreinigung zugegeben wurde und somit alle Schritte der Methode durchlief, waren sehr vielversprechend.

Vor allem die Wiederfindungsrate von 92% bei 100% (entspricht 16 ng/mL oder umgerechnet 80 µg/kg OTA) der Analytkonzentration spricht dafür, dass Ochratoxin A gemäß der Vorschrift Ph.Eur. 2.8.22 im Konzentrationsbereich um den möglichen Grenzwert herum mit hoher Genauigkeit bestimmt werden kann. Trotz der vielen Extraktions-, Anreicherungs- und Waschschriffe der Probenvorbereitung können 92% der Ausgangsmenge an Ochratoxin durch die Methode gefunden werden.

Bei 50% Analytkonzentration (8 ng/mL bzw. umgerechnet 40 µg/kg OTA) beträgt die Wiederfindungsrate 74%. Aufgrund der geringeren Analytmenge war zu erwarten, dass die Ausbeute geringer ausfällt. Da laut Ph.Eur. 2.8.22 für die Immunoaffinitätssäulen eine Wiederfindungsrate von 70% oder mehr gefordert wird, ist das Ergebnis dennoch absolut im Rahmen.

Bei 150% (24 ng/mL; 120 µg/kg) wäre aufgrund der höheren OTA-Konzentration ein höherer Wert als bei 100% zu erwarten gewesen. Jedoch fiel hier die Wiederfindungsrate mit 72% deutlich geringer aus. Eine Erklärung für dieses widersprüchliche Ergebnis liefert die Beladungskapazität der Immunoaffinitätssäulchen. Diese sind für eine Beladung mit maximal 100 ng Ochratoxin A konzipiert, das bedeutet, dass bei einer Überschreitung der Beladungskapazität Ochratoxin nicht mehr von den Antikörpern zurückgehalten wird und bei den Waschschriffen verloren geht. Auf die Säulchen wurden gemäß der Vorschrift 5 mL Probelösung aufgetragen, das entspricht bei einer OTA-Konzentration von 24 ng/mL x 5 mL einer Gesamtmenge von 120 ng Ochratoxin. Damit wurde die Beladungskapazität der Säulchen von 100 ng OTA deutlich überschritten und das Ergebnis fiel somit falsch zu niedrig aus, da OTA nicht mehr von der Festphase zurückgehalten werden kann und verloren ging.

Bei der Prüfung auf Spezifität mittels MS schienen die Ergebnisse zunächst vielversprechend zu sein. Das aufgenommene Massenspektrum des unverdünnten OTA-Standards zeigt den Basispeak von Ochratoxin A bei einem Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  von 404,1 und die aufgrund der Fragmentierung wahrscheinlichste Summenformel von  $C_{20}H_{19}ClNO_6$ . Ochratoxin A hat ein Molekulargewicht von 403,8 g/Mol und die Summenformel  $C_{20}H_{18}ClNO_6$ , da ein sogenanntes  $M^+$ -Spektrum aufgenommen wurde, bei dem das zu analysierende Molekül mit einem Proton positiv ionisiert wird. Daraus ergibt sich der zusätzliche Wasserstoff in der Summenformel. Das MS des Standards zeigt, dass es sich dabei tatsächlich um Ochratoxin A handelt.

Die anderen drei Spektren zeigen den verdünnten Standard, dessen Konzentration 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  OTA entspricht, den Blindwert (Lösung A) sowie die Probe. Alle drei Spektren sehen sehr ähnlich aus, bei keinem ist ein Ochratoxin-Peak zu sehen. Da bereits der verdünnte Standard zu wenig OTA enthält, um mittels MS nachgewiesen werden zu können, kann man davon ausgehen, dass die Methode zu unempfindlich für die Analyse von OTA im ppb-Bereich ist. Daher kann die Massenspektrometrie nicht zur Beurteilung der Spezifität herangezogen werden. Da auch kein Fluidextrakt, welcher nachweislich kein Ochratoxin enthält, zur Überprüfung der Spezifität herangezogen werden kann, lässt sich die Spezifität nur anhand der Ergebnisse der Standardaddition sowie der Chromatogramme der Blindlösungen abschätzen. Da bei keiner der gewählten Konzentrationen für die Wiederfindungsrate ein falsch zu hoher Wert ermittelt wurde und Blindlösungen keine Peaks im Bereich um die Retentionszeit von Ochratoxin aufweisen, kann die Methode als spezifisch betrachtet werden.

Mit einer Nachweisgrenze von 0,06 ng/mL (umgerechnet 0,30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) und einer Bestimmungsgrenze von 0,17 ng/mL (entspricht 0,85  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ist die Methode Ph.Eur. 2.8.22 empfindlich genug, Ochratoxin A zuverlässig und sicher mit einem Grenzwert von 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  aus Süßholzwurzelfluidextrakt nachweisen und quantifizieren zu können.

Die Prüfung der Messpräzision durch sechsfache Injektion aus demselben HPLC-Vial ergab eine relative Standardabweichung %RSD der Peakflächen von 0,69. Gemäß den

in der AGES geltenden EDQM-Vorschriften wird für die Messpräzision eine %RSD von <1,5% gefordert, welche in diesem Fall mit 0,69% deutlich unterschritten wird.

Für die Methodenpräzision wurden sechs getrennte Einwaagen derselben Probe extrahiert und analysiert, wobei die erhaltenen Peakflächen eine %RSD von 2,99 aufwiesen. Insgesamt kann die Methode als präzise bewertet werden.

Die im Rahmen der Prüfung auf Linearität aus 7 Konzentrationen im Bereich von 0,5-250 ng/mL Ochratoxin mittels Doppelbestimmung erhaltene Kalibriergerade weist ein Bestimmtheitsmaß  $r^2$  von 0,999940 auf, die mittlere %RSD der Peakflächen aus den Doppelbestimmungen der jeweiligen Referenzlösungen ergab 0,77. Gemäß den EDQM- Vorschriften gilt eine Kalibriergerade mit einem  $r^2 > 0,995$  als linear, die %RSD der Peakpaare soll < 1,00% sein. Da beide Kriterien klar erfüllt werden, wird die Linearität somit über den gesamten Konzentrationsbereich gewährleistet.

## 5.2. Grenzwertfindung

### 5.2.1. Allgemeines

Nach erfolgreichem Abschluss der Methodvalidierung fehlt noch ein wichtiges Detail für die Erstellung der neuen überarbeiteten ÖAB-Monographie – der Grenzwert für Ochratoxin A in Süßholzwurzelfluidextrakt. Da es im Europäischen Arzneibuch bereits eine Vorschrift zu einem ähnlichen Extrakt, *eingestellter ethanolischer Süßholzwurzelfluidextrakt*, gab und der Grenzwert mit 80 µg/kg Fluidextrakt vorgegeben war, wurde dieser Wert zunächst als Richtwert hergenommen. Da es sich bei Ochratoxin A jedoch um eine gesundheitsgefährdende Substanz handelt, welche auch über diverse Nahrungsmittel aufgenommen wird und Süßholzwurzelfluidextrakt in zahlreichen Fertigarzneimitteln enthalten ist, wurde der Grenzwert nicht einfach übernommen, sondern aufgrund toxikologischer Daten sowie Menge an Extrakt in Arzneispezialitäten, Dosierung und Dauer der Einnahme neu bewertet.

Um festzustellen, ob bei einem fiktiven Grenzwert von 80 µg/kg Fluidextrakt die tolerierbare wöchentliche Einnahmemenge an Ochratoxin A für diese Spezialitäten eingehalten würde, wurde zunächst berechnet, wie viel Extrakt bei maximaler Dosierung täglich aufgenommen wird. Die Daten zu den Maximaldosen und Dosierungsschemata wurden aus der Austria Codex Fachinformation entnommen und auf einen durchschnittlichen Patienten von 75 kg Körpergewicht berechnet. Um sicherzugehen, dass die tolerierbare Aufnahme von OTA auch bei Kindern nicht überschritten wird, wurde die Berechnung anhand von Daten der WHO über das durchschnittliche Körpergewicht von Kindern, bezogen auf das Alter, durchgeführt.

Berechnung für einen 75 kg schweren Patienten:

- 120 ng/kg x 75 kg wöchentlich → 9000 ng wöchentlich
- 9000 ng/7 Tage : 7 Tage → 1,286 µg täglich

Ausgehend von einer maximalen täglichen Aufnahme von 1,285 µg Ochratoxin A, der Menge an Süßholzwurzelfluidextrakt sowie der maximalen Dosierung der Spezialitäten wurde für jedes Produkt ein theoretischer Grenzwert an OTA berechnet, für den die tolerierbare wöchentliche Einnahme nicht überschritten würde. Folgende Werte wurden berechnet:

Tab. 18 und 19 – Übersicht zu Menge an Extrakt, Dosierung und Berechnung des theoretischen Grenzwertes

Produkt	Konzentration	Max. tägliche Dosierung	Aufnahme täglich	Theor. Grenzwert Extrakt
Wimmers Hustensaft (ab 12)	1,6 g FE / 100 g (83 ml)	4 x tgl 2 TL 4 x tgl 1 EL (> 18a)	0,192 g FE 0,768 g FE	3,48 mg / kg 1,67 mg/kg
Auers Bronchitis Elixier (ab 7, maximal für 5 Tage)	4 g FE / 100 g	3 x tgl 1 TL (ab 7a) = 19 g 4 x tgl 1 EL (ab 12 a) = 76 g	0,76 g FE 3,04 g FE 3,04 g FE	0,383 mg / kg (7a) 0,219 mg / kg (12a) 0,422 mg / kg (EW)
Auers Bronchialtropfen (ab 12, maximal für 5 Tage)	5 g FE / 100 g	3 – 4 x tgl 40 Tropfen = 6,4 g	0,32 g FE	2,09 mg / kg (12a) 4,02 mg / kg (EW)
Schwedischer Kräuterbitter	1 g FE / 100 g	3 x tgl 1 TL = 16,9 g	0,169 g FE	7,6 mg / kg
Schwedentropfen	0,030 g FE / 100 g	Vernachlässigbar (circa 285 mg / kg)		
Schwedenbitter	0,030 g FE / 100 g	Vernachlässigbar (circa 285mg / kg)		
Mixtura solvens	15 g FE / 100 g	3 x tgl 1 EL	6,75 ml FE	0,190 mg / l
Mixtura solvens forte	14,61 g FE / 100 g	3 x tgl 1 EL	6,57 ml FE	0,196 mg / l

Produkt	Konzentration	Max. tägliche Dosierung	Aufnahme täglich	Theor. Grenzwert Extrakt
Iberogast (Kinder > 3)	10 ml FE / 100ml	3 x tgl 10 Tr = 1,5 ml 3 x tgl 20 Tr = 3 ml	0,15 ml bzw. 0,3 ml FE	0,125 mg / l (3 a) 4,28 mg / l (EW)
Sidroga	120 mg TE / Stick	3-4 x tgl. 1 Tasse	0,48 g TE	2,68 mg / kg
Solvopulmin (Kinder > 4)	1,92 g FE / 100g (82 ml)	5 x tgl 1 TL 5 x tgl 1 EL (ab 12a)	0,588 g bzw. 1,764 g FE	0,364 mg / kg (4 a) 0,379 mg / kg (12 a) 0,728mg (EW)
Plantosyl Hustentropfen	25 g FE / 100 g	2 x tgl 25-30 Tr = 3 g	0,75 g FE	1,71 mg / kg
Mönchkirchner Bronchial	<i>sonstiger Bestandteil</i>			
Kräuter-Hustensaft	0,56 g FE / 100 g (83 ml)	3 x tgl 1 EL = 18 g	0,3 g FE	4,28 mg / kg
Ischler Hustentropfen	8 g FE / 100 g	3-5 x tgl 20 Tropfen = 4 g	0,32 g FE	4,02 mg / kg
Gebirgskräuter Bronchitis (Dosis EW für max. 3 Tage!)	4 g FE / 100 g	3 x tgl 2 TL (>12 a) = 12,7 g 3-4 x tgl 1 EL (EW) = 76,2 g	0,51 g FE 3,05 g FE (max. drei Tage)	1,31 mg / kg (12 a) 0,98 mg / kg (EW)

Wie den beiden Tabellen zu entnehmen ist, läge der theoretisch mögliche Grenzwert an Ochratoxin A für die in Österreich verwendeten Präparate berechnet auf ihre enthaltene Menge an Süßholzwurzelfluidextrakt im Milligramm-Bereich und damit weit über dem Wert von 80 µg/kg Extrakt. Ein Grenzwert von 80 µg OTA pro kg Fluidextrakt wäre damit aus toxikologischer Sicht sicher und unbedenklich. Auch bei einer Aufnahme von 60 ng OTA in der Woche unabhängig von Arzneimitteln, also bei maximaler Exposition laut EFSA, wäre eine Therapie mit den angeführten Präparaten sicher und würde die tolerierbare Dosis nicht überschreiten.

### 5.2.2. Grenzwert des Ausgangsmaterials und Herstellung des Extraktes

Obwohl die toxikologischen Daten sowie die Ergebnisse der Validierung für einen Grenzwert von 80µg Ochratoxin A pro Kilogramm Süßholzwurzelfluidextrakt sprechen, müssen bei der Entscheidung noch weitere Faktoren berücksichtigt werden. Bereits vor der Extraktion muss die pflanzliche Droge selbst gemäß der Vorschrift *Ph.Eur.* 2.8.22 auf OTA geprüft werden, wobei der Grenzwert auf 20 µg/kg Droge festgelegt wurde. Bei der Herstellung von Fluidextrakten ist ein Droge-Extrakt-Verhältnis (*DEV*) von 1:1-1:2 üblich ist, also ein Gewichtsteil Ausgangsmaterial entspricht einem bzw. zwei Gewichtsteilen Extrakt.

Das könnte in jener Hinsicht problematisch sein, dass ein Grenzwert für den Extrakt von 80 µg/kg aus einem Ausgangsmaterial erreicht werden könnte, das den Arzneibuchkriterien nicht entspricht. Ochratoxin wird während der Lagerung des

pflanzlichen Materials von Schimmelpilzen produziert, welche bei der Extraktion mit Ethanol/Ammoniak abgetötet werden. Da das Toxin jedoch intakt bleibt und im Extraktionsmittel gut löslich ist, kann man davon ausgehen, dass es bei der Herstellung des Fluidextraktes vollständig übergeht. Bei einem DEV von 1:1-1:2 würde das bedeuten, dass bei der Extraktion von Süßholzwurzel mit einem zu hohen OTA-Gehalt von >20 µg/kg ein Extrakt gewonnen werden kann, der dem Grenzwert von 80 µg/kg problemlos entspricht.

### *5.2.3. Entscheidung der ÖAB-Expertengruppe*

Die ÖAB-Expertengruppe, bestehend aus Vertretern der österreichischen Apothekerkammer, des Bundesministeriums für Gesundheit, der Medizinmarktaufsicht der AGES, der Universität Wien sowie der pharmazeutischen Industrie, ist für die Überarbeitung des Österreichischen Arzneibuchs verantwortlich. Sie ist sowohl zuständig für die Revision bestehender Monographien, als auch für die Entwicklung neuer Monographien. Nach der Durchführung der Methodvalidierung wurden sämtliche Ergebnisse vor der Expertengruppe vorgetragen und diskutiert und der Grenzwert für Ochratoxin A von 80 µg/kg als sicher und gut überprüfbar vorgeschlagen.

Aufgrund der Tatsache, dass bei einem Grenzwert von 80 µg/kg die theoretische Möglichkeit bestünde, Ausgangsmaterial, welches den Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs nicht entspricht zur Herstellung zu verwenden, sowie aufgrund der schwer einschätzbaren Exposition gegenüber Ochratoxin durch Lebensmittel hat die Expertengruppe des Österreichischen Arzneibuchs den Grenzwert schlussendlich auf 20 µg/kg festgelegt. Dieser Wert entspricht dem Grenzwert für das pflanzliche Ausgangsmaterial und sollte so für die pharmazeutische Industrie problemlos einzuhalten und zu prüfen sein.

### 5.3. Weitere Anpassungen der Monographie

Neben der Erweiterung der Reinheitsprüfung um die Bestimmung von Ochratoxin A in pflanzlichen Drogen wurden einige weitere Änderungen der ÖAB Monographie vorgenommen.

#### 5.3.1. Korrektur der Bezeichnung des Extrakttyps

Die neue Monographie beinhaltet die Bezeichnung *Extractum liquiritiae fluidum quantificatum*, also quantifizierter Extrakt, statt wie bisher standardisierter Extrakt (*normatum*). Die Korrektur der Bezeichnung geht auf die Vorschläge der Definition von pflanzlichen Extrakten der Expertengruppe der Ph.Eur. in Straßburg zurück, welche folgende Extrakttypen unterscheiden:

1. *standardisierte Extrakte:* werden auf einen bestimmten Gehalt an einer oder mehreren Inhaltsstoffen mit bekannter therapeutischer Aktivität eingestellt, indem inerte Substanzen beigemischt oder Chargen gemischt werden, um den gewünschten Gehalt zu erhalten.
2. *quantifizierte Extrakte:* werden auf eine bestimmte Gehaltsspanne, also einen begrenzten, festgelegten Konzentrationsbereich einer bzw. mehrerer aktiver Substanzen eingestellt. Eingestellt wird ebenfalls durch Mischen.
3. *andere Extrakte:* werden nicht auf einen bestimmten Gehalt an Inhaltsstoffen eingestellt. Für Kontrollzwecke werden Inhaltsstoffe als analytische Marker verwendet, deren Mindestgehalt in der jeweiligen Monographie definiert ist.

Da für Süßholzwurzelfluidextrakt im ÖAB eine Gehaltsspanne an der aktiven Verbindung Glycyrrhizinsäure von 0,6-1,7% gefordert wird, handelt es sich dabei um einen quantifizierten Extrakt.

### 5.3.2. Relative Dichte

Die erlaubte relative Dichte des Extraktes wurde auf Antrag der Industrievertreter von ursprünglich 1,05-1,10 auf 1,00-1,10 erweitert. Der Antrag wurde von der Expertengruppe einstimmig angenommen.

### 5.3.3. Trockenrückstand

Der Trockenrückstand wurde, ebenfalls auf Antrag der Industrievertreter, von mindestens 20% auf mindestens 10% geändert. Auch hier gab es seitens der Expertengruppe keine Einwände.

## 5.4. Neue Monographie

Die neue, überarbeitete Monographie *quantifizierter Süßholzwurzelfluidextrakt* beinhaltet die Prüfung auf Ochratoxin A mit dem festgelegten Grenzwert von 20 µg/kg OTA und wird folgendermaßen aussehen:

### **Quantifizierter Süßholzwurzelfluidextrakt**

Liquiritiae extractum fluidum quantificatum

*Extractum Liquiritiae fluidum*

#### **Definition**

Fluidextrakt aus *Liquiritiae radix* (0277).

*Gehalt:* Glycyrrhizinsäure (C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>; Mr 823): 0,6 bis 1,7%

#### **Herstellung**

Der Fluidextrakt wird gem. *Extracta* (0765) aus der Droge durch Extraktion mit Ethanol, Wasser und Ammoniak hergestellt.

#### **Eigenschaften**

*Aussehen:* Dunkelbraune, klare bis schwach trübe Flüssigkeit

*Geschmack:* süß

## Prüfung auf Identität

### Dünnschichtchromatographie (2.2.27)

*Untersuchungslösung:* 1,0 g Fluidextrakt, mit 16,0 ml Wasser *R* und 4,0 ml Salzsäure *R1* versetzt, werden 30 min lang im Wasserbad zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Erkalten wird filtriert. Filter und Rundkolben werden 60 min lang bei 105 °C getrocknet. Der Filter wird in den Rundkolben gegeben. Nach Zusatz von 20 ml Ether *R* wird 5 min lang im Wasserbad von 40 °C zum Rückfluss erwärmt. Nach dem Erkalten wird filtriert, das Filtrat zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 1,0 ml Ether *R* gelöst.

*Referenzlösung:* 5,0 mg Glycyrrhetinsäure *R* und 5,0 mg Thymol *R* werden in 5 ml Ether *R* gelöst.

*Platte:* DC-Platte mit Kieselgel F254 *R*

*Fließmittel:* konzentrierte Ammoniak-Lösung *R*, Wasser *R*, Ethanol 96% *R*, Ethylacetat *R* (1:9:25:65 V/V/V/V)

*Auftragen:* 20 µl; bandförmig

*Laufstrecke:* 15 cm

*Trocknen:* an der Luft für 5 Minuten, Auswertung bei 254 nm

*Ergebnis:* Die Chromatogramme von Untersuchungs- und Referenzlösung zeigen in der unteren Hälfte die fluoreszenzmindernde Zone der Glycyrrhetinsäure.

*Detektion:* besprühen mit *Anisaldehyd-Reagenz R*, erhitzen bei 100 bis 105°C 5 bis 10 min lang, Auswertung bei Tageslicht

*Ergebnis:* Das Chromatogramm der Referenzlösung zeigt in der unteren Hälfte die violette Zone der Glycyrrhetinsäure und im oberen Drittel die rote Zone des Thymols. Das Chromatogramm der Untersuchungslösung zeigt in der unteren Hälfte eine violette Zone, die der Glycyrrhetin- Zone im

Chromatogramm der Referenzlösung entspricht, sowie im oberen Drittel die gelbe Zone des Isoliquiritigenins, die unterhalb der des Thymols im Chromatogramm der Referenzlösung liegt. Weitere Zonen können vorhanden sein.

### **Prüfung auf Reinheit**

<i>Ethanolgehalt</i> (2.9.10):	10 bis 25 Prozent (V/V)
<i>Relative Dichte</i> (2.2.5):	1,00 bis 1,10
<i>pH-Wert</i> (2.2.3):	4,5–7,0
<i>Methanol, 2-Propanol</i> (2.9.11):	höchstens 0,05 Prozent (V/V) Methanol und höchstens 0,05 Prozent (V/V) 2-Propanol
<i>Trockenrückstand</i> (2.8.16):	mindestens 10,0 Prozent (m/m)
<i>Ochratoxin-A</i> (2.8.22):	höchstens 20 µg / kg

### **Gehaltsbestimmung**

Flüssigchromatographie (2.2.29).

*Untersuchungslösung:* 1,000 g Fluidextrakt wird mit einer Mischung von 8 Volumenteilen verdünnter Ammoniaklösung R 1 und 92 Volumenteilen Wasser R zu 50 ml verdünnt und 5 Minuten lang im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wird die Lösung durch ein 0,45 µm Membranfilter filtriert.

*Referenzlösung:* 17,0 mg Monoammoniumglycyrrhizinat CRS werden in einer Mischung von 8 Volumenteilen verdünnter Ammoniaklösung R 1 und 92 Volumenteilen Wasser R zu 100 ml gelöst.

*Säule:* Größe: l = 0,10 m, Ø = 4 mm  
Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R (5 µm)

*Mobile Phase:* 6 Volumenteilen Essigsäure 99% R, 30 Volumenteilen Acetonitril R und 64 Volumenteilen Wasser R

*Durchflussrate:* 1,5 ml · min<sup>-1</sup>

*Detektion:* Spektrometer bei 254 nm

*Einspritzen:* 10 µl

Der Prozentgehalt an Glycyrrhizinsäure wird nach folgender Formel berechnet:

$$A_1 \times m_2 \times 823 \times B$$

$$A_2 \times m_1 \times 840 \times 2$$

$A_1$  = Peakfläche von Glycyrrhizinsäure im Chromatogramm der Testlösung

$A_2$  = Peakfläche von Glycyrrhizinsäure im Chromatogramm der

Referenzlösung

$B$  = angegebener Prozentgehalt des verwendeten  
Monoammoniumglycyrrhizinats CRS

$m_1$  = Einwaage des Fluidextrakts in Gramm

$m_2$  = Einwaage Monoammoniumglycyrrhizinat CRS für die Herstellung der  
Referenzlösung in Gramm

823 = relative Molekülmasse der Glycyrrhizinsäure

840 = relative Molekülmasse des Monoammoniumglycyrrhizinats (ohne  
Kristallwasser)

### **Lagerung**

Vor Licht geschützt.

## 5.5. Fazit

Ziel dieser Diplomarbeit war es, zu überprüfen, ob die bereits vorhandene und valide Methode zur Bestimmung von Ochratoxin A für den im Österreichischen Arzneibuch *Eingestellten Süßholzwurzelfluidextrakt* anwendbar ist, um somit die ÖAB Monographie auf den neuesten Stand zu bringen und an die Standards des Europäischen Arzneibuchs anzupassen. In Anbetracht der toxikologischen Daten über Ochratoxin und der Tatsache, dass Süßholzwurzelfluidextrakt ein wichtiger Bestandteil zahlreicher Fertigarzneimittel und Spezialitäten ist, bestand dringender Handlungsbedarf, die Monographie zu überarbeiten und somit einen Maximalgehalt an OTA für Süßholzwurzelfluidextrakt einzuführen.

Nach erfolgreichem Abschluss der Methodvalidierung, die gezeigt hat, dass die bereits existente Methode zur Prüfung auf Ochratoxin A aus der Ph.Eur. direkt übernommen werden kann, hat sich die Expertengruppe der Österreichischen Pharmakopöe entschlossen, die Methode in die Monographie aufzunehmen. In der überarbeiteten Monographie mit dem neuen Titel *Quantifizierter Süßholzwurzelextrakt* wird im Rahmen der Reinheitsprüfung ein maximaler Gehalt an Ochratoxin A von 20 µg/kg Extrakt gefordert. Dadurch kann sichergestellt werden, dass bei Einhaltung der empfohlenen Dosierung sowie Anwendungsdauer von Präparaten, welche Süßholzwurzelextrakt enthalten, eine maximale Arzneimittelsicherheit für die Patienten gewährleistet ist.

## *Zusammenfassung*

Die getrockneten Wurzeln und Ausläufer des Süßholzes „Liquiritiae radix“ werden häufig als Teedroge oder als Trocken- oder Fluidextrakte in zahlreichen Fertigarzneimitteln und Spezialitäten bei Katharren der oberen Atemwege, sowie bei Magenbeschwerden oder Zwölffingerdarmgeschwüren eingesetzt; und auch auf Grund des intensiv süßlichen Geschmacks als Geschmackskorrigens in Teemischungen oder Phytopharmaka verwendet.

Die Süßholzwurzel wird häufig von *Penicillium*- und *Aspergillus*arten befallen, welche Ochratoxin A produzieren, ein in Wasser und Wasser-/Ethanolmischungen gut lösliches und sehr stabiles Mycotoxin. Ochratoxin A reichert sich nach peroraler Aufnahme vor allem in der Niere an und wirkt nephrotoxisch und kanzerogen, sowie fruchtschädigend und immunotoxisch.

Aufgrund der toxikologischen Daten fordert das Europäische Arzneibuch für Süßholzwurzel und alle daraus gewonnenen Produkte eine Bestimmung des Ochratoxingehalts mit einem Grenzwert von maximal 20 µg/kg Droge bzw. 80µg/kg Trockenextrakt. Die Monographie Eingestellter Süßholzwurzelfluidextrakt aus dem Österreichischen Arzneibuch (ÖAB) enthielt bis dato hingegen keine Vorschrift zur Prüfung auf das gesundheitsgefährdende Schimmelpilzgift.

Ziel ist dieser Diplomarbeit ist es folglich diese Monographie mit dem Anliegen der größtmöglichen Arzneimittelsicherheit hinsichtlich einer Prüfung auf Ochratoxin A zu überarbeiten, und sie an aktuelle europäische Standards anzupassen. So wird geprüft, ob die Methode „Ph. Eur. 2.8.22 Bestimmung von Ochratoxin A in pflanzlichen Drogen“ auf den Extrakt des ÖAB anwendbar ist. Ebenso soll ein Grenzwert definiert werden, welcher eine gefahrlose Anwendung von Süßholzwurzelfluidextrakt enthaltenden Präparaten gewährleistet. Neben dieser im Rahmen der Überarbeitung durchgeführten Methodvalidierung werden auch kleine Korrekturen, bzw. Anpassungen der Monographie (unter anderem an europäische Standards) vorgenommen.

Damit soll weiterhin in Österreich durch die – dem neuesten Stands der Wissenschaft entsprechende - Monographie „Extractum liquiritiae fluidum quantificatum“ für Süßholzwurzelfluidextrakt eine maximale Rohstoff- und folglich Produkt-, bzw. Arzneimittelsicherheit für den Patienten gewährleistet sein.

## *Abstract*

Many herbal medicines and proprietary medicinal products, such as remedies for cough and catarrh as well as stomach discomfort and duodenal ulcer, contain liquorice root. The dried and cut roots can be applied as tea or in the form of dry or fluid extracts after the extraction with alcohol. Because of its intense sweetness, liquorice dry extract is also used to flavour herbal drug products.

Liquorice root easily gets infested with aspergillus and penicillium species. These mould fungus produce ochratoxin A, a very stable mycotoxin which is readily soluble in water and alcohol. The toxin gets accumulated in the kidney after orally intake and causes harmful effects. The fungal toxin is known to act nephrotoxic, teratogenic, carcinogenic and also immunotoxic. Due to the toxicological data the European Pharmacopoeia demands the determination of ochratoxin A in liquorice root and extracts by the method Ph.Eur. 2.8.22 *Determination of ochratoxin A in herbal drugs*. The Austrian Pharmacopoeia contains a monography for ethanolic liquorice root extract that does not demand the testing of ochratoxin A which means that the content of the harmful substance in Austrian liquorice extracts is not regulated at all.

The purpose of this diploma thesis is the revision of the Austrian monography with the aim to adjust it to European standards and not least to guarantee the safety of patients using herbal medicinal products that contain fluid extracts from liquorice root. Therefore within the scope of this thesis, a method validation of the *Determination of ochratoxin A in herbal drugs* shall verify if the method can be applied to determine the harmful mycotoxin out of fluid extracts produced according to the Austrian Pharmacopoeia and also to define a limit for ochratoxin A in the extract.

## 6. Anhang

### Material und Methoden

#### *Methoden*

HPLC mit Fluoreszenzdetektor

Festphasenextraktion, Immunoaffinitätschromatographie

#### *Material*

- Standard: TraceCERT® Ochratoxin solution, 50 µg/mL in Benzol : Essigsäure (99:1), 1 mL Ampulle
- Proben:
  1. Pharmonta Extractum Liquiritiae Fluidum Normatum ÖAB 2015, Eingestellter Süßholzwurzelfluidextrakt 50g
  2. Gatt-Koller Extr. Liquiritiae Fluid., Süßholzfluidextrakt 100 g

#### *Geräte*

##### *1. HPLC*

- Apparatur – Waters 2695 Separations Module
- Detektor – Waters 2475 Multi  $\lambda$  Fluorescence Detector
- Säule(n) – Waters Xterra Shield RP 18 Column, 125A, 3,5 µm, 4,6 mm x 150 mm, pH Bereich 2-12

##### *2. sonstige Geräte*

- Immunoaffinitätssäulchen – VICAM OchraTest™ WB Mycotoxin Testing System
- Handystep Handdispenser – BRAND® HandyStep® electronic 1 µL – 50 mL
- Blockheizgerät – LAB-LINE® MULTI-BLOK® Heater
- Zentrifuge – Hermle Z 323
- pH-Meter – Mettler Toldedo InLab® Expert Pro pH 0...14,0....100°C
- HPLC-Wasseraufbereitungsanlage – Milipore Mili-Q® gradient

## Reagentien

- Reagentien für die Vorbereitungsschritte (Qualifizierung, Säulentest)

Bezeichnung	Lieferant	Bestellnr.	Chargenr.
Anthracen	Sigma-Aldrich Handels GmbH	141062-25G	MK BK5208V
Benzol 99,9+% für die HPLC	Sigma-Aldrich Handels GmbH	27070-9	STBF4170V
Biphenyl	Sigma-Aldrich Handels GmbH	B34656-25G	12905BHV
Chininhydrochlorid-dihydrat	VWR International GmbH	8.22194.0025	S6728094
Hexylamin	VWR International GmbH	A15663	10150641
Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse	VWR International GmbH	1.04873.1000	AM0655373 443
Naphthalin zur Synthese	VWR International GmbH	8.20846.0100	S6581146

- Reagentien für die Analyse

Ameisensäure 98-100% zur Analyse Reag. PhEur	VWR International GmbH	1.00264.1000	K43750564
Dinatriumhydrogenphosphat zur Analyse	VWR International GmbH	1.06586.0500	14D030015
Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse	VWR International GmbH	1.04873.1000	AM0655373 443
Methanol gradient grade LiChrosolv	VWR International GmbH	1.06007.2500	I800907 541
Natriumchlorid zur Analyse ACS, ISO, Reag. PhEur	VWR International GmbH	1.06404.0500	K43831304
Natriumhydrogencarbonat zur Analyse ACS, Reag. PhEur	VWR International GmbH	1.06329.0500	K43171129
Ortho-Phosphorsäure 85%	VWR International GmbH	1.00573.1000	K44614773
Schwefelsäure 96%	VWR International GmbH	85508	13B040509

weiterführende Links:

<https://www.edqm.eu/>

<https://www.ages.at/startseite/>

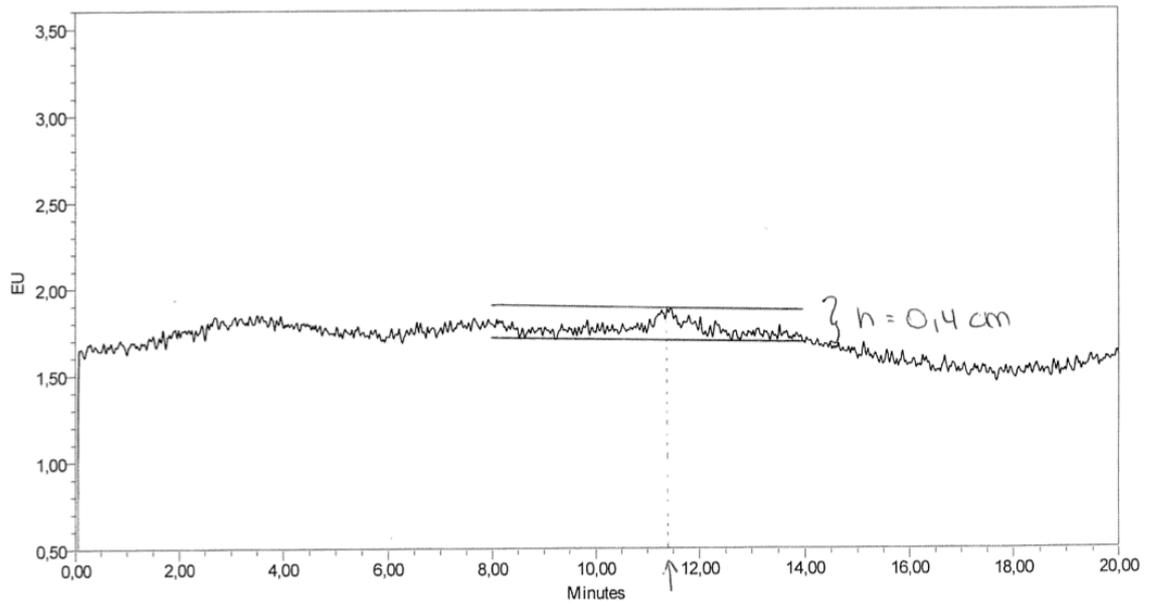
<http://www.apotheken-umschau.de/heilpflanzen/suessholz>

[https://www.apotheker.or.at/Internet/OEAK/NewsPresse\\_1\\_0\\_0a.nsf/agentEmergency!OpenAgent&p=279985DA71B34E47C1257941002D3007&fsn=fsStartHomeFachinfo&iif=0](https://www.apotheker.or.at/Internet/OEAK/NewsPresse_1_0_0a.nsf/agentEmergency!OpenAgent&p=279985DA71B34E47C1257941002D3007&fsn=fsStartHomeFachinfo&iif=0)

## Pr.Zl.: Quali FD

Bezeichnung: BW neu  
 Sample Type: Unknown  
 Vial: 1  
 Injection #: 1  
 Injection Volume: 10,00 ul  
 SampleWeight 1,00000 Dilution 1,00000  
 Run Time: 20,0 Minutes  
 Sample Set Name: 260116 forts  
 Analysendatum: 27.01.2016 11:52:44 CET  
 Analytiker: Mezgolits

Project Name: MEA Projekte\Quali Fluoreszenzdet Odi  
 System Name odi\_fluoresz  
 Proc. Chnl. Descr.: 2475ChA ex350/em397  
 Channel 2475ChA ex350/em397  
 Instrument Method Name Quali Fluoreszenzdet  
 Instrument Method Id 1193  
 Processing MethodDefault  
 Processing Method Id 1256



	Manual
1	Yes



**Pr.Zl.: Quali FD**

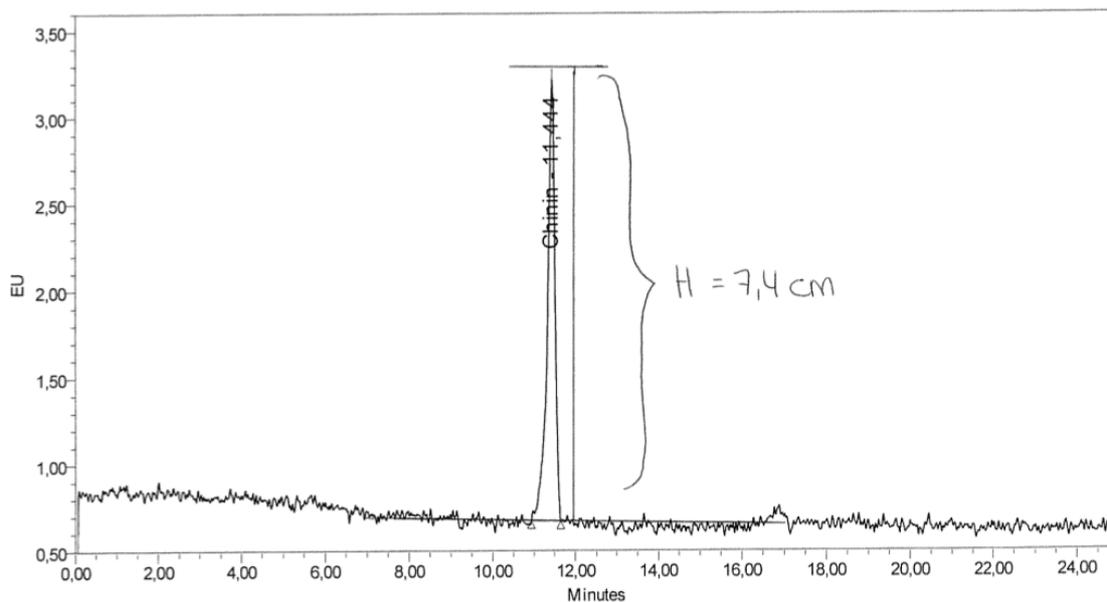
AGES PharmMed  
OMCL / PHCA

Report Method Name: Chinin\_individual\_Report

Säulenummer TREN-CA092

Bezeichnung: Chinin unfiltr neu 15 ppb  
 Sample Type: Unknown  
 Vial: 5  
 Injection #: 1  
 Injection Volume: 10,00 ul  
 SampleWeight 1,00000 Dilution 1,00000  
 Run Time: 25,0 Minutes  
 Sample Set Name: 260116 forts  
 Analysendatum: 27.01.2016 11:26:45 CET  
 Analytiker: Mezgolits

Project Name: MEA Projekte\Quali Fluoreszenzdet Odi  
 System Name odi\_fluoresz  
 Proc. Chnl. Descr.: 2475ChA ex350/em397  
 Channel 2475ChA ex350/em397  
 Instrument Method Name Quali Fluoreszenzdet  
 Instrument Method Id 1193  
 Processing MethodDefault  
 Processing Method Id 1256



	Peak Name	RT	Area	Height	Manual
1	Chinin	11,444	332815	25438	Yes

2 Verhältnisse der Signale bei der Retentionszeit von Aristolochiasäure I in der Referenzlösung a wird ermittelt. Wenn der Mittelwert der 2 Verhältnisse der Untersuchungslösung innerhalb des  $\pm 40$ -Prozent-Intervalls des Mittelwerts der 2 Verhältnisse der Referenzlösung a liegt, enthält die Untersuchungslösung Aristolochiasäure I.

**B.** Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit einem Anschluss für die Elektrospray-Ionisation (ESI) und gekoppelt an einen MS<sup>n</sup>-Analysator

Die Parameter des Massenspektrometers werden für den MS<sup>2</sup>-Modus wie folgt eingestellt:

- Vorläufer-Ion:  $m/z$  359  $[M + NH_4]^+$
- Zu überprüfende Produkt-Ionen:  $m/z$  265,  $m/z$  281 und  $m/z$  296

*Eignungsprüfung*

- Signal-Rausch-Verhältnis: mindestens 100 für die überprüften Produkt-Ionen im Chromatogramm der Referenzlösung a
- Matrixinterferenz-Prüfung: Der Mittelwert der 2 Verhältnisse der Referenzlösung b muss innerhalb des  $\pm 40$ -Prozent-Intervalls des Mittelwerts der 2 Verhältnisse der Referenzlösung a liegen; andernfalls müssen die Detektoreinstellungen geändert werden.

*Ergebnis:* Die Mittelwerte der Verhältnisse (265/281 und 296/281) der relativen Intensitäten der 3 Produkt-Ionen von Aristolochiasäure I in der Untersuchungslösung werden ermittelt. Der Mittelwert der 2 Verhältnisse der Signale bei der Retentionszeit von Aristolochiasäure I in der Referenzlösung a wird ermittelt. Wenn der Mittelwert der 2 Verhältnisse der Untersuchungslösung innerhalb des  $\pm 40$ -Prozent-Intervalls des Mittelwerts der 2 Verhältnisse der Referenzlösung a liegt, enthält die Untersuchungslösung Aristolochiasäure I.

8.0/2.08.22.00

## 2.8.22 Bestimmung von Ochratoxin A in pflanzlichen Drogen

**VORSICHT:** Ochratoxin A ist nephrotoxisch und nephrokarzinogen. Der Umgang mit Toxinen in trockener Form sollte im Abzug und unter Verwendung eines Isolators erfolgen, da sie durch ihre elektrostatischen Eigenschaften dazu neigen, sich im gesamten Arbeitsbereich zu verteilen. Glaswaren, die mit Ochratoxin A in Berührung gekommen sind, müssen durch ein Dekontaminationsverfahren gereinigt werden (siehe Anhang).

Pflanzliche Drogen, die anfällig für eine Verunreinigung durch Ochratoxin A sind, werden mit einer validierten Methode geprüft.

Die nachfolgend beschriebene Methode hat sich für Süßholzwurzel und Süßholzwurzelextrakt als geeignet erwiesen und wird als Beispiel aufgeführt. Ihre Eignung

für andere pflanzliche Drogen muss nachgewiesen oder eine andere validierte Methode muss angewendet werden.

### Methode

Flüssigchromatographie (2.2.29)

Die benötigten Glaswaren müssen aus Braunglas und frei von Detergenzien-Rückständen sein. Falls erforderlich werden sie vor Gebrauch mit einer 10-prozentigen Lösung (V/V) von Schwefelsäure R und anschließend zum vollständigen Entfernen der Säure gründlich mit destilliertem Wasser R gespült.

*Lösung A:* 80 Volumteile Wasser R, das mit wasserfreier Ameisensäure R auf einen pH-Wert von 2,3 eingestellt wurde, und 20 Volumteile Acetonitril R werden gemischt.

*Untersuchungslösung:* Eine Immunaффinitätssäule mit Antikörpern gegen Ochratoxin A wird verwendet, die eine Kapazität für mindestens 100 ng Ochratoxin A hat und eine Wiederfindung von mindestens 70 Prozent ergibt. Die Immunaффinitätssäule muss Raumtemperatur aufweisen.

2,00 g pulverisierte Droge (250) (2.9.12) werden mit 80 ml einer Lösung von Natriumhydrogencarbonat R ( $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) versetzt und 30 min lang unter Anwendung von Ultraschall extrahiert, wobei das Wasser des Ultraschallbads nach 15 min gewechselt wird. Der Extrakt wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit einer Lösung von Natriumhydrogencarbonat R ( $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) zu 100,0 ml ( $V_1$ ) verdünnt. Die Mischung wird zentrifugiert. 5,0 ml ( $V_1$ ) des klaren Überstands werden mit 30 ml natriumchloridhaltiger Phosphat-Pufferlösung pH 7,4 R 1 sorgfältig gemischt und die Mischung wird mit einer Durchflussrate von  $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  (höchstens  $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) durch die Immunaффinitätssäule geleitet. Die Säule wird zunächst mit 10 ml natriumchloridhaltiger Phosphat-Pufferlösung pH 7,4 R 1 und anschließend 2-mal mit je 10 ml Wasser R bei einer Durchflussrate von höchstens  $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  gewaschen und durch 5 bis 10 s langes Anlegen eines geringen Vakuums oder durch 10 s langes Durchblasen von Luft mit einer Injektionsspritze getrocknet. 0,5 ml Methanol R werden auf die Säule aufgetragen und durch die Einwirkung der Schwerkraft durchlaufen gelassen.

Das Eluat wird in einer 4-ml-Probeflasche aus Glas aufgefangen. Nach 30 s werden ein zweites Mal 0,5 ml Methanol R auf die Säule gegeben und durch die Einwirkung der Schwerkraft in dieselbe Probeflasche laufen gelassen. Nach 30 s wird dieser Vorgang ein drittes Mal durchgeführt. Durch Anlegen eines Vakuums oder durch Durchpressen von Luft durch die Säule wird gewährleistet, dass möglichst viel von dem aufgetragenen Lösungsmittel zurückgewonnen wird. Die vereinigten Eluate werden in einem Blockheizgerät von 40 °C unter Stickstoff vollständig zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 0,5 ml ( $V_2$ ) Lösung A aufgenommen. Wenn diese Lösung klar ist, kann sie direkt zur Analyse eingespritzt werden. Andernfalls wird sie vor dem Einspritzen durch ein Einwegfilter, zum Beispiel aus Polytetrafluorethylen mit einer Porengröße von 0,45  $\mu\text{m}$ , filtriert. Ein

Tab. 2.8.22-1: Ochratoxin-A-Referenzlösungen

Ochratoxin-A-Referenzlösung	Volumen der primären Ochratoxin-A-Stammlösung ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration von Ochratoxin A in der Referenzlösung ( $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ )
1	5000	50
2	2500	25
3	1000	10
4	500	5
5	250	2,5
Ochratoxin-A-Referenzlösung	Volumen der sekundären Ochratoxin-A-Stammlösung ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration von Ochratoxin A in der Referenzlösung ( $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ )
6	500	0,5
7	100	0,1

Einwegfilter, das nachweislich Ochratoxin A nicht zurückhält, muss verwendet werden.

**Primäre Ochratoxin-A-Stammlösung:** 1,0 ml Ochratoxin-A-Lösung R wird unter sorgfältigem Mischen mit Methanol R zu 100,0 ml gelöst.

**Sekundäre Ochratoxin-A-Stammlösung:** 10,0 ml primäre Ochratoxin-A-Stammlösung werden unter sorgfältigem Mischen mit Methanol R zu 100,0 ml verdünnt.

**Ochratoxin-A-Referenzlösungen:** Die in Tab. 2.8.22-1 aufgeführten Volumina an primärer und sekundärer Ochratoxin-A-Stammlösung werden jeweils in Probenflaschen gegeben und mit Lösung A zu 50,0 ml verdünnt.

**Kalibrierkurve:** Die Kalibrierkurve wird unter Verwendung der Ochratoxin-A-Referenzlösungen 1 bis 7, die einen Ochratoxin-A-Konzentrationsbereich von 0,5 bis  $250 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  in der pflanzlichen Droge abdecken, erstellt. Die Linearität der Kurve muss verifiziert werden. Wenn der Ochratoxin-A-Gehalt in der Probe außerhalb des kalibrierten Bereichs liegt, muss die Untersuchungslösung verdünnt werden, so dass der Gehalt an Ochratoxin A innerhalb dieses Bereichs liegt.

#### Säule

- Größe:  $l = 0,15 \text{ m}$ ,  $\varnothing = 4,6 \text{ mm}$
- Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R ( $5 \mu\text{m}$ )
- Temperatur:  $45 \text{ }^\circ\text{C}$

#### Mobile Phase

- Mobile Phase A: Wasser R, das mit Phosphorsäure 85 % R auf einen pH-Wert von 2,3 eingestellt wurde
- Mobile Phase B: Acetonitril R

Zeit (min)	Mobile Phase A (% V/V)	Mobile Phase B (% V/V)
0 – 30	80 → 40	20 → 60
30 – 35	40 → 20	60 → 80
35 – 37	20	80
37 – 40	20 → 80	80 → 20

Durchflussrate:  $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Detektion: Fluoreszenzdetektor

Empfohlene Einstellungen bei regelbaren Detektoren sind  $330 \text{ nm}$  für die Anregung und  $460 \text{ nm}$  für die Emission.

Einspritzen:  $20 \mu\text{l}$

**Berechnung:** Die Gleichung der Kalibriergeraden  $y = ax + b$  wird berechnet, wobei  $x$  die Konzentration von Ochratoxin A ( $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) und  $y$  das erhaltene Signal ( $S$ ) darstellen.

Die Konzentration  $C$  von Ochratoxin A in einer Lösung entspricht  $\frac{S-b}{a}$ .

Der Gehalt an Ochratoxin A der pflanzlichen Droge in Nanogramm je Gramm wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{V_1 \cdot V_2 \cdot C}{m \cdot V_1}$$

$m$  = Einwaage der Droge zur Herstellung der Untersuchungslösung in Gramm

$V_1$  = Volumen des verdünnten Extrakts in Millilitern

$V_2$  = Anteil des klaren Überstands nach dem Zentrifugieren, der zur Reinigung auf die Immunitätsaffinitätsäule gegeben wurde, in Millilitern

$V_3$  = Volumen der Lösung A, in welchem der Rückstand aufgenommen wurde, in Millilitern

$C$  = gemessene Konzentration von Ochratoxin A in der Untersuchungslösung in Nanogramm je Milliliter

## Anhang: Verfahren zur Dekontamination der Glaswaren

Die Glaswaren werden mit Methanol R gespült, mindestens 2 h lang in Natriumhypochlorit-Lösung R eingetaucht und anschließend gründlich mit Wasser gespült.

Beachten Sie den Hinweis auf „Allgemeine Monographien“ zu Anfang des Bands auf Seite B

Ph. Eur. 8. Ausgabe, Grundwerk 2014

### Instrument Method: Inst\_Meth\_OTA

Stored: 03.02.2016 11:14:00 CET

#### Method Information

Method Comments

Method Modified User Mezgolits  
 Method Locked No  
 Method Id 1018  
 Method Version 1  
 Method Edit User  
 Source S/W Info Empower 3 Software Build 3471 SPs Installed: Feature Release 1 DB ID: 2509517987

#### W2690/5 Instrument Setup

Type	W2690/5	Sample Temp Target	20,0
Instrument Status	On	Sample Temp Range	5,0
Channel Name	2690/5	Spurge A	0,0
Description		Spurge B	0,0
Use Channel Monitor	On	Spurge C	0,0
Monitor Parameter	System Pressure	Spurge D	0,0
Stroke Volume	50uL (flow rates <= 1.23 mL/min)	Column Temp Target	45,0
Chart Out	%A	Column Temp Range	5,0
Syringe Draw Rate	Normal	Flow Ramp	2,00
Depth Of Needle	0,0	Column choice	No Change
Degas Mode	On	Column Equil Minutes	0,00
Pump Mode	Gradient	Needle Wash	Normal
Flow	0,800	Switch 1	No Change
%A	0,0	Switch 2	No Change
%B	80,0	Switch 3	No Change
%C	20,0	Switch 4	No Change
%D	0,0	Use Events	False
High Limit	4000,0	Solvent A	
Low Limit	0,0	Solvent B	Wasser pH 2,3
Enable Sample Temp	True	Solvent C	Acetonitril
Enable Column Temp	True	Solvent D	
Bubble Detect	True		
Pre Column Volume	0,0		

#### W2690/5 Gradient Table

Time	Flow	%A	%B	%C	%D	Curve
1	0,80	0,0	80,0	20,0	0,0	
2	30,00	0,80	0,0	40,0	60,0	6
3	35,00	0,80	0,0	20,0	80,0	6
4	37,00	0,80	0,0	20,0	80,0	6
5	40,00	0,80	0,0	80,0	20,0	6
6	60,00	0,80	0,0	80,0	20,0	6
7	61,00	0,05	0,0	80,0	20,0	6

Reported by User: Marie Mezgolits (Mezgolits)  
 Report Method: Unbenannt  
 Report Method ID: 111  
 Page: 1 of 2

Project Name: MEA Projekte\MM Ochratoxin A  
 Date Printed:  
 11.02.2016  
 09:43:42 Europe/Vienna

W2475 Instrument Setup

Mode Specify Channels (2D)  
Lamp On

ChannelA

Channel Name 2475ChAx330e460  
Channel Description Channel A  
Excitation Wavelength 330(nm)  
Emission Wavelength 460(nm)  
Data Mode Emission

Analog1

Sensitivity 10000(EUFS)  
Chart Polarity Positive (+)  
Data Offset 0,0(EU)  
Voltage Offset 0(mV)  
Enable Chart Mark Yes

Analog2

Sensitivity 10000(EUFS)  
Chart Polarity Positive (+)  
Data Offset 0,0(EU)  
Voltage Offset 0(mV)  
Enable Chart Mark Yes

Data Units	Emission	Auto Zero On Event or Key Press	Yes
Data Rate	1	Auto Zero On Wavelength or Gain	Maintain Baseline
Noise Filter Type	Hamming	Run Events	Yes
Time Constant	1,0(sec)		
PMT Gain	1		
Auto Zero On Inject Start	Yes		

**EventTable**

	Time (min)	Event	Action	Channel
1	200,00	Lamp	Off	Channel A

Pulse Width 1,0(sec)  
Rect Wave Period 0,0(sec)

Revision History

Version 1 03.02.2016 11:14:00 CET User Mezgolits Created method 'Inst\_Meth\_OTA'.

**Method Version Summaries**

	Method Name	Method Type	Method Comments	Method Date	Method Modified User	Method Locked	Method Id
1	Inst_Meth_OTA	Instrument		03.02.2016 11:14:00 CET	Mezgolits	No	1018

**Method Version Summaries**

Method Version	Source S/W Info
1	Empower 3 Software Build 3471 SPs Installed: Feature Release 1 DB ID: 2509517987

Reported by User: Marie Mezgolits (Mezgolits)  
Report Method: Unbenannt  
Report Method ID: 111  
Page: 2 of 2

Project Name: MEA Projekte\MM Ochratoxin A  
Date Printed: 11.02.2016  
09:43:42 Europe/Vienna

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 – Blütenstand von Süßholz ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> ) .....	5
Abb. 2 – Süßholzwurzel getrocknet und geschnitten.....	6
Abb. 3 – Strukturformel der Glycyrrhizinsäure .....	7
Abb. 4 – <i>Aspergillus ochraeus</i> im Lichtmikroskop, 400x vergrößert .....	11
Abb. 5 – mit <i>Penicillium</i> befallener Mais.....	11
Abb. 6 – Strukturformel von Ochratoxin A.....	12
Abb. 7 und 8 – links: Peak von Chinin 15 ppb bei ca. 11,5 min, rechts: Hintergrundrauschen nach Injektion der Blindlösung (Chromatogramme in Originalgröße inkl. Ermittlung der Werte H und h, s. Anhang) .....	19
Abb. 9 – Chromatogramm der 4 Analyten Benzol, Naphthalin, Biphenyl und Anthracen im Säulentest.....	21
Abb. 10 – Darstellung der Ermittlung von Peakhöhe und Höhe des Rauschens (Ph.Eur. 2.2.46) .....	33
Abb. 11 – Wiederfindungsrate Chromatogramme der Probe gespiked mit OTA (50%, 100%, 150%).....	36
Abb. 12 – Wiederfindungsrate: Chromatogramme der Probe mit 100% Analyt.....	37
Abb. 13 – Chromatogramm der Probe ohne Zugabe von OTA-Standard (= 0%) zum Vergleich.....	38
Abb. 14 – Massenspektrum des unverdünnten OTA-Standards, c= 50 µg/mL in Benzol : Essigsäure (99:1).....	39
Abb. 15 – UV/Vis Spektrum des verdünnten OTA-Standards (c =16 ng/mL) im TOF- Analysator .....	40
Abb. 16 – UV/Vis Spektrum des Blindwertes (Lösung A) im TOF-Analysator.....	40
Abb. 17 – UV/Vis Spektrum der Probe im TOF-Analysator .....	40
Abb. 18 – Chromatogramm der Blindlösung, Höhe des Rauschens h = 0,4 cm .....	41

Abb. 19 – Chromatogramm der Referenzlösung 6, Peakhöhe H = 5,4 cm .....	41
Abb. 20 – Chromatogramm der Referenzlösung 7, Peakhöhe H = 1,3 cm .....	42
Abb. 21 – Chromatogramm der Messpräzision, 6 Injektionen derselben Lösung von OTA.....	43
Abb. 22 – Chromatogramme der Methodenpräzision, 6 getrennte Aufarbeitungen ....	45
Abb. 23 – Kalibriergerade aus den Referenzlösungen 1-7, Doppelbestimmung.....	46

## *8. Tabellenverzeichnis*

Tab. 1 - Spezialitäten mit Süßholzwurzelfluidextrakt, Daten aus der Austria Codex Fachinformation .....	8
Tab. 2 - Vergleich der Arzneibuchmonographien: links die obsoletere Ph.Eur. Monographie, rechts jene aus dem ÖAB.....	10
Tab. 3 - Ergebnisse zur Wellenlängengenauigkeit.....	17
Tab. 4 - Vorschrift zur Durchführung des Säulentests: Einstellungen und Zusammensetzung der Untersuchungslösung .....	20
Tab. 5 – Auswahl der Validierungsparameter, Übersicht aus den ICH-Guidelines.....	22
Tab. 6 - Übersicht der zu überprüfenden Validierungsparameter für die Quantifizierung einer Verunreinigung .....	23
Tab. 7 - Beschreibung der Analysebedingungen laut Ph.Eur. 2.8.22.....	29
Tab. 8 - Gradientenelution: Verhältnisse der beiden mobilen Phasen A und B in Abhängigkeit von der Zeit .....	30
Tab. 9 - Übersicht zur Prüfung auf Richtigkeit: Einwaagen, Menge an zugegebener OTA- Lösung etc. ....	31
Tab. 10 - Methodenpräzision: theoretischer OTA-Gehalt, berechnet über die Einwaage sowie die Menge zugegebener OTA-Stammlösung 1 (c = 0,5 µg/L).....	32
Tab. 11 - Referenzlösungen 1-7 für die Erstellung der Kalibriergerade (Ph. Eur. 2.8.22) .....	35
Tab. 12 - Peakflächen und berechneter OTA-Gehalt bei 100% Analytkonzentration ...	37
Tab. 13 - Erklärung der verwendeten Formel .....	38
Tab. 14 - Messpräzision: Peakflächen der 6 Injektionen inklusive Standardabweichung	44

Tab. 15 - Methodenpräzision: Peakflächen der 6 Aufarbeitungen inklusive Standardabweichung.....	45
Tab. 16 - Übersicht über die Peakflächen der Referenzlösungen inklusive der Standardabweichung der jeweiligen Peakpaare (Doppelbestimmung).....	46
Tab. 17 - Zusammengefasste Erbenisse aus den Validierungsexperimenten .....	47
Tab. 18 und 19 – Übersicht zu Menge an Extrakt, Dosierung und Berechnung des theoretischen Grenzwertes.....	51

## 9. Literaturverzeichnis

- 
- i Ulrike Rehberger „Kostbarkeiten aus der Hausapotheke“, Hpt-Verlag 1998, s. 87
  - ii <https://www.aerzteblatt.de/treffer?mode=s&wo=17&typ=1&nid=48673&s=s%FC%DFholzwurzel>, aufgerufen am 02.02.17
  - iii Jörg Grünwald, Christof Jänicke „Grüne Apotheke“, Gräfe und Unzer Verlag 2004, s. 356
  - iv Europäisches Arzneibuch, 8. Ausgabe Grundwerk 2014, Verlag Österreich 2014, Band 2, s. 2102-2103
  - v Max Wichtl (Herausgeber) „Teedrogen und Phytopharmaka – Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage“, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart, s. 347-348
  - vi Max Wichtl (Herausgeber) „Teedrogen und Phytopharmaka – Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage“, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart, s. 347
  - vii Heinrich Frohne „Heilpflanzenlexikon – Ein Leitfaden auf wissenschaftlicher Grundlage“, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2002, s. 248
  - viii D Cao u. a., „The Protective Effects of 18beta-Glycyrrhetic Acid on Helicobacter pylori-Infected Gastric Mucosa in Mongolian Gerbils“, *Biomed Res Int* 2016 (2016): 4943793, doi:10.1155/2016/4943793.

- 
- ix Rea Krause u. a., „In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Extractum liquiritiae, glycyrrhizin and its metabolites“, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, Nr. 1 (2004): 243–46, doi:10.1093/jac/dkh287.
- x <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14982#section=Top>, aufgerufen am 08.02.17
- xi R. Hänsel, H. Haas „Therapie mit Phytopharmaka“ – korrigierter Nachdruck, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, Tokyo 1984, s. 108-109
- xii Europäisches Arzneibuch, 8. Ausgabe Grundwerk 2014, Verlag Österreich 2014, Band 2, s. 2102-2103
- xiii Peter Hoffmann (Herausgeber) „Lexikon der Arzneipflanzen – Wegweiser zur Selbstbehandlung“, Herbig (Verlag) 2000, s. 150-151
- xiv Biogene Gifte – Teuscher u. Lindequist, 3. Auflage 2010, s. 105-107
- xv W. Mücke, Ch. Lemmen „Schimmelpilze – Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm 2004, s. 61
- xvi W. Mücke, Ch. Lemmen „Schimmelpilze – Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm 2004, s. 62
- xvii Herbert Hof, „Ochratoxin in Nahrungsmitteln: ein Risiko für Schwangere? ; Ochratoxin in food: a risk for pregnant women?“, *Der Gynäkologe* 48(6): 477-482 (2015), doi:10.1007/s00129-015-3709-9
- xviii <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442530#section=Top>, aufgerufen am 08.02.17
- xix André E. el Khoury und Ali Atoui, „Ochratoxin a: General overview and actual molecular status“, *Toxins* 2, Nr. 4 (2010): 461–93, doi:10.3390/toxins2040461.
- xx Frantisek Malir u. a., „Ochratoxin A: 50 years of research“, *Toxins*, 2016, doi:10.3390/toxins8070191.
- xxi Heather A. Clark und Suzanne M. Snedecker, „Ochratoxin a: Its Cancer Risk and Potential for Exposure“, *Journal of Toxicology and Environmental Health* Vol. 9 (2006): 265-296, doi:10.1080/15287390500195570
- xxii A. Studer-Rohr und Josef Schlatter, „Kinetic parameters and intraindividual variations of ochratoxin A plasma levels in humans“ 74, Nr. 2000 (2008): 499–510.

- 
- xxiii Anke Lühe u. a., „A new approach to studying ochratoxin A (OTA)-induced nephrotoxicity: Expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays“, *Toxicological Sciences* 73, Nr. 2 (2003): 315–28, doi:10.1093/toxsci/kfg073.
- xxiv <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>,  
[http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php), aufgerufen am 10.11.16
- xxv Annie Pfohl-Leszkowicz, „Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours.“, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 60, Nr. 4 (2009): 465–83, doi:10.2478/10004-1254-60-2009-2000.
- xxvi <http://www.efsa.europa.eu/de/press/news/contam060609> aufgerufen am 22.09.16
- xxvii Lühe u. a., „A new approach to studying ochratoxin A (OTA)-induced nephrotoxicity: Expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays“.
- xxviii Lea T u.a., „Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression.“, *Mycopathologia*, (1989), 107(2-3):153-9, PMID:2615793
- xxix Mariana Tozlovanu u. a., „Genotoxicity of the Hydroquinone Metabolite of Ochratoxin A : Structure-Activity Relationships for Covalent DNA Adduction“, 2006, 1241–47.
- xxx Diana Ringot u. a., „Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update“, *Chemico-Biological Interactions* 159, Nr. 1 (2006): 18–46, doi:10.1016/j.cbi.2005.10.106.
- xxxi Europäisches Arzneibuch, 8. Ausgabe Grundwerk 2014, Verlag Österreich 2014, Band 1, s. 103
- xxxii International Conference u. a., „ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES “: 1994, Nr. November 1996 (2005).
- xxxiii International Conference u. a., „ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES “: 1994, Nr. November 1996 (2005).
- xxxiv Stavros Kromidas, „Validierung in der Analytik (Die Praxis der instrumentellen Analytik)“ herausgegeben von U. Gruber und W. Klein; 1999 Wiley-VCH [ISBN 3-527-28748-5] s. 49-51

- 
- xxxv Stavros Kromidas, „Validierung in der Analytik (Die Praxis der instrumentellen Analytik)“ herausgegeben von U. Gruber und W. Klein; 1999 Wiley-VCH [ISBN 3-527-28748-5] s. 59-60
- xxxvi Stavros Kromidas, „Validierung in der Analytik (Die Praxis der instrumentellen Analytik)“ herausgegeben von U. Gruber und W. Klein; 1999 Wiley-VCH [ISBN 3-527-28748-5] s. 127-130
- xxxvii International Conference u. a., „ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES“: 1994, Nr. November 1996 (2005).
- xxxviii [https://www.inwt-statistics.de/blog-artikel-lesen/Bestimmtheitsmass\\_R2-Teil2.html](https://www.inwt-statistics.de/blog-artikel-lesen/Bestimmtheitsmass_R2-Teil2.html), aufgerufen am 28.03.17
- xxxix Europäisches Arzneibuch, 8. Ausgabe Grundwerk 2014, Verlag Österreich 2014, Band 1, s. 103
- xl Europäisches Arzneibuch, 8. Ausgabe Grundwerk 2014, Verlag Österreich 2014, Band 1, s. 391-392