



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Überarbeitung der ÖAB-Monographie von
Thymianfluidextrakt

Verfasser

Reinhard Pöllauer

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, März 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuer: Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen Leuten, die es mir ermöglicht haben mein Studium erfolgreich zu absolvieren und mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek, der mir stets hilfreiche, fachliche Unterstützung geleistet hat und jederzeit für Hilfestellungen bereit war. Auch allen anderen Mitarbeitern aus dem Department für Pharmakognosie möchte ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre danken, die sicherlich zur schnellen, erfolgreichen Absolvierung dieser Diplomarbeit beigetragen hat.

Mein größter Dank geht an meine Familie und insbesondere an meine Eltern Maria und Manfred, die mich in all den Jahren immer bedingungslos unterstützt haben. Ohne sie wäre ein erfolgreiches Studium der Pharmazie nicht möglich gewesen. Auch meinem Bruder Bernhard und seiner Lebensgefährtin Sabrina möchte ich für ihre tolle Unterstützung und Motivation danken.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Thymian	1
1.1.1. Inhaltsstoffe	2
1.1.2. Wirkung und Anwendungen	4
1.1.3. Thymian als Arzneidroge	4
2. Problemstellung	5
2.1. Überarbeitung der ÖAB Monographie Thymianfluidextrakt sowie Anpassung an das EuAB	5
2.2. Aufbau einer Monographie	5
2.2.1. Titel	5
2.2.2. Definition	5
2.2.3. Eigenschaften	5
2.2.4. Prüfung auf Identität	6
2.2.5. Prüfung auf Reinheit	6
2.2.6. Gehaltsbestimmung	6
2.2.7. Lagerung	6
3. Material und Methoden	7
3.1. Material	7
3.2. Reagentien	7
3.3. Methoden	8
3.3.1. Dünnschichtchromatographie (DC)	8
3.3.2. Gaschromatographie (GC)	10
3.3.3. Anreicherung von Substanzen durch flüssig-flüssig-Verteilung	13
3.3.4. Perkolation	14
4. Herstellung von Thymianfluidextrakt nach ÖAB	15

5. Ergebnisse	16
5.1. Prüfung auf Identität	16
5.1.1. Dünnschichtchromatographie	16
5.1.1.1. Ausarbeitung eines DC-Systems für das ätherische Öl (Thymol und Carvacrol)	16
5.1.1.2. Ausarbeitung eines DC-Systems für Phenolcarbonsäuren und Flavonoide	19
5.2. Prüfung auf Reinheit	22
5.3. Gehaltsbestimmung	23
5.3.1. Bestimmung des Thymolgehalts mit Hilfe der Gaschromato- graphie (2.2.28) und dem internen Standard Chlorthymol	23
5.3.2. Berechnungen des Thymolgehalts der Thymianfluidextrakte	33
5.3.3. Berechnung von Carvacrol und dem Verhältnis von Thymol zu Carvacrol	37
5.3.4. Richtigkeit der GC-Methode zur Bestimmung von Thymol	37
6. Diskussion	40
7. ÖAB Monographie von Thymianfluidextrakt	41
8. Vorschlag für die neue Monographie von Thymianfluidextrakt	42
9. Zusammenfassung	46
10. Summary	46
11. Abkürzungsverzeichnis	47
12. Abbildungsverzeichnis	48
13. Tabellenverzeichnis	49
14. Formelverzeichnis	50
15. Literaturverzeichnis	50
16. Curriculum vitae	51

1. Einleitung

1.1. Thymian

Die verschiedenen Arten von Thymian sind ausdauernde Halbsträucher bis Sträucher und gehören zur Pflanzenfamilie der *Lamiaceae* (Lippenblütler). Die Gattung *Thymus* ist sehr umfangreich und umfasst ca. 200 verschiedene Thymian-Arten. Drei wichtige Sorten sind *Thymus vulgaris* L. (Echter Thymian), *Thymus zygis* L. (Spanischer Thymian) und *Thymus serpyllum* L. (Quendelkraut). Das Vorkommen erstreckt sich über Europa, Afrika und das gemäßigte Asien. Besonders im Mittelmeerraum herrscht eine sehr große Artenvielfalt des Thymians vor. Bevorzugt wächst er an hellen, trockenen Stellen mit nährstoffarmen, sandigen Böden [1].



Abb. 1 *Thymus vulgaris*



Abb. 2 *Thymus zygis*



Abb. 3 *Thymus serpyllum*

1.1.1. Inhaltsstoffe

Ätherisches Öl (ÄÖ): ÄÖ sind komplexe, flüchtige Stoffgemische, die von intakten Pflanzen gebildet und in speziellen Zellen gespeichert werden. Je nach Thymianart kann der Gehalt an ÄÖ variieren. Bei *Thymus vulgaris* und *Thymus zygis* soll der Gehalt 1,0-2,5% betragen. Laut Ph. Eur. mindestens 1,2% Gesamt-ÄÖ, wovon wiederum 36-55% Thymol und 1-4% Carvacrol entsprechen muss. Weiters muss Thymol und Carvacrol zusammen laut Ph. Eur. mindestens 40% des gesamten ÄÖ ausmachen. Weitere Komponenten sind unter anderem γ -Terpinen, para-Cymen und Linalool.

Bei *Thymus serpyllum* soll laut Ph. Eur. der Gehalt an ÄÖ mindestens 0,3% betragen, wobei hier aber Carvacrol mit 20-40% und para-Cymen mit 5-15% die Hauptkomponenten sind. Der Thymolanteil in den 0,3% Gesamt-ÄÖ bei *Thymus serpyllum* beträgt lediglich 1-5% [2].

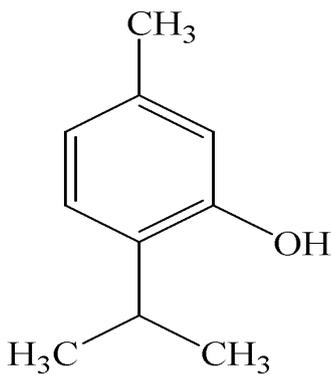


Abb. 4 Thymol

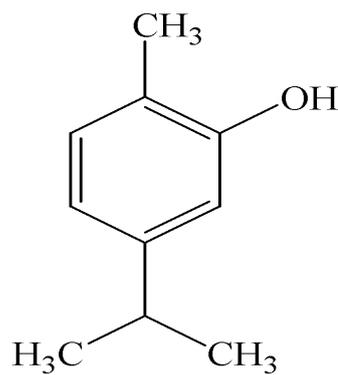


Abb. 5 Carvacrol

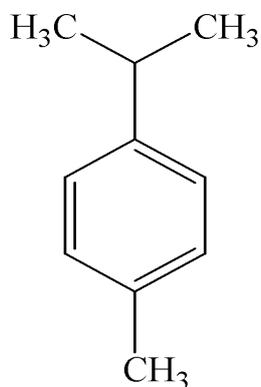


Abb. 6 p-Cymen

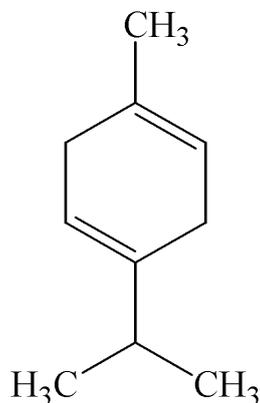


Abb. 7 γ -Terpinen

Phenole: Die Phenolcarbonsäuren Rosmarinsäure und Kaffeesäure sind weitere charakteristische Inhaltsstoffe von Thymian. Ebenso vorhanden sind Flavonoide wie z.B. Luteolin, Thymonin, Cirsilineol, etc.

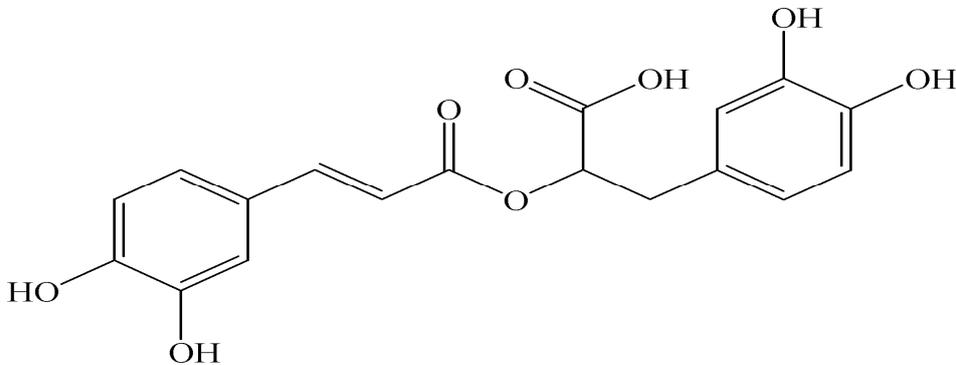


Abb. 8 Rosmarinsäure

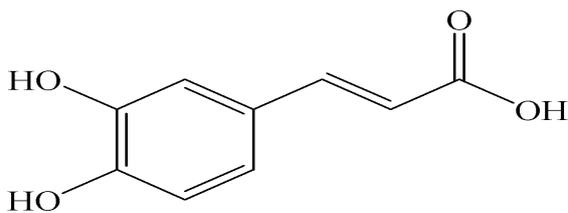


Abb. 9 Kaffeesäure

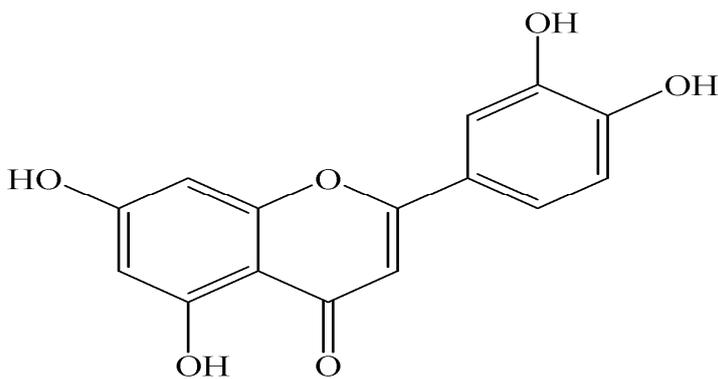


Abb. 10 Luteolin

Andere Inhaltsstoffe von Thymian sind außerdem noch Arabinogalactan sowie Triterpene.

1.1.2. Wirkung und Anwendungen

Thymian wird bei Erkrankungen der oberen Luftwege sowie Katarrhen angewendet. Die Wirksamkeit wird vor allem auf das ÄÖ zurückgeführt. Es wirkt sekretolytisch und sekretomotorisch, antitussiv, antibakteriell und antimykotisch, antiphlogistisch und auch antiviral. Bei den genannten Erkrankungen kommen verschiedenste Zubereitungen des Thymians zum Einsatz. Diese sind zum Beispiel Tee und Teemischungen, Sirup, Tinktur, Trockenextrakt sowie **Fluidextrakt**. Bei Tees beträgt die Dosierung 1,4g pro Tasse und maximal 10g pro Tag. Thymianöl wird außerdem in Hustentropfen, Salben, Mund- und Gurgelwasser, hautreizenden Einreibungen sowie Bädern eingesetzt [2].

1.1.3. Thymian als Arzneidroge

Wie am Anfang schon erwähnt, gibt es eine Vielzahl an Thymian-Arten (ca. 200), wobei allerdings nur wenige als Stammpflanze für die Arzneidroge, das Thymiankraut (*Thymi herba*), dienen. Verwendet werden die ganzen Blätter und Blüten von *Thymus vulgaris* und *Thymus zygis* bzw. auch eine Mischung beider Arten. Das Thymiankraut dient als Ausgangsmaterial der zuvor genannten Zubereitungsformen. *Thymus serpyllum* wird zwar bei den gleichen Indikationen wie die anderen beiden Arten verwendet, eignet sich aber aufgrund der Zusammensetzung seines ÄÖ nicht zur Verwendung als Arzneidroge *Thymi herba*, da der von der Ph. Eur. geforderte Gehalt an Gesamt-ÄÖ und Thymol nicht erfüllt wird [2].

2. Problemstellung

2.1. Überarbeitung der ÖAB Monographie Thymianfluidextrakt sowie Anpassung an das EuAB

Grundsätzlich hält man sich in Österreich an die Vorgaben des EuAB. Allerdings enthält das ÖAB nationale Spezialitäten, sowie auch spezielle nationale Regelungen, die im EuAB nicht vorkommen. Daher ist es sinnvoll und notwendig, Monographien aus dem ÖAB zu überarbeiten, um sie an das europäische Arzneibuch anzupassen. Es sind viele alte Monographien enthalten, die nicht mehr dem aktuellen Stand der Wissenschaft entsprechen und das Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Monographie von Thymianfluidextrakt zu bearbeiten und dem EuAB anzupassen. Für diese Bearbeitung wurde daher das EuAB als Vorlage verwendet, um eine Harmonisierung durchzuführen. Material, Reagentien sowie Methoden wurden so gut wie möglich angepasst. Für die Monographie Thymianfluidextrakt dienten unter anderem die EuAB-Monographie von Thymi herba sowie auch andere Fluidextrakt-Monographien (z.B. Süßholzwurzelfluidextrakt) als unterstützende Vorlage.

2.2. Aufbau einer Monographie

2.2.1. Titel

Zu Beginn steht der Titel der Monographie auf Deutsch, danach folgt der lateinische Titel. Da sich die lateinische Benennung des ÖAB von der des EuAB unterscheidet, ist dieser auf zwei verschiedene Weisen angegeben. Im ÖAB steht der verwendete Teil der Pflanze bzw. die Zubereitungsform zuerst und der Pflanzename danach (Extractum Thymi fluidum), während im EuAB zuerst die Pflanze genannt wird (Thymi Extractum fluidum).

2.2.2. Definition

Der zweite Punkt einer Monographie ist die Definition der Droge. Diese Definition beinhaltet, welche Stammpflanzen verwendet werden (dürfen) und welche Inhaltsstoffe beinhaltet sein müssen. Außerdem ist der Gehalt dieser Inhaltsstoffe genau definiert.

2.2.3. Eigenschaften

In diesem Punkt einer Monographie werden typische Eigenschaften der Droge bzw. Zubereitungsform genannt. Hierzu zählen unter anderem Aussehen, Geruch, Löslichkeit sowie Mischbarkeit.

2.2.4. Prüfung auf Identität

Hier wird die Droge bzw. Zubereitung mit verschiedenen Methoden analysiert. Pflanzenmaterial wird sowohl makro-, als auch mikroskopisch auf typische Merkmale untersucht. Diese werden anschließend dokumentiert und gezeichnet. Die Untersuchungen erfolgen sowohl an pulverisiertem, als auch ganzem Drogenmaterial. Eine weitere wichtige Methode zur Prüfung auf Identität ist die Dünnschichtchromatographie (DC) (siehe Pkt. 3.3.1). Für diese Art der Untersuchung wird eine sogenannte „Untersuchungslösung“ hergestellt, die mit einer „Referenzlösung“ verglichen werden kann. Die Anweisungen zur Herstellung dieser beiden Lösungen stehen ebenfalls in der Monographie.

2.2.5. Prüfung auf Reinheit

Hier werden verschiedenste Parameter untersucht und Grenzwerte dazu angegeben. Bei Pflanzenmaterial sind dies unter anderem: Fremde Bestandteile, Asche, Trocknungsverlust, etc. Bei Tinkturen und Extrakten wird auf Alkoholgehalt, sowie auf Methylalkohol und iso-Propylalkohol geprüft.

2.2.6. Gehaltsbestimmung

Dieser Teil einer Monographie beinhaltet eine Methode und Anleitung für die Gehaltsbestimmung der Wirkstoffe oder Leitsubstanzen. Unter anderem erfolgt diese über Gas- oder Flüssigchromatographie bzw. Spektrophotometrie, wobei die gesamten Parameter und Einstellungen definiert sein müssen.

2.2.7. Lagerung

Hier werden Hinweise zur Lagerung gegeben. Dazu gehören unter anderem Lichtschutz, Kälte, Trockenheit, usw.

Diese Diplomarbeit wurde anhand einer solchen „typischen“ Monographie (siehe Pkt. 2.2.1 bis 2.2.7) erstellt. Dabei wurden neue bzw. verbesserte Methoden für einige der geforderten Punkte entwickelt und angewendet. Dankenswerterweise wurden von Firmen verschiedene Thymianfluidextrakte, die teilweise auch nach unterschiedlichen Herstellungsverfahren produziert wurden, zur Verfügung gestellt. Anhand dieser Chargen konnten entsprechende Mindestanforderungen und Grenzwerte festgelegt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Zur Untersuchung standen mehrere Thymianfluidextrakte von Firmen zur Verfügung und außerdem ein nach ÖAB-Vorschrift selbst hergestellter Fluidextrakt.

Bez.	Hersteller	Kontrollnummer
F1	Gatt-Koller	1417
F2	Gatt-Koller	4683
F3	Pharmonta	PH-238/09
F4	selbst hergestellter Fluidextrakt (18.1.2010) aus gerebeltem Thymian der Firma Richter	P150617 Haltbarkeit der Ausgangsdroge bis 10/2011

Tab. 1: Fluidextrakte für die Untersuchungen der vorliegenden Diplomarbeit

3.2. Reagentien

Die verwendeten Reagentien und Lösungsmittel hatten allesamt Analysenqualität und entsprachen dem Europäischen Arzneibuch.

Toluol

Ethylacetat

Ameisensäure

Dichlormethan

Anisaldehyd-Sprühreagens

Hexan

Naturstoffreagens A

Macrogol 400

Methanol

3.3. Methoden

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden verschiedene, nachfolgend beschriebene Methoden angewandt. Für deren Anwendung musste aus dem Fluidextrakt immer eine passende Untersuchungslösung hergestellt werden. Die Anleitung dafür ist in den jeweiligen Unterpunkten der Ergebnisse (siehe Pkt. 5) zu finden.

3.3.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die DC ist eine Methode, um Stoffgemische aufzutrennen und sie anschließend zu identifizieren. Es ist eine recht einfache und trotzdem effektive Methode. Ein weiterer Vorteil ist der geringe apparative Aufwand. Schon sehr kleine Mengen einer Substanz reichen für die Analyse aus und auch der Zeitbedarf für die Entwicklung einer DC ist gering. Die Funktionsweise der Dünnschichtchromatographie beruht auf der Verteilung zwischen zwei Phasen, der mobilen und der stationären Phase. Die mobile Phase wandert an der stationären Phase vorbei und nimmt dabei die Substanzen mit. Je nach Polarität der verschiedenen Stoffe ist ihre Wanderungstrecke mit der mobilen Phase unterschiedlich lang. So können sie einfach, aber effektiv voneinander getrennt werden.

Die Materialien für die stationäre Phase sind Feststoffe. Vorwiegend werden dafür Kieselgel, Cellulose, Aluminiumoxid, Kieselgur u.a. eingesetzt. Diese werden auf eine Trägerschicht, wie zum Beispiel Glas oder Aluminiumfolien, dünn aufgebracht. Kieselgel wird am häufigsten als stationäre Phase verwendet und steht in verschiedenen Korngrößen zur Verfügung. Dadurch kann eine unterschiedliche Trennleistung der DC erreicht werden.

Als mobile Phase werden Lösungsmittel mit verschiedenen Polaritäten verwendet. Je nach Substanzgemisch, das man auftrennen möchte, wird eine bestimmte mobile Phase ausgewählt. Diese sogenannten Fließmittel sind meist Mischungen aus den Lösungsmitteln. Um eine Vorauswahl treffen zu können, bedient man sich der eluotropen Reihe, in der die verschiedenen Lösungsmittel nach steigender Elutionskraft gelistet sind.

Mit Hilfe einer Mikropipette werden einige Mikroliter der Lösung des Substanzgemisches, das man auftrennen möchte, auf die DC-Platte aufgetragen. Dies kann sowohl band- als auch punktförmig geschehen. In den meisten Fällen wird allerdings die bandförmige Auftragform verwendet. Nach dem Auftragen lässt man die Platte kurz trocknen und gibt sie anschließend in einen passenden DC-Trog bzw. eine DC-Kammer. In dieser Kammer befindet sich die mobile Phase (Fließmittel), in der die DC-Platte dann nach oben hin entwickelt wird.

Um eine bestmögliche und schnelle Entwicklung zu erreichen, sollte eine Kammersättigung des Fließmittels vorherrschen.

Durch die Wechselwirkung der mobilen Phase, die die Substanzen mittransportiert, mit der stationären Phase, werden die Komponenten nun voneinander getrennt. Dies beruht auf dem Prinzip der Adsorption und / oder Verteilung. Das Gemisch trennt sich auf der Platte in verschiedene Zonen auf, wobei jede Zone einer Substanz entspricht, die anschließend identifiziert werden kann. Dafür werden Referenzsubstanzen verwendet, die auf der DC-Platte mitaufgetragen und nach der Entwicklung als Vergleich herangezogen werden können.

Für die Auswertung einer DC stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Eine davon ist die Betrachtung unter ultraviolettem Licht (UV-Licht). Bei einer Wellenlänge von 366 nm zeigen einige Substanzen eine Fluoreszenz. Das heißt, sie werden durch das UV-Licht angeregt zu leuchten und man kann verschiedenfarbig fluoreszierende Banden erkennen. Dies gilt unter anderem für Flavonoide.

Die meisten DC-Platten beinhalten auch einen Fluoreszenzindikator, der bei 254 nm hellgrün fluoresziert. Viele Substanzen absorbieren das UV-Licht dieser Wellenlänge und es kommt somit zu einer Löschung. Das kann auf der Platte als dunkle Banden erkannt und zur Detektion herangezogen werden. Hier fluoreszieren also die Substanzen nicht, sondern löschen die Fluoreszenz des Fluoreszenzindikators der DC-Platte.

Eine weitere Art der Auswertung sind die sogenannten Sprühreagentien. Durch das Besprühen einer entwickelten Platte mit diesen Reagentien wird eine selektive Farbreaktion hervorgerufen und die Banden der einzelnen Komponenten werden dadurch in spezifischen Farben sichtbar.

Eine spezielle Art der Dünnschichtchromatographie ist die sogenannte High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). Das europäische Arzneibuch sieht in seinen Monographien bei der Prüfung auf Identität sowohl die normale DC, als auch die HPTLC vor. Der Unterschied dieser beiden Methoden liegt in der Korngröße des Trägermaterials. Bei einer HPTLC-Platte ist die Korngröße geringer und die Korngrößenverteilung gleichmäßiger als bei einer normalen DC-Platte. Außerdem liegt eine dünnere Schichtdicke vor. Die folgende Tabelle enthält einen Datenvergleich dieser beiden Methoden.

stationäre Phase	Schichtdicke in mm	mittlere Korngröße in μm
DC: Kieselgel 60	0,2 – 0,25	11 - 15
HPTLC: Kieselgel 60	0,1 – 0,2	5 - 6

Tab. 2: Vergleich von DC und HPTLC

Durch die geringere Korngröße der HPTLC kann eine bessere Trennung erzielt werden. Die Auftragemenge der Analysensubstanz ist geringer und auch die Laufstrecke kann dadurch verkürzt werden, was wiederum zu einer Reduktion der Entwicklungszeit führt. Die Detektion funktioniert genauso wie bei einer normalen DC über UV-Licht, Sprühreagentien oder auch schon bei Tageslicht [3, 4].

3.3.2. Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie ist ein Verfahren, bei dem gasförmige Substanzen voneinander getrennt werden können. Diese Methode funktioniert aber nur dann, wenn die Analysensubstanzen im gasförmigen Zustand vorliegen, oder in den gasförmigen Zustand übergeführt werden können. Das Prinzip zur Auftrennung der Substanzen ist, wie bei der Dünnschichtchromatographie, eine Wechselwirkung einer stationären Phase mit einer mobilen Phase. Die mobile Phase bei der GC ist, wie der Name schon sagt, ein Gas. Dieses Gas sollte außerdem sehr reaktionsträge (inert) sein, um nicht mit den Analysensubstanzen zu reagieren. Zumeist wird für diesen Zweck Stickstoff verwendet. Andere Gase wie z.B. Helium könnten zwar ebenfalls verwendet werden, sind aber meist deutlich kostspieliger als Stickstoff.

Die stationäre Phase befindet sich bei der Gaschromatographie in einer sogenannten Säule. Hier werden, je nachdem in welchem Zustand die stationäre Phase in dieser Säule vorliegt, zwei Arten unterschieden. Sie kann sowohl im flüssigen, als auch im festen Zustand sein. Somit hat man entweder eine Gasflüssig-Chromatographie oder eine Gas-fest-Chromatographie. Letztere ist allerdings in der Pharmazie von geringer Bedeutung.

Die Trennung bei der Gas-flüssig-Chromatographie entsteht durch Verteilungsvorgänge. Außerdem müssen die Flüssigkeiten, die als stationäre Phase verwendet werden, spezielle Eigenschaften besitzen. Sie sollten hohe Temperaturen vertragen können und gute Viskositätseigenschaften besitzen. Verwendet werden vor allem langkettige, unpolare Kohlenwasserstoffe, unpolare bis polare Siliconverbindungen sowie polare Polyether.

Die Gaschromatographie wird mit einem Gaschromatographen durchgeführt. Er besteht aus einem Injektor bzw. Einspritzblock, in dem die Analysensubstanzen eingebracht werden, einem sogenannten Säulenofen, in dem die Säule beheizt wird, und einem Detektor. Der Detektor ist mit einem Computer verbunden, mit dem die erhaltenen Chromatogramme ausgewertet werden können. Meist dient er auch zur Einstellung und Bedienung des Gaschromatographen.

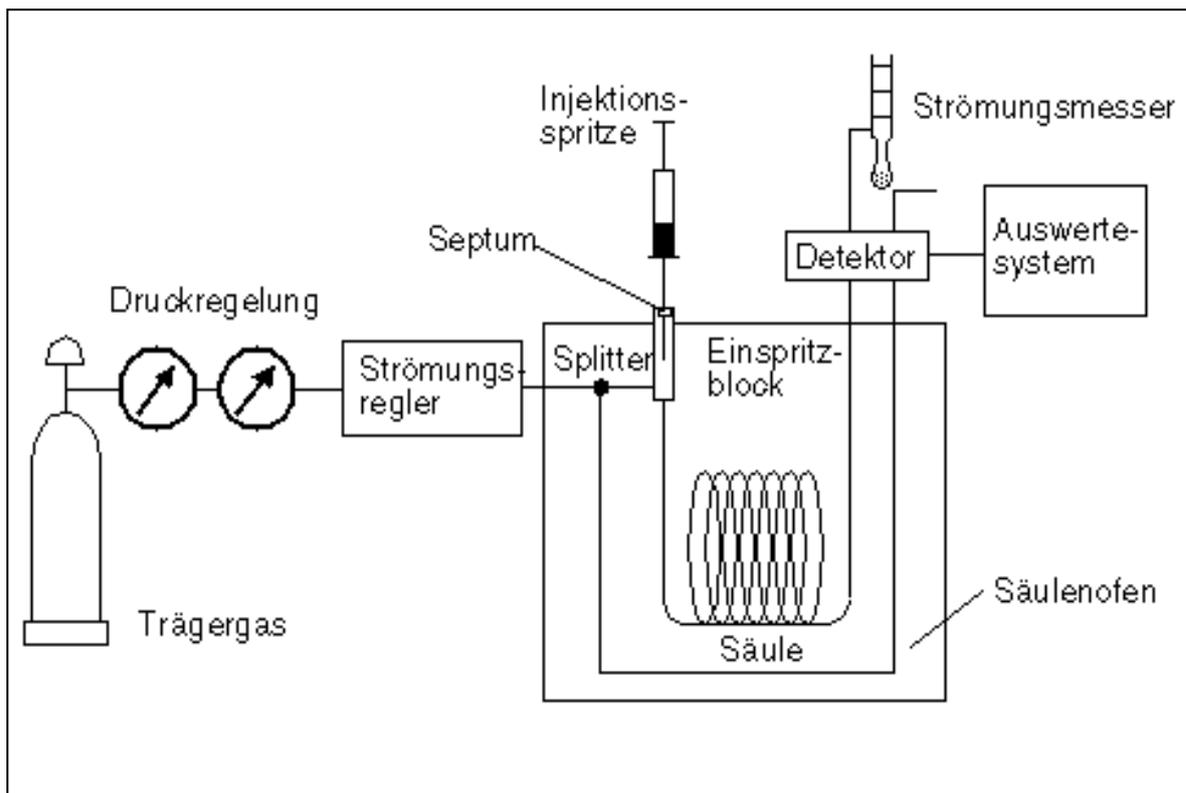


Abb. 11 Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen

Mit Hilfe einer Spritze wird eine sehr geringe Menge einer Lösung der Analysensubstanz durch ein Septum in den Injektor eingespritzt. Es handelt sich dabei meist nur um 1-2 μl . Der Injektor ist beheizt und somit verdampft die Substanz sofort. Stoffe, die normalerweise nicht flüchtig bzw. verdampfbar sind, können über Derivatisierungen in solche übergeführt werden, um sie dann auch mit Hilfe der Gaschromatographie analysieren zu können. Die verdampften Substanzen werden nun vom Trägergas mitgenommen und gelangen so in die Trennsäule, die vom Säulenofen beheizt wird. Bei den in der Gaschromatographie verwendeten Säulen wird zwischen Kapillarsäulen und gepackten Säulen unterschieden. Aufgrund ihrer besseren Eigenschaften bezüglich der Auftrennung von Stoffgemischen werden allerdings vorwiegend Kapillarsäulen verwendet. Der Aufbau einer solchen Kapillarsäule kann sehr unterschiedlich sein. Ihre Länge kann 10 bis 100 Meter betragen und auch ihr Durchmesser ist variabel von 0,1 bis 1 Millimeter. Sie bestehen zumeist aus Quarzglas und sind innen mit einer Polyimidschicht beschichtet. Auf diese Schicht wiederum ist die stationäre Phase aufgetragen. Das Innere der Säule ist hohl und somit kann das Trägergas ungehindert durchfließen. Eine geringe Belastbarkeit und auch ein hoher Kostenfaktor sind die Nachteile einer Kapillarsäule.

Die Trennsäule wird, wie vorhin schon erwähnt, vom Säulenofen beheizt. Dieser kann die Säule auf bis zu 400°C aufheizen. Für die Auftrennung der Substanzen kann man entweder eine bestimmte Temperatur oder einen Temperaturgradienten anwenden. Die mobile Phase (das Trägergas) mit den gasförmigen Substanzen strömt an der stationären Phase vorbei, wodurch Wechselwirkungen der beiden Phasen stattfinden. Die verschiedenen Komponenten des Analysengemisches werden von der stationären Phase unterschiedlich lange festgehalten, je nach dem wie stark diese miteinander wechselwirken. Dadurch entstehen für die einzelnen Substanzen spezifische Retentionszeiten, die gemessen werden können.

Nach ihrer Trennung und Eluierung aus der Säule gelangen die Substanzen, immer noch im gasförmigen Zustand, in den Detektor. Um zu verhindern, dass sie kondensieren, ist auch der Detektor beheizt. Seine Aufgabe ist es, chromatographische Signale in eine auswertbare Form umzuformen. Meistens ist der Detektor ein Flammenionisationsdetektor (FID). In ihm brennt eine Flamme die mit Wasserstoff und Sauerstoff genährt wird. Die Substanzen, die aus der Säule in den Detektor gelangen, werden in dieser Flamme verbrannt und somit ionisiert. Dadurch entsteht ein Ionenstrom zwischen zwei Elektroden, der gemessen und registriert werden kann. Das Signal ist umso größer, je mehr Substanz pro Zeiteinheit in den Detektor kommt und ionisiert wird. Dementsprechend kann mit einem FID quantifiziert werden.

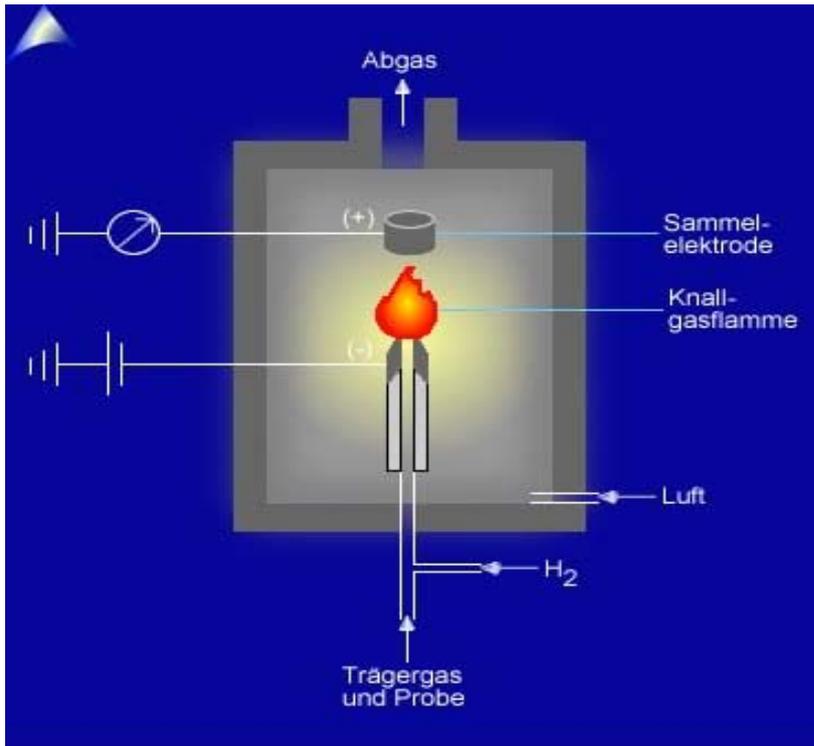


Abb. 12 Schematischer Aufbau eines Flammenionisationsdetektors (FID)

Der Gaschromatograph kann auch mit weiteren Analysengeräten gekoppelt sein. Am öftesten wird er mit einem Massenspektrometer zusammengeschlossen. Durch eine solche Kopplung können die Komponenten, die zuvor mittels GC aufgetrennt wurden, anschließend identifiziert werden, weil für jede Substanz ein typisches Massenspektrum erhalten werden kann [3, 4].

3.3.3. Anreicherung von Substanzen durch flüssig-flüssig-Verteilung

Da im Thymianfluidextrakt natürlich sehr viele gelöste Komponenten enthalten sind, die bei der Analyse stören würden, wird dieser, um das ätherische Öl herauszulösen, mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Wenn man Ethylacetat zum Ausschütteln verwendet, löst man damit die Phenolcarbonsäuren und Flavonoide aus dem Fluidextrakt. Für diese Art der Extraktion wird ein Scheidetrichter verwendet, um die organischen Phasen (Dichlormethan und Ethylacetat) bestmöglich von der wässrigen Phase (Thymianfluidextrakt) zu trennen. Diese beiden Auszüge können dann für die Dünnschichtchromatographie verwendet werden, die wiederum zur Identitätsprüfung dient.

3.3.4. Perkolation

Die Perkolation ist ein geeignetes Herstellungsverfahren zur Bereitung von Fluidextrakten bzw. Extrakten. Es handelt sich hierbei um ein erschöpfendes Extraktionsverfahren mit Hilfe von Lösungsmitteln, die normalerweise eine Mischung aus Ethanol und Wasser sind. Die Definition eines Fluidextraktes besagt, dass ein Masse- oder Volumsteil des Extraktes gleich einem Masse- oder Volumsteil der Droge ist. Falls nach der Herstellung erforderlich, werden die Extrakte anhand dieser Richtlinien eingestellt. Das Prinzip einer Perkolation beruht auf der Diffusion. Bei der Diffusion wandern Substanzen von einem Ort hoher Konzentration zu einem Ort niedrigerer Konzentration, bis ein Gleichgewichtszustand vorherrscht. Wenn dieser erreicht ist, endet der Vorgang. Das heißt, dass Stoffe aufgrund eines Konzentrationsgradienten vom pflanzlichen Ausgangsmaterial in das Lösungsmittel wandern, bis dort die selbe Konzentration vorherrscht. Da es sich bei der Perkolation um ein erschöpfendes Extraktionsverfahren handelt und immer wieder frisches Lösungsmittel zugegeben wird, kann sich nie ein endgültiges Konzentrationsgleichgewicht einstellen, sondern werden nach und nach die gesamten Wirkstoffe aus dem Ausgangsmaterial extrahiert. Um die Perkolation durchzuführen benötigt man einen Perkolator. Dieser ist, im Wesentlichen, eine Glassäule mit einem Absperrhahn am unteren Ende, in die das Drogenmaterial gefüllt wird. Dieses muss, bevor es in den Perkolator gebracht wird, vorbehandelt werden. Die Droge sollte nämlich vor der Füllung gut durchfeuchtet sein, da sich das Volumen der Pflanzenzellen bei Flüssigkeitszufuhr oft vergrößert. Wenn dies erst im Perkolator geschieht, kann dieser zerspringen. Außerdem bewirkt dieses Durchfeuchten auch eine Quellung der pflanzlichen Zellwände und die Inhaltsstoffe können dadurch schneller und besser aus der Droge extrahiert werden. Der Ausflussteil des Perkolators wird mit Watte gestopft, um zu verhindern, dass Drogenpartikel mit dem Lösungsmittel ausgeschwemmt werden. Weiters sollte ca. $\frac{3}{4}$ des Volumens des Perkolators mit Droge, ohne Lufträume dazwischen, gefüllt sein. Um dies zu gewährleisten wird sie leicht angepresst. Oben auf die Droge gibt man ein zugeschnittenes Filterpapier, um zu vermeiden, dass beim Begießen mit Lösungsmittel alles aufgewirbelt wird. Nach diesen Vorbereitungen wird nun bei geöffnetem Hahn so viel Extraktionsmittel auf den Inhalt des Perkolators gebracht, dass die Flüssigkeit zwei bis drei Zentimeter über der Droge steht. Das Extraktionsmittel wandert nach unten und nachdem der erste Tropfen aus dem Hahn gelaufen ist, wird dieser geschlossen. Der zugedekte Perkolator wird 24 Stunden stehen gelassen. Danach beginnt man mit dem Auszug, wobei eine ungefähre Tropfgeschwindigkeit von 1ml/min vorliegen sollte, ohne dass die Droge dabei trocken läuft. Das heißt, man fügt während der Perkolation immer wieder frisches Extraktionsmittel zu.

Wenn die Extraktion abgeschlossen ist, wird der Rückstand abgepresst und die Pressflüssigkeit mit dem Perkolat vereinigt. Diese vereinigten Auszüge werden im Kühlschrank mindestens drei Tage stehengelassen, wobei sich noch kleine Teilchen absetzen können, die abfiltriert werden [5].

4. Herstellung von Thymianfluidextrakt nach ÖAB

Für diese Diplomarbeit wurden nicht nur zur Verfügung gestellte Handelsmuster, sondern auch ein eigener Thymianfluidextrakt, der nach ÖAB-Richtlinien hergestellt wurde, verwendet.

100 Teile Thymiankraut wurden mit einer Mischung aus 40 Teilen Ethanol (96%), 40 Teilen gereinigtem Wasser und 20 Teilen Glycerin (85%) gleichmäßig durchfeuchtet und 12 Stunden lang in einem geschlossenem Gefäß stehen gelassen. Dann wurde das befeuchtete Thymiankraut in einen passenden Perkulator gefüllt, sodass dieser zu ca. $\frac{3}{4}$ gefüllt war. Der Ausfluss war mit Watte gestopft und die Droge wurde leicht angepresst, um Lufträume zu vermeiden. Oben wurde sie abschließend mit einem zugeschnittenen Filterpapier bedeckt. Als Extraktionsmittel zur Herstellung des Thymianfluidextraktes diente eine Mischung von Ethanol und gereinigtem Wasser im Verhältnis 1:4. Bei geöffnetem Hahn des Perkolators wurde soviel Extraktionsmittel auf die Droge gegossen, dass diese zwei bis drei Zentimeter bedeckt war. Nach dem ersten Tropfen des Extraktes aus dem Hahn wurde dieser zuge dreht, der Perkulator mit Parafilm verschlossen und 24h so stehen gelassen. Jetzt wurde der Hahn wieder geöffnet und das Thymiankraut mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 1ml/min perkoliert, ohne dass die Droge dabei trocken lief. Es wurde so lange extrahiert, bis man 85 Teile Perkolat erhalten hatte, den sogenannten Vorlauf. Dieser wurde zur Seite gestellt und gut aufbewahrt. Jetzt mussten noch zwei Teilperkolate (Nachlauf) produziert werden, wobei ein Teilperkolat 100 Teilen entspricht, d.h. dem Gewicht des eingesetzten Thymiankrautes. Nachdem diese gewonnen waren, wurde der Drogenrückstand aus dem Perkulator in einer Presse abgepresst und die Pressflüssigkeit ebenfalls gesammelt. Die beiden Teilperkolate sowie die Pressflüssigkeit wurden nun am Rotovapor auf insgesamt 15 Teile eingengt. Man beginnt bei diesem Einengen mit der Pressflüssigkeit, dann kommt das zweite Teilperkolat und danach das erste Teilperkolat. Man geht dabei also von der niedrigsten zur höchsten Konzentration vor. Nachdem die Pressflüssigkeit und die Teilperkolate auf die 15 Teile eingengt waren, wurden diese mit dem Vorlauf vereinigt. Der so gewonnene Fluidextrakt wurde noch einige Tage im Kühlschrank stehen gelassen, um Schwebstoffe absetzen zu lassen. Am Ende filtrierte man diese ab und der Fluidextrakt war fertig [5].

5. Ergebnisse

5.1. Prüfung auf Identität

5.1.1. Dünnschichtchromatographie

Für die Prüfung auf Identität von Thymianfluidextrakt wurden in dieser Diplomarbeit zwei unterschiedliche Systeme für die DC entwickelt. Eines bezieht sich auf das ätherische Öl mit den Hauptinhaltsstoffen Thymol und Carvacrol. Das andere System ist für Phenolcarbonsäuren (Rosmarinsäure und Kaffeesäure) bzw. Flavonoide (Luteolin) geeignet. Diese Stoffe wurden ausgesucht, weil es typische Inhaltsstoffe im Thymiankraut sind. Da im Extrakt neben diesen Stoffen, die mit Hilfe der DC nachgewiesen werden sollten, auch noch einige andere Substanzen vorhanden sind, musste dieser für die jeweiligen Systeme noch vorbearbeitet werden, um eine geeignete Untersuchungslösung zu erhalten. Zu diesem frühen Zeitpunkt der Diplomarbeit stand nur der Fluidextrakt F1 (Gatt-Koller) zur Verfügung.

5.1.1.1. Ausarbeitung eines DC-Systems für das ätherische Öl (Thymol und Carvacrol)

Für die Herstellung der Untersuchungslösung wurde in einem Scheidetrichter der Fluidextrakt mit Dichlormethan im Verhältnis 3:1 ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde anschließend für die Analyse mit DC und HPTLC weiterverwendet. Als Referenzsubstanzen dienten Thymol und Carvacrol. Referenzlösung a enthielt 10mg Thymol in 10ml Dichlormethan und Referenzlösung b enthielt 20µl Carvacrol in 10ml Dichlormethan. Als stationäre Phasen wurden sowohl DC-Platten mit Kieselgel F₂₅₄ (Korngröße 5 bis 40 µm, 5 x 20 cm), als auch HPTLC-Platten mit Kieselgel F₂₅₄ (Korngröße 2 bis 10 µm, 10 x 10 cm) verwendet. F₂₅₄ ist ein Fluoreszenzindikator bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Die Laufstrecke auf den DC-Platten betrug 18 cm und auf den HPTLC-Platten 8,5 cm. Als mobile Phase bzw. Fließmittel diente Dichlormethan. Hier orientierten wir uns an der EuAB Monographie Thymi herba, wo ebenfalls für die DC von Thymol und Carvacrol Dichlormethan als Fließmittel angewendet wird. Die Auftragemenge der Untersuchungslösung betrug bei der DC 15 µl bandförmig und bei der HPTLC 10 µl bandförmig. Nach der Entwicklung ließ man die Platten für ca. fünf Minuten an der Luft trocknen und konnte anschließend detektieren.

Für dieses System standen zwei Arten der Detektion zur Verfügung. Im ultravioletten Licht bei 254nm konnte man die fluoreszenzmindernden Zonen des Thymols und Carvacrols erkennen. Allerdings kann es auch passieren, dass die Zone von Carvacrol nur sehr schwach oder auch gar nicht zu sehen ist. Weiters kann sie von der Zone des Thymols überdeckt und deshalb nicht immer sichtbar sein. Außer den beiden Zonen des Thymols und Carvacrols waren im unteren Drittel der Untersuchungslösung auch noch weitere fluoreszenzmindernde Banden zu erkennen.

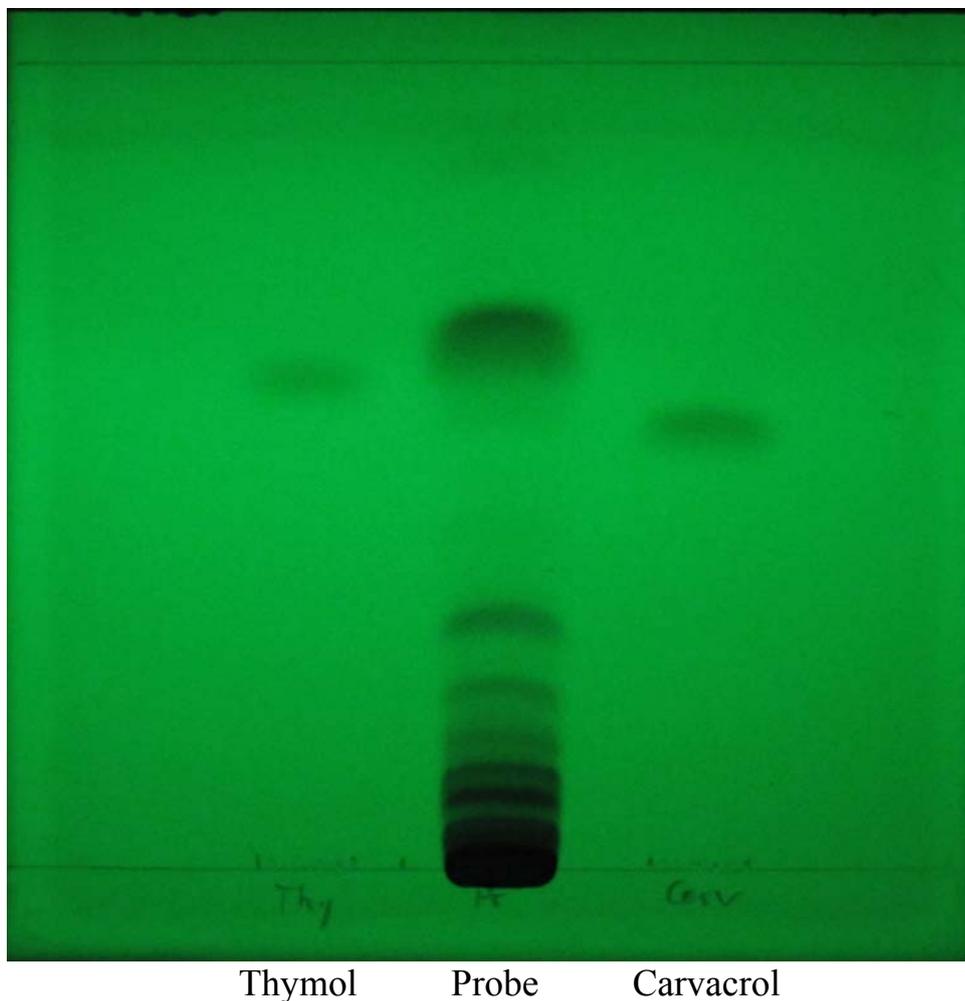


Abb. 13 HPTLC für das ätherische Öl aus Thymianfluidextrakt bei 254 nm

Die zweite Art der Detektion war das Besprühen der Platten mit Anisaldehyd-Reagens nach ihrer Entwicklung. Danach wurden sie unter Beobachtung wenige Minuten auf 100-105°C erhitzt und anschließend bei Tageslicht betrachtet. Man erkannte deutlich die orange bis rote Zone des Thymols. Carvacrol kann, muss aber auch hier nicht sichtbar sein. Im unteren Drittel der Platten waren einige weitere, unterschiedlich gefärbte Zonen deutlich erkennbar.

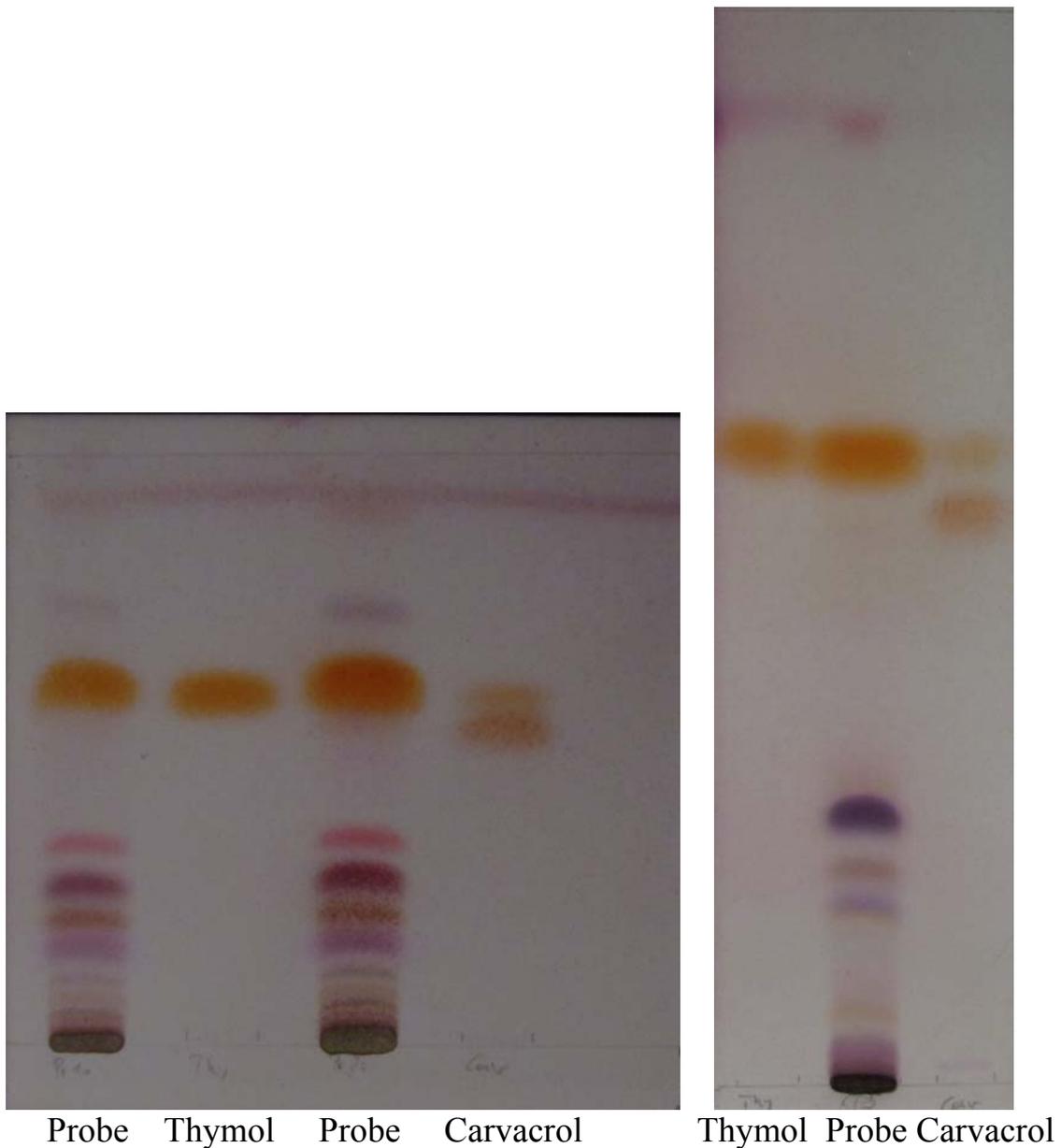


Abb. 14 HPTLC und DC für das ätherische Öl aus Thymianfluidextrakt nach Besprühen mit Anisaldehyd-Sprühreagens

5.1.1.2. Ausarbeitung eines DC-Systems für Phenolcarbonsäuren und Flavonoide

Für die Herstellung der Untersuchungslösung wurde der Fluidextrakt in einem Scheidetrichter mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Das Verhältnis von Fluidextrakt zu Ethylacetat war 1:1. Die organische Phase wurde für die DC und HPTLC weiterverwendet und aufgetragen. Als Referenzen dienten hier Rosmarinsäure und Luteolin. Referenzlösung a enthielt 1 mg Rosmarinsäure in 5 ml Methanol und Referenzlösung b enthielt 1 mg Luteolin in 5 ml Methanol. Eine weitere Phenolcarbonsäure, nämlich Kaffeesäure, war mit Hilfe dieses entwickelten Systems ebenfalls erkenn- und detektierbar. Allerdings kann es passieren, dass die Bande der Kaffeesäure von der des Luteolins nach der Entwicklung überdeckt ist. Somit wurde Kaffeesäure in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt, obwohl sie eindeutig in Thymianfluidextrakt vorhanden und detektierbar ist. Als stationäre Phasen verwendete man auch hier sowohl DC-Platten mit Kieselgel F₂₅₄ (Korngröße 5 bis 40 µm, 5 x 20 cm) als auch HPTLC-Platten mit Kieselgel F₂₅₄ (Korngröße 2 bis 10 µm, 10 x 10 cm). Die Laufstrecke auf den DC-Platten betrug 18 cm und auf den HPTLC-Platten 8,5 cm. Als mobile Phase bzw. Fließmittel wurde hier eine Mischung aus Toluol, Ethylacetat und konzentrierter Ameisensäure im Verhältnis 65:30:10 verwendet. Für die DC von Phenolcarbonsäuren und Flavonoide gibt es in der Literatur verschiedenste Vorschläge an Fließmitteln und im Zuge dieser Arbeit wurden auch etliche ausprobiert. Unter anderem wurden Mischungen von Toluol, Ethylformiat und Ameisensäure sowie Chloroform, Methanol, Eisessig und Wasser versucht. Allerdings war die Auftrennung der Untersuchungslösung mit diesen Fließmitteln nicht zufriedenstellend. Es hat sich gezeigt, dass eine Mischung von Toluol, Ethylacetat und konzentrierter Ameisensäure am besten geeignet war. Das Verhältnis dieser drei Stoffe zueinander wurde ebenfalls durch viele verschiedene Versuche optimiert, um die bestmögliche Trennung mittels DC und HPTLC zu erreichen.

Die Auftragemenge der Untersuchungslösung betrug bei der DC 20 µl bandförmig und für die HPTLC 10 µl bandförmig. Nach der Entwicklung ließ man die Platten ca. fünf Minuten an der Luft trocknen.

Für die Detektion wurden die Platten mit Sprühreagentien behandelt. Zuerst besprühte man sie mit Naturstoffreagens A und anschließend mit einer Lösung von Macrogol 400 in Methanol (50g.l^{-1}). Nach dem Besprühen konnten die Platten im ultravioletten Licht bei 365 nm ausgewertet werden. Man erkannte deutlich die blaue Zone der Rosmarinsäure, die sich im unteren Drittel befindet. Im mittleren Bereich sah man eine orange Bande, die Luteolin entspricht. Über der Luteolinbande waren außerdem noch eine rote sowie zwei blaue Banden zu sehen. Die untere dieser blauen Banden, die nur knapp über der orangen Bande des Luteolins liegt, entspricht Kaffeesäure.

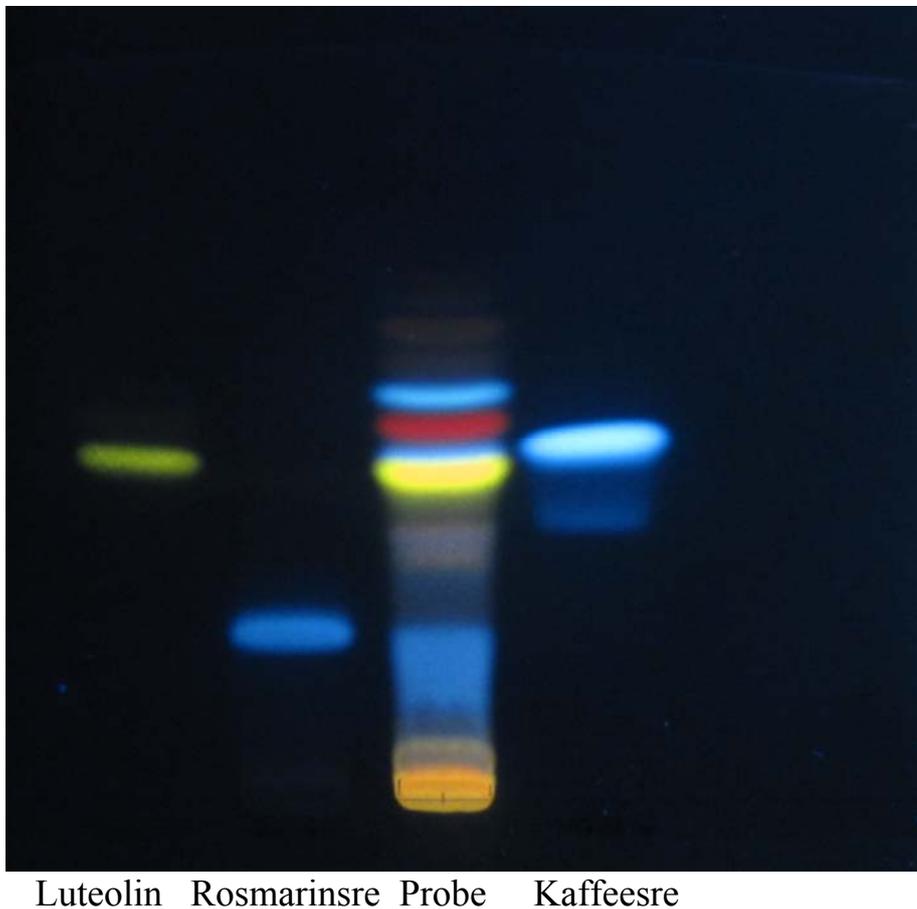


Abb. 15 HPTLC von Phenolcarbonsäuren und Flavonoiden aus Thymianfluid-extrakt nach Besprühen mit Naturstoffreagens A und Macrogol 400 bei 365 nm

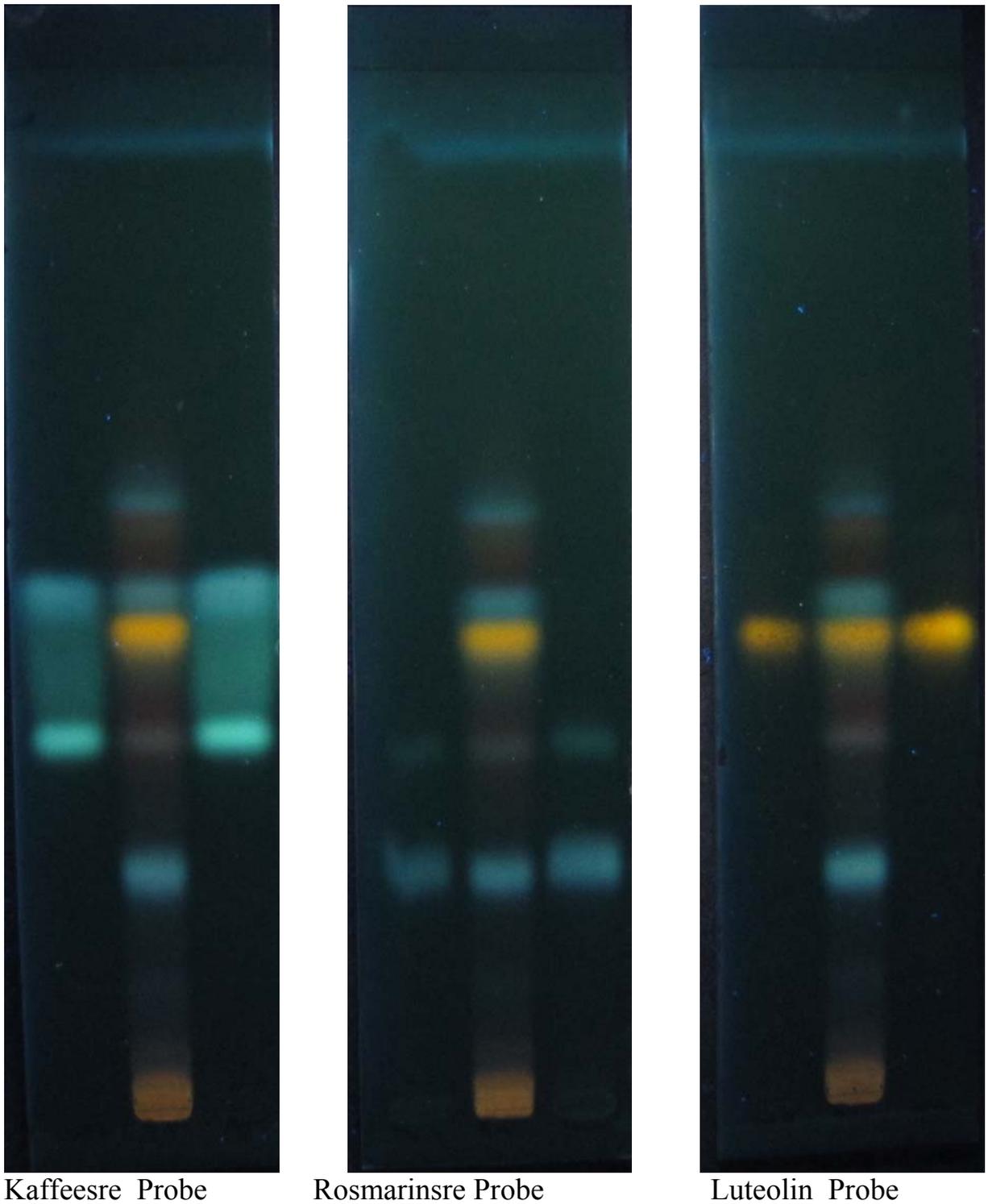


Abb. 16 DC von Phenolcarbonsäuren und Flavonoiden aus Thymianfluid-extrakt nach Besprühen mit Naturstoffreagens A und Macrogol 400 bei 365 nm

5.2. Prüfung auf Reinheit

Bei diesem Punkt der Monographie wird im Falle von Thymianfluidextrakt der Ethanolgehalt sowie das Vorliegen von Methylalkohol (Methanol) und iso-Propylalkohol (iso-Propanol) als Verfälschungen überprüft.

Der Ethanolgehalt wurde anhand der Vorschriften des EuAB Kapitel 2.9.10 der allgemeinen Methoden bestimmt. Da in einer flüssigen, ethanolhaltigen Zubereitung auch andere Stoffe gelöst sind, musste diese zuerst destilliert werden, um den Alkohol abzutrennen. Der Ethanolgehalt (in Prozent) einer Flüssigkeit ergibt sich aus den Volumsteilen Ethanol in 100 ml Flüssigkeit bei $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (V/V). Er kann aber auch in Gramm Ethanol je 100 g Flüssigkeit bestimmt werden (m/m).

Ausführung:

25,0 ml der bei $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ abgemessenen Zubereitung werden in einen Kolben gegeben, mit 100 bis 150 ml destilliertem Wasser verdünnt und mit einigen Siedesteinchen versehen. Nun werden mindestens 90 ml in einen 100 ml Messkolben destilliert. Das Destillat wird auf $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ gebracht und mit destilliertem Wasser derselben Temperatur auf 100 ml aufgefüllt. Mit Hilfe eines Pyknometers wird die relative Dichte bei $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ bestimmt. In einer Ethanolgehaltstabelle der International Organisation for Legal Metrology ist die Beziehung zwischen Dichte, der relativen Dichte und dem Ethanolgehalt bei $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ angegeben. Man bekommt also mit Hilfe der bestimmten relativen Dichte und dieser Tabelle einen Wert, der dann allerdings noch mit vier multipliziert werden muss, um den Ethanolgehalt in Prozent (V/V) zu erhalten. Das Ergebnis dieser Berechnung wird auf eine Dezimalstelle nach dem Komma gerundet. Bei Thymianfluidextrakt ist ein Gehalt an Ethanol von mindestens 33,0 % gefordert.

Die Prüfung auf Methylalkohol und iso-Propylalkohol wird anhand der Vorschriften des EuAB Kapitel 2.9.11 der allgemeinen Methoden durchgeführt. Sie erfolgt mit Hilfe der Gaschromatographie. Die untersuchte Zubereitung darf höchstens 0,05 % Methylalkohol (V/V), sowie höchstens 0,05 % iso-Propylalkohol (V/V) enthalten. Diese Vorschriften gelten natürlich auch für Thymianfluidextrakt [6].

5.3. Gehaltsbestimmung

5.3.1. Bestimmung des Thymolgehalts mit Hilfe der Gaschromatographie (2.2.28) und dem internen Standard Chlorthymol

Herstellung der Untersuchungslösung:

Schon wie bei der DC musste auch hier der Thymianfluidextrakt vorbereitet werden, um ihn für eine Analyse mittels GC zugänglich zu machen. Dafür wurden 10 ml Fluidextrakt mit einer Lösung von 10 mg Chlorthymol in 10 ml Hexan ausgeschüttelt. Anschließend wurde noch zwei mal mit je 15 ml Hexan ausgeschüttelt. Die organischen Hexanphasen wurden in einem 50 ml Messkolben gesammelt und mit Hexan bis zur Marke aufgefüllt.

Zu diesem Zeitpunkt der Diplomarbeit standen bereits mehrere Thymianfluidextrakte, die von verschiedenen Firmen zur Verfügung gestellt wurden, für die Analyse bereit. Außerdem konnte weiters ein selbst hergestellter Fluidextrakt für die Gehaltsbestimmung mittels Gaschromatographie herangezogen werden. Das Ziel dieser Untersuchungen war, für die Monographie einen Mindestgehalt an Thymol im Extrakt festzulegen und auch ein Verhältnis von Thymol zu Carvacrol zu ermitteln. Aus jedem der vorhandenen Fluidextrakte wurde eine Untersuchungslösung, wie oben beschrieben, hergestellt und der Gaschromatographie zugeführt. Anhand der erhaltenen Werte für die verschiedenen Extrakte konnte ein Mindestgehalt an Thymol festgelegt werden, sowie ein Verhältnis von Thymol zu Carvacrol. Die nachfolgende Tabelle (siehe Tab.1) enthält die verschiedenen Fluidextrakte, die zur Herstellung der Untersuchungslösungen verwendet wurden.

Bez.	Hersteller	Kontroll- bzw. Chargennummer
F1	Gatt-Koller	1417
F2	Gatt-Koller	4683
F3	Pharmonta	PH-238/09
F5	selbst hergestellter Fluidextrakt (18.1.2010) aus gerebeltem Thymian der Firma Richter	P150617 Haltbarkeit der Ausgangsdroge bis 10/2011

Als interner Standard wurde Chlorthymol verwendet. Wichtig ist, dass die Substanz, die als interner Standard verwendet wird, nicht schon von Haus aus in der Probe vorhanden ist. Zu Beginn dieser Diplomarbeit wurde nämlich zunächst Linalool als interner Standard verwendet, was sich allerdings später als nicht geeignet herausstellte, da diese Substanz in geringem Maße im Thymianfluidextrakt vorkommt. Um dies zu belegen, wurde ein Chromatogramm einer Untersuchungslösung ohne Zugabe des internen Standards aufgezeichnet und mit einem Chromatogramm einer Lösung verglichen, der Linalool zugegeben war (siehe Abb. 17 u. 18). Man sah deutlich, dass bei der Retentionszeit von Linalool auch ohne dessen Zugabe ein Peak vorhanden war.

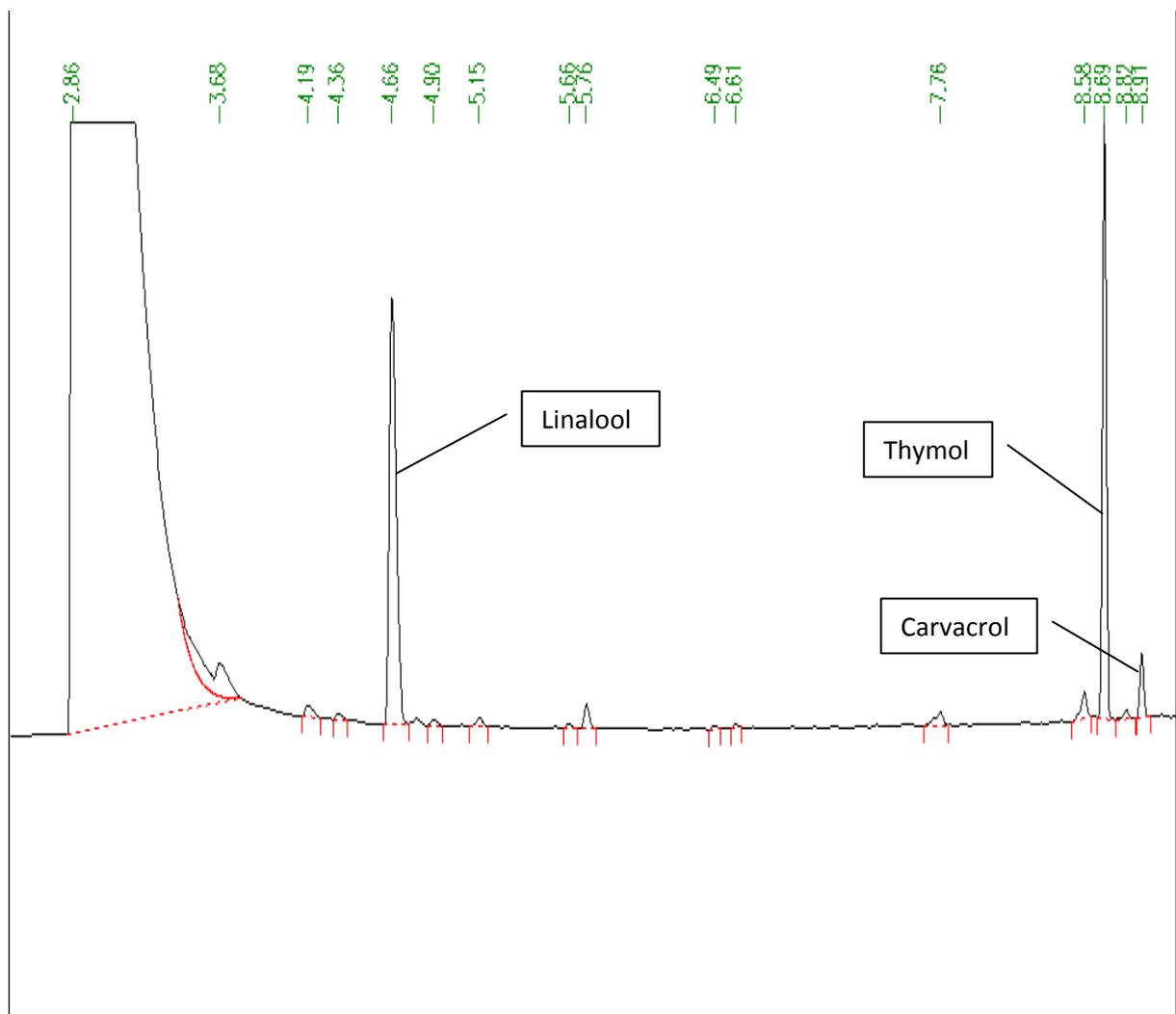


Abb.17 Gaschromatogramm mit Zugabe von Linalool als int. Standard

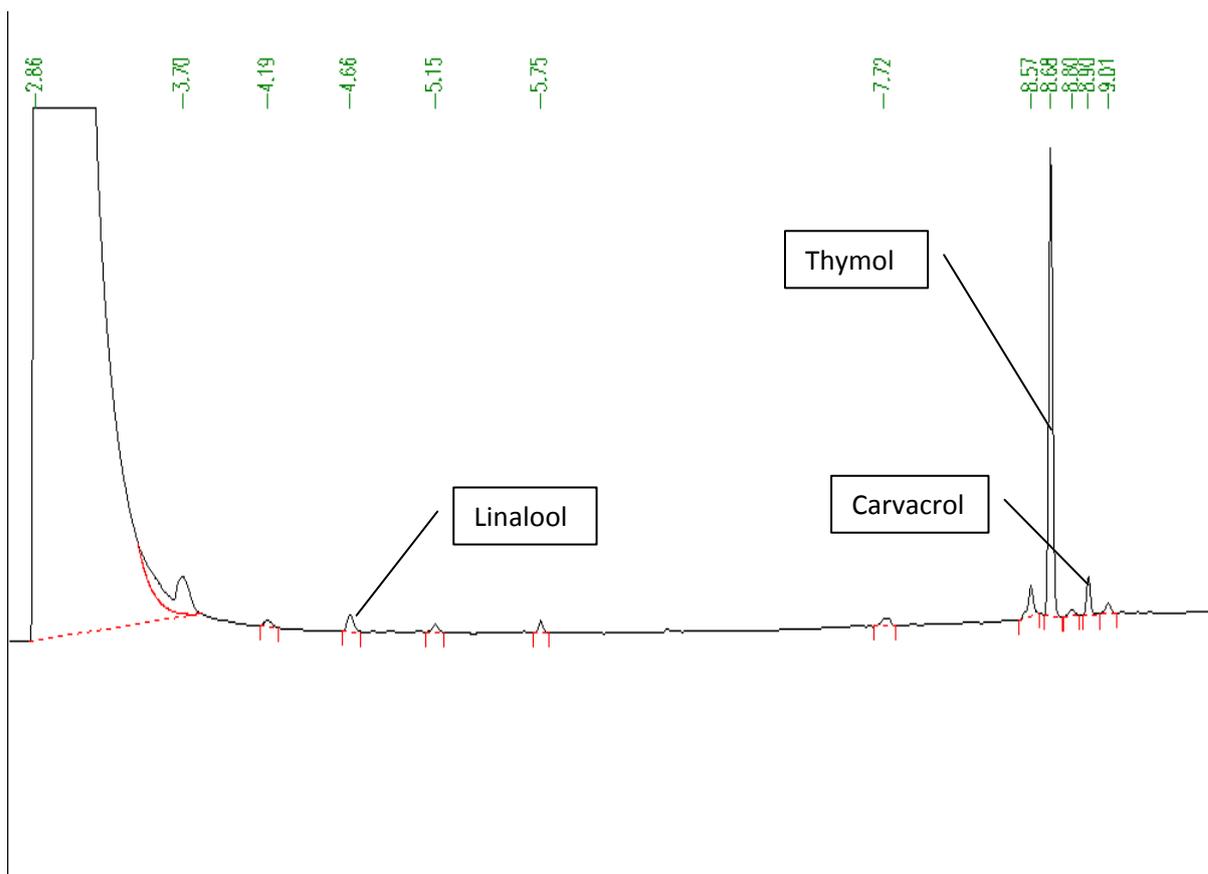


Abb. 18 Gaschromatogramm ohne Zugabe von Linalool als int. Standard

Der Vergleich dieser beiden Chromatogramme zeigte eindeutig, dass bei der Retentionszeit von 4,66 Minuten auch ohne Zugabe von Linalool ein Peak zu sehen war. Somit eignete sich diese Substanz nicht als interner Standard und ein anderer musste gefunden werden. Es wurde Chlorthymol ausgewählt. Diese Substanz ist in hoher Reinheit und billig erhältlich, sollte eine geeignete Retentionszeit aufweisen und außerdem nicht im Thymianfluidextrakt vorhanden sein. Um sicher zu gehen, dass dieser Stoff als interner Standard geeignet war, wurden wieder zwei Chromatogramme zum Vergleich erstellt, um zu zeigen, dass im Thymianfluidextrakt kein Chlorthymol vorhanden ist. Eines davon war mit Zugabe von Chlorthymol und eines ohne die Substanz. Aufgrund der anderen Eigenschaften dieses Standards sowie dessen Retentionszeit, mussten die Einstellungen des Gaschromatographen etwas abgeändert werden. Aus diesem Grund sind auch die Retentionszeiten von Thymol, Carvacrol und Linalool in den folgenden Chromatogrammen etwas anders als zuvor (siehe Abb. 19 u. 20).

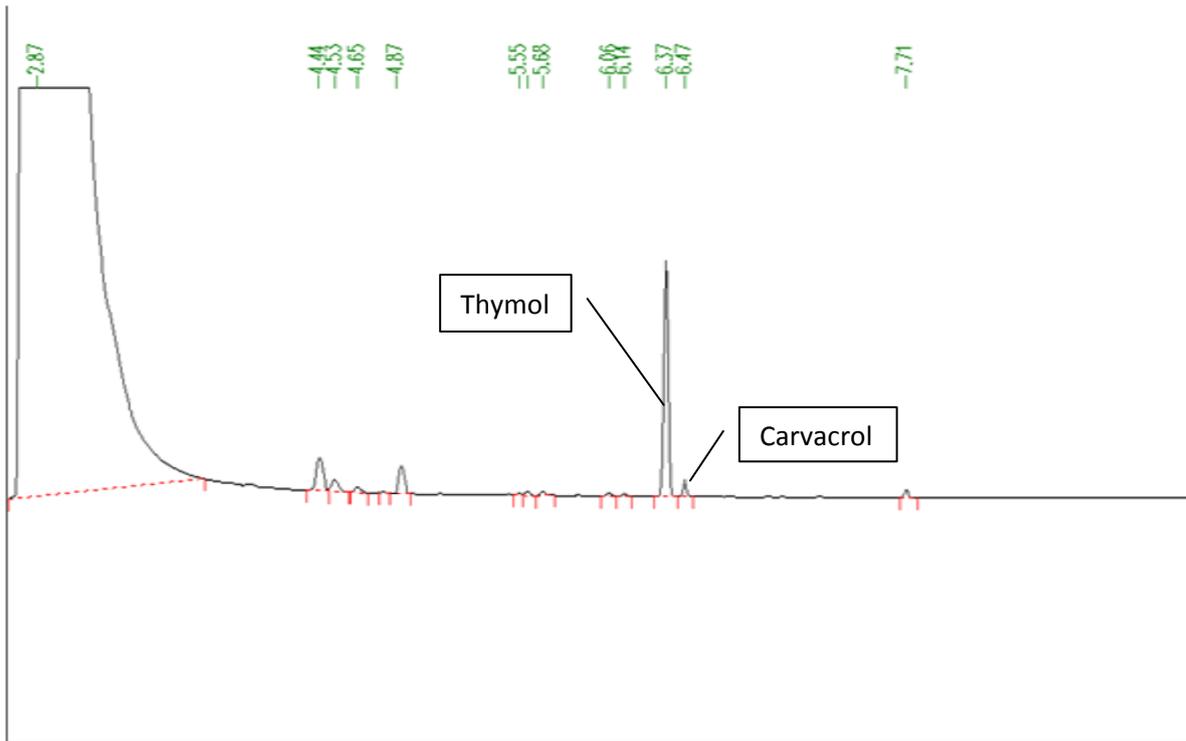


Abb. 19 Gaschromatogramm ohne Zugabe von Chlorthymol als int. Standard

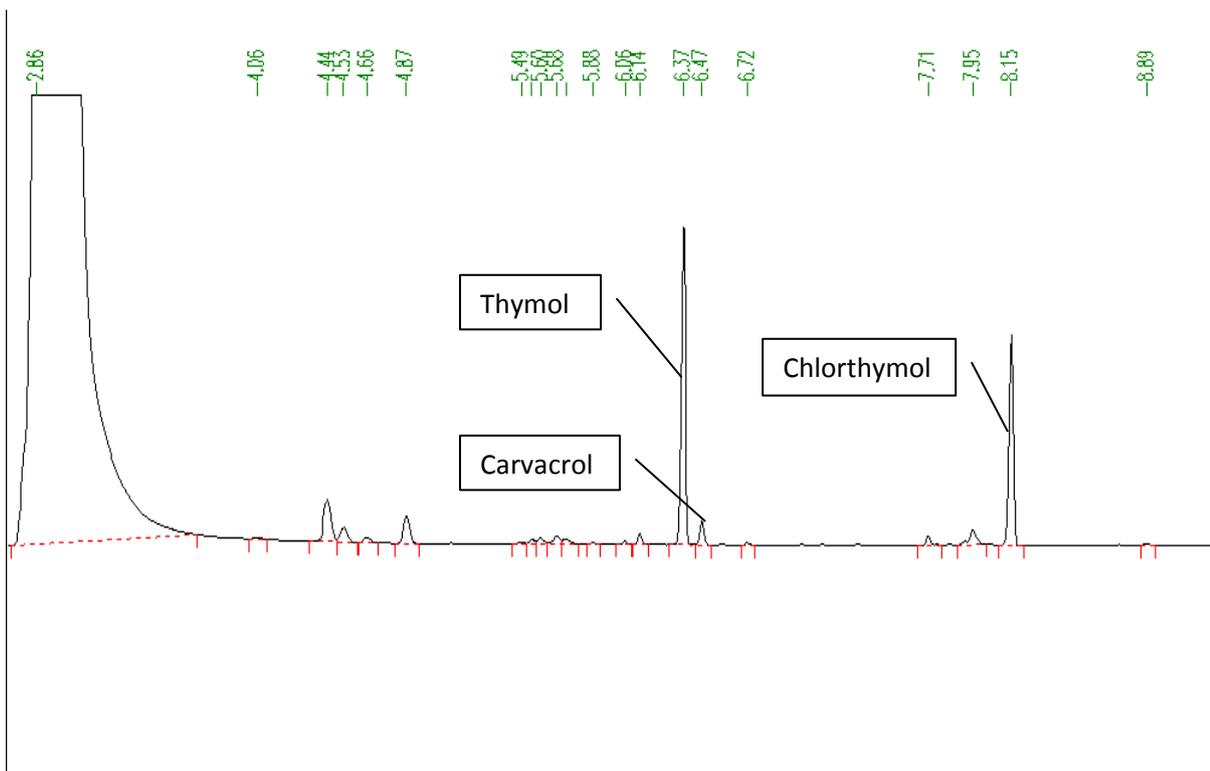


Abb. 20 Gaschromatogramm mit Zugabe von Chlorthymol als int. Standard

Im Chromatogramm der Untersuchungslösung, der Chlorthymol zugesetzt war, sah man bei der Retentionszeit von 8,15 min. einen Peak dieser Substanz. Im Vergleichschromatogramm hingegen war bei dieser Retentionszeit kein Peak vorhanden. Somit konnte Chlorthymol als interner Standard verwendet werden, da bewiesenermaßen diese Substanz im Thymianfluidextrakt nicht vorkommt.

Wie zuvor schon kurz erwähnt, mussten die Einstellungen des Gaschromatographen immer wieder optimiert und angepasst werden. Durch viele Testläufe wurden die optimalen Parameter ermittelt und werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Gerät	Perkin Elmer Autosystem XL
Säule	Phenomenex ZB-5 Kapillarsäule 5 % Phenyl-, 95 % Dimethylpolysiloxane
Säulenlänge	60 m
Säulendurchmesser	0,25 mm
Filmdicke	0,25 µm
Trägergas	Stickstoff zur Chromatographie <i>R</i>
Durchflussrate	2 ml pro min.
Splitverhältnis	4 : 1
Einspritzvolumen	1,0 µl
Start- und Endtemperatur	100 → 225°C
Heizrate	15°C pro min.
Haltezeit bei Endtemp.	1 min. halten bei 225°C
Injektortemperatur	200°C
Detektortemperatur	200°C
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)
Dauer	9,4 min.

Tab. 3: Parameter und Einstellungen des Gaschromatographen

Berechnung des Thymolgehalts von Thymianfluidextrakt:

Durch die Zugabe einer genauen Einwaage des internen Standards Chlorthymol konnte Thymol quantifiziert werden. Die Formel, die zur Bestimmung von Thymol benötigt wurde, lautet:

$$\% \text{ (G/V) Thymol} = \frac{\text{Chlorthymol in g / 10 ml} \cdot \text{Peakfläche Thymol} \cdot 100 \cdot f_{St}}{\text{Peakfläche Chlorthymol} \cdot \text{Menge Fluidextrakt in ml}}$$

Formel 1: Berechnung des Thymolgehalts in % (G/V) von Thymianfluidextrakt

Bei dem Punkt „Chlorthymol in g / 10 ml“ setzt man die Einwaage ein, die bei der Herstellung der Untersuchungslösung verwendet wurde.

„Menge Fluidextrakt“ ist die verwendete Ausgangsmenge an Extrakt. Da für die Untersuchungslösung 10 ml Thymianfluidextrakt verwendet wurden, setzt man somit 10 in die Formel ein.

f_{St} bezeichnet in der Formel den sogenannten Standardkorrekturfaktor, der notwendig ist, um ein richtiges Ergebnis zu bekommen. Somit musste dieser zuerst bestimmt werden, um den Gehalt berechnen zu können.

Bestimmung und Berechnung des Standardkorrekturfaktors:

Für die Ermittlung des Standardkorrekturfaktors wurde das Verhältnis, im Zusammenhang mit der Einwaage, vom internen Standard zur Analysensubstanz im Chromatogramm bestimmt. Um dies zu erreichen, wurden fünf Untersuchungslösungen mit verschiedenen Verhältnissen und Konzentrationen von Thymol zu Chlorthymol hergestellt. Dafür wurden die beiden Substanzen in Hexan gelöst und anschließend gaschromatographisch gemessen.

Bezeichnung der Lösung	Verhältnis Thymol zu Chlorthymol
S1	0,25 : 1
S2	0,5 : 1
S3	1 : 1
S4	5 : 1
S5	10 : 1

Tab. 4: Verhältnisse und Bezeichnung der Lösungen zur Bestimmung des f_{St}

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Chromatogramme der verschiedenen Lösungen.

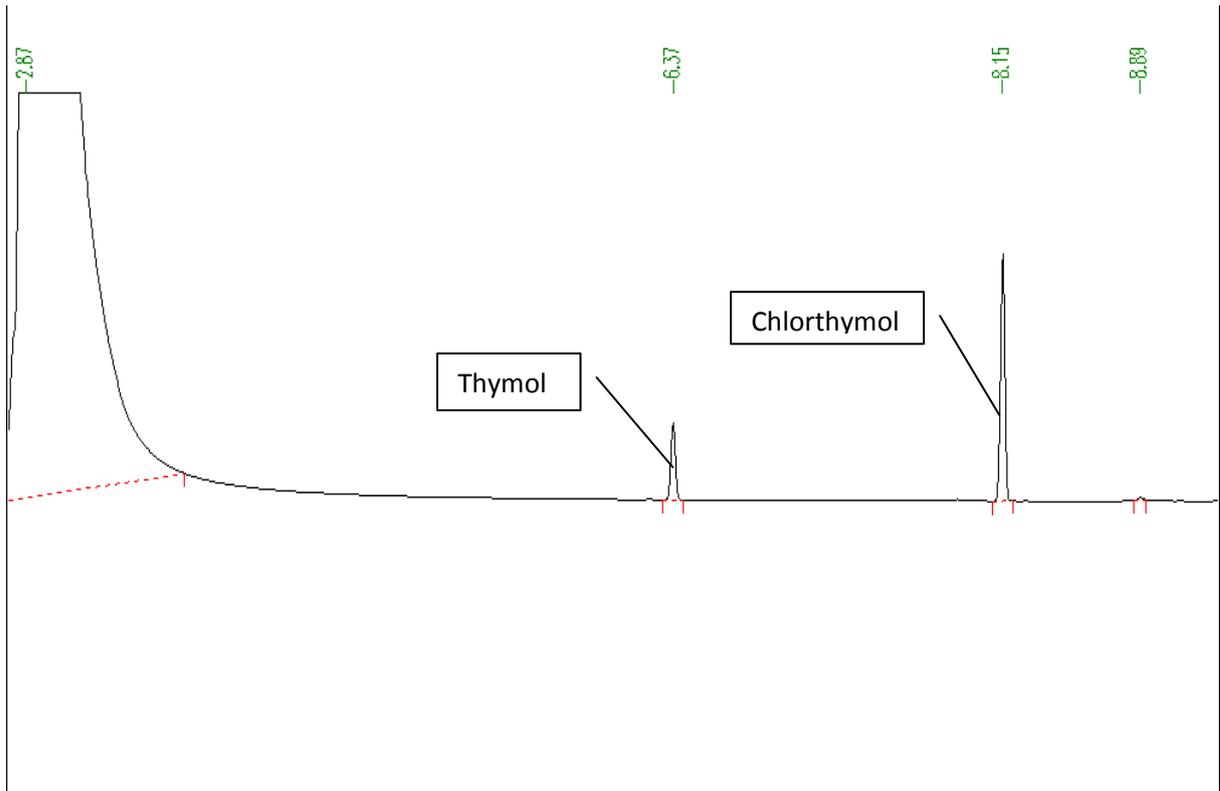


Abb. 21 Gaschromatogramm zur Berechnung des f_{St} von S1

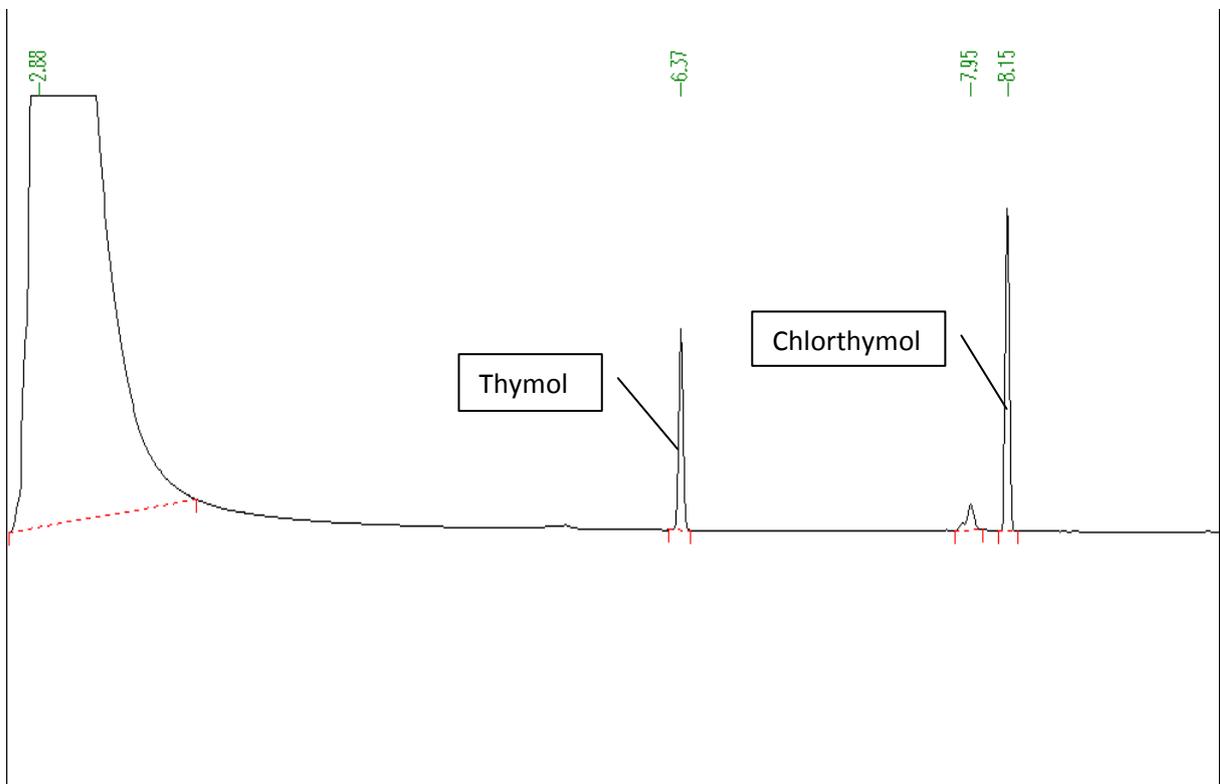


Abb. 22 Gaschromatogramm zur Berechnung des f_{St} von S2

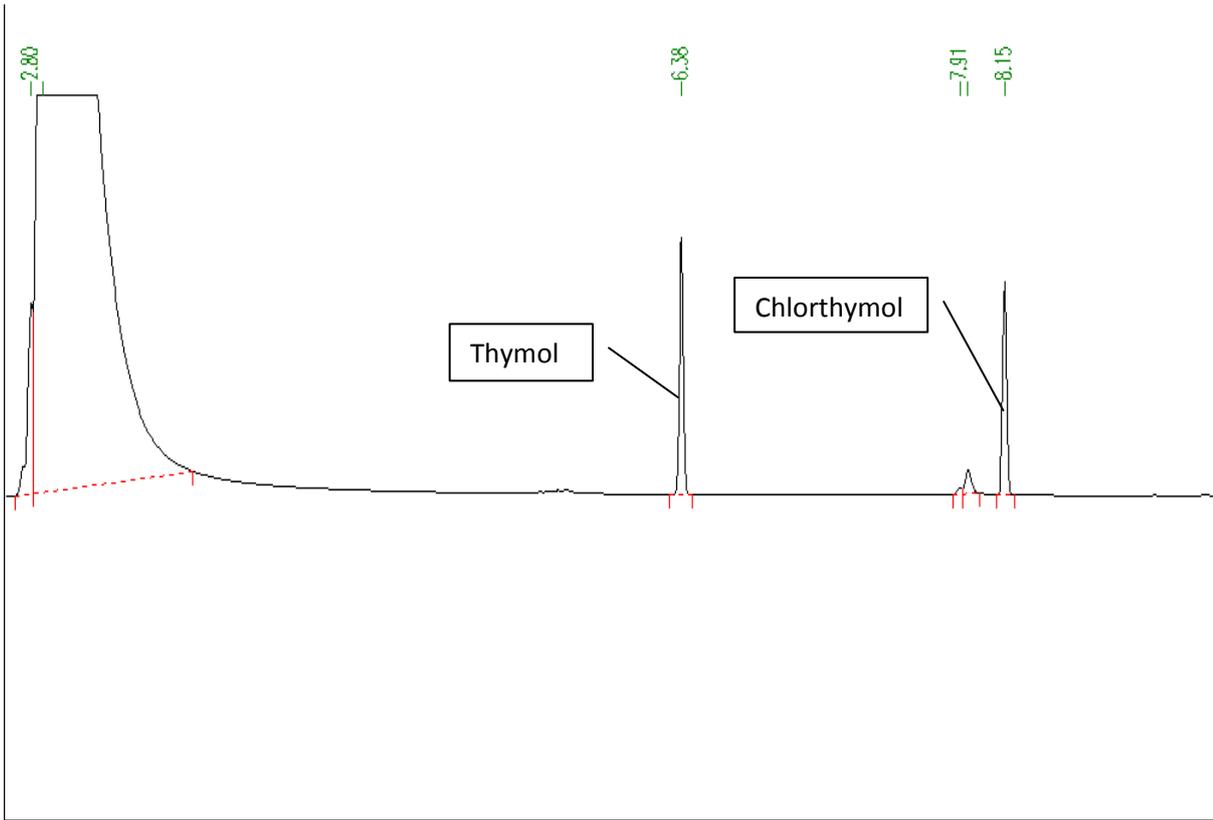


Abb. 23 Gaschromatogramm zur Berechnung des f_{St} von S3

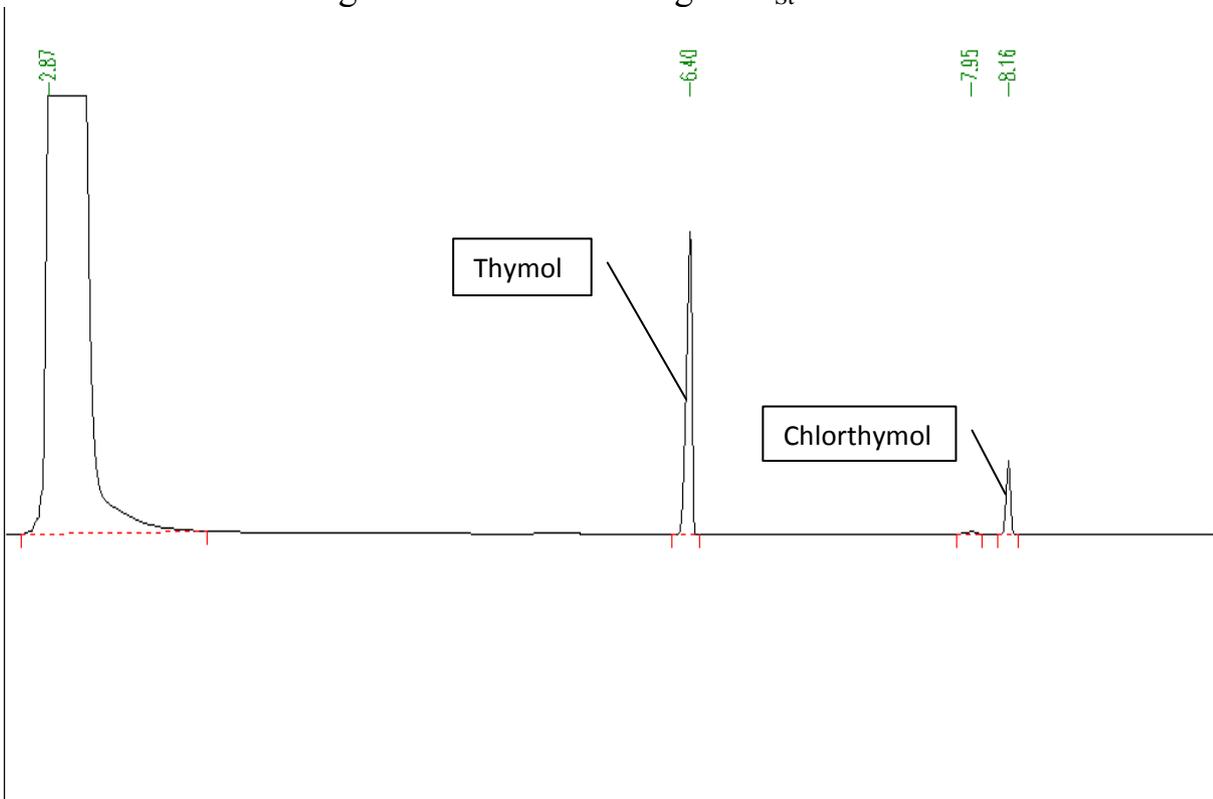


Abb. 24 Gaschromatogramm zur Berechnung des f_{St} von S4

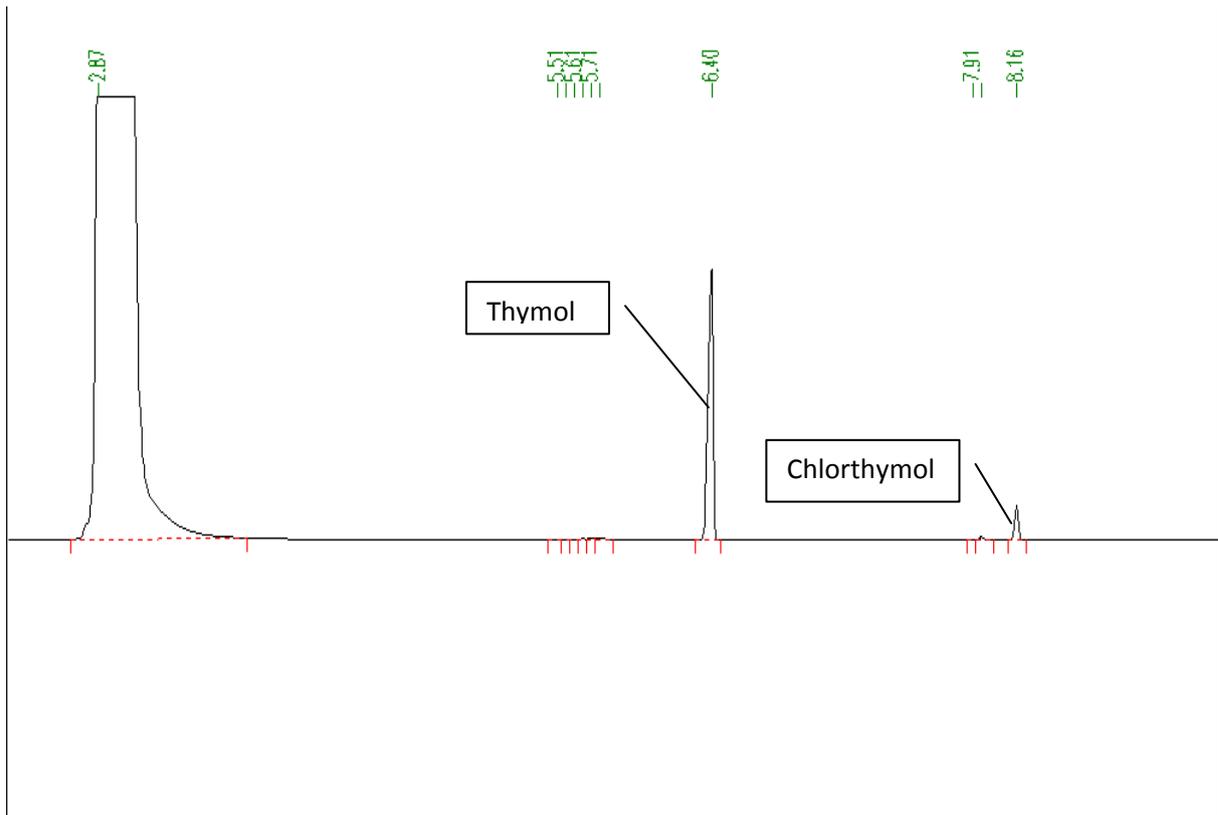


Abb. 25 Gaschromatogramm zur Berechnung des f_{St} von S5

Man erhielt Chromatogramme mit den Peaks bzw. Peakflächen von Thymol und Chlorthymol mit jeweils definierten Einwaagen. Anhand dieser Informationen konnte man nun in die Formel zur Berechnung des Standardkorrekturfaktors einsetzen. Die Formel lautet:

$$f_{St} = \frac{\text{g Thymol} \cdot \text{Peakfläche Chlorthymol}}{\text{g Chlorthymol} \cdot \text{Peakfläche Thymol}}$$

Formel 2: Standardkorrekturfaktor f_{St}

Da der Standardkorrekturfaktor je nach Größe der erhaltenen Peaks im Chromatogramm etwas variieren kann, wurden verschiedene Verhältnisse von Thymol zu Chlorthymol hergestellt, gemessen und berechnet, um daraus einen Mittelwert zu bestimmen, der dann als Standardkorrekturfaktor verwendet wurde. Bei dieser Diplomarbeit wurden die hergestellten Untersuchungs-lösungen je zweimal gemessen und berechnet, um den f_{St} zu bestimmen. Die Werte der Peakflächen und die jeweilig dazu berechneten Standardkorrekturfaktoren sind in der nachfolgenden Tabelle ersichtlich.

Verhältnis und verwendete Lsg.	Peakfläche Thymol	Peakfläche Chlorthymol	f_{St}
0,25 : 1, S1	3401,60	10504,47	0,7885
0,5 : 1, S2	6982,89	11391,01	0,8120
1 : 1, S3	12369,70	9673,96	0,8004
5 : 1, S4	158780,24	29763,99	0,8074
10 : 1, S5	154323,77	14727,33	0,8153
0,25 : 1, S1	4095,39	12480,95	0,7851
0,5 : 1, S2	8957,28	14599,73	0,8110
1 : 1, S3	16319,91	12935,4	0,8113
5 : 1, S4	126190,26	23698,45	0,8090
10 : 1, S5	173858,41	16553,50	0,8134
Mittelwert des f_{St}			0,8053

Tab. 5: Peakflächen zur Ermittlung des f_{St}

Anhand dieser Werte konnte nun der Mittelwert für den f_{St} gebildet werden. Der ermittelte **Standardkorrekturfaktor** hat den Wert **0,8053** und wurde in weiterer Folge für die Berechnung des Thymolgehalts (siehe Formel 1 bzw. Formel 3) verwendet.

Die Formel 1 zur Berechnung des Thymolgehalts im Thymianfluidextrakt konnte durch den bestimmten Standardkorrekturfaktor umgeformt werden und lautet dann:

$$\% \text{ Thymol (G/V)} = \frac{m_2 \cdot A_1 \cdot 80}{m_1 \cdot A_2}$$

Formel 3: Thymolgehalt mit bestimmtem f_{St}

- m_1Menge an verwendetem Thymianfluidextrakt in ml
 m_2Masse des internen Standards (Chlorthymol) in g / 10 ml
 A_1Fläche des Thymol-Peaks
 A_2Fläche des internen Standard-(Chlorthymol) Peaks

5.3.2 Berechnungen des Thymolgehalts der Thymianfluidextrakte

Wie zuvor schon erwähnt, standen vier verschiedene Thymianfluidextrakte für die Analyse zur Verfügung. Von jedem wurde eine Untersuchungslösung mittels Ausschütteln mit Hexan und Zugabe des internen Standards hergestellt. Die Einwaagen an Chlorthymol, die bei der Herstellung der Lösungen verwendet wurden, sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Bezeichnung des Extrakts	Einwaage von Chlorthymol in mg / 10 ml
F1 (Gatt-Koller)	10,07
F2 (Gatt-Koller)	9,87
F3 (Pharmona)	10,74
F4 (selbst hergestellt)	10,18

Tab. 6: Einwaagen des internen Standards Chlorthymol

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen jeweils ein Muster-Chromatogramm dieser vier Lösungen. Die Bezeichnungen und Kontrollnummern des verwendeten Extrakts sind aus Tab.1 zu entnehmen.

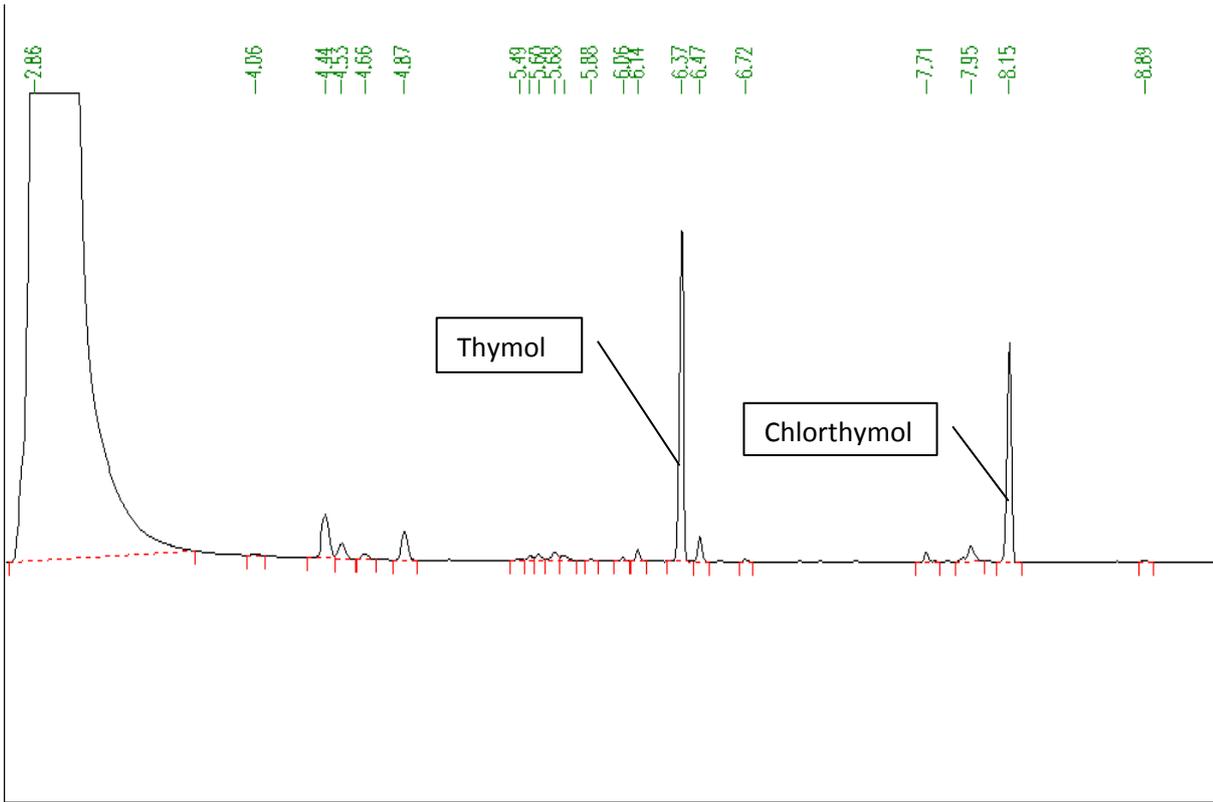


Abb. 26 Gaschromatogramm von Thymianfluidextrakt F1

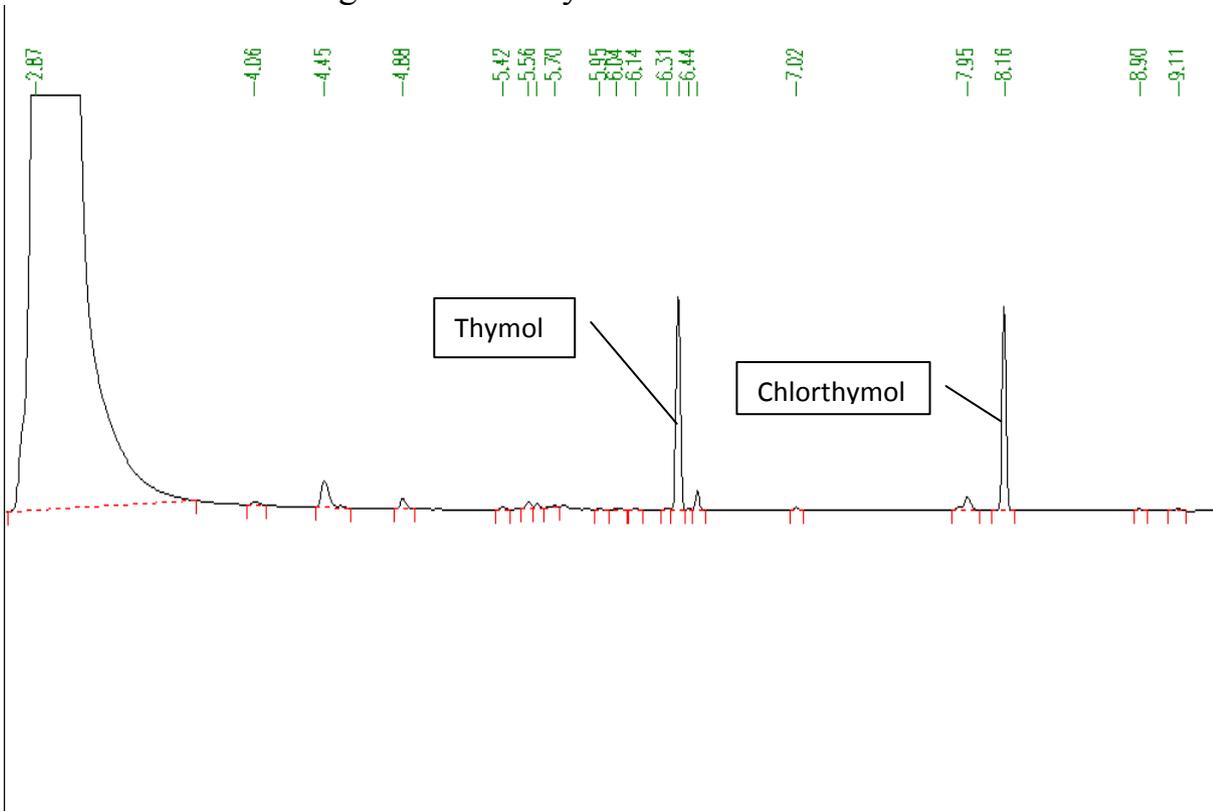


Abb. 27 Gaschromatogramm von Thymianfluidextrakt F2

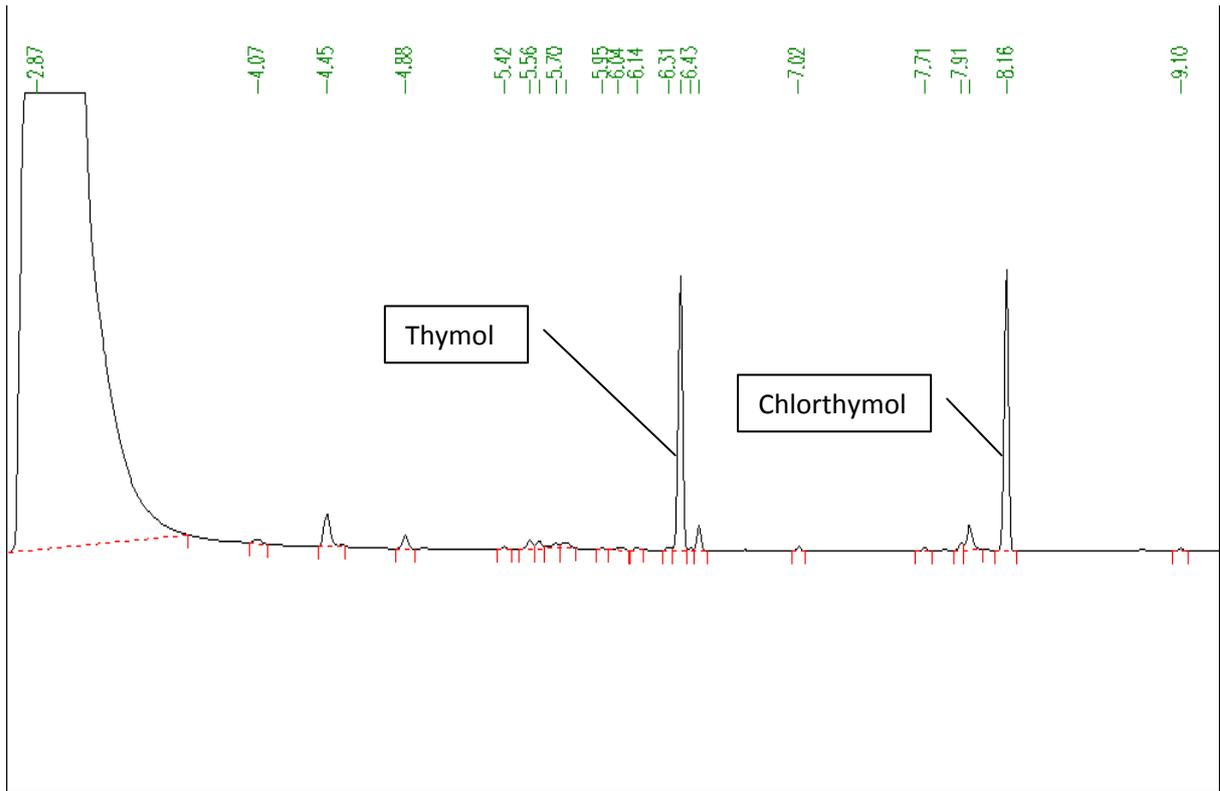


Abb. 28 Gaschromatogramm von Thymianfluidextrakt F3

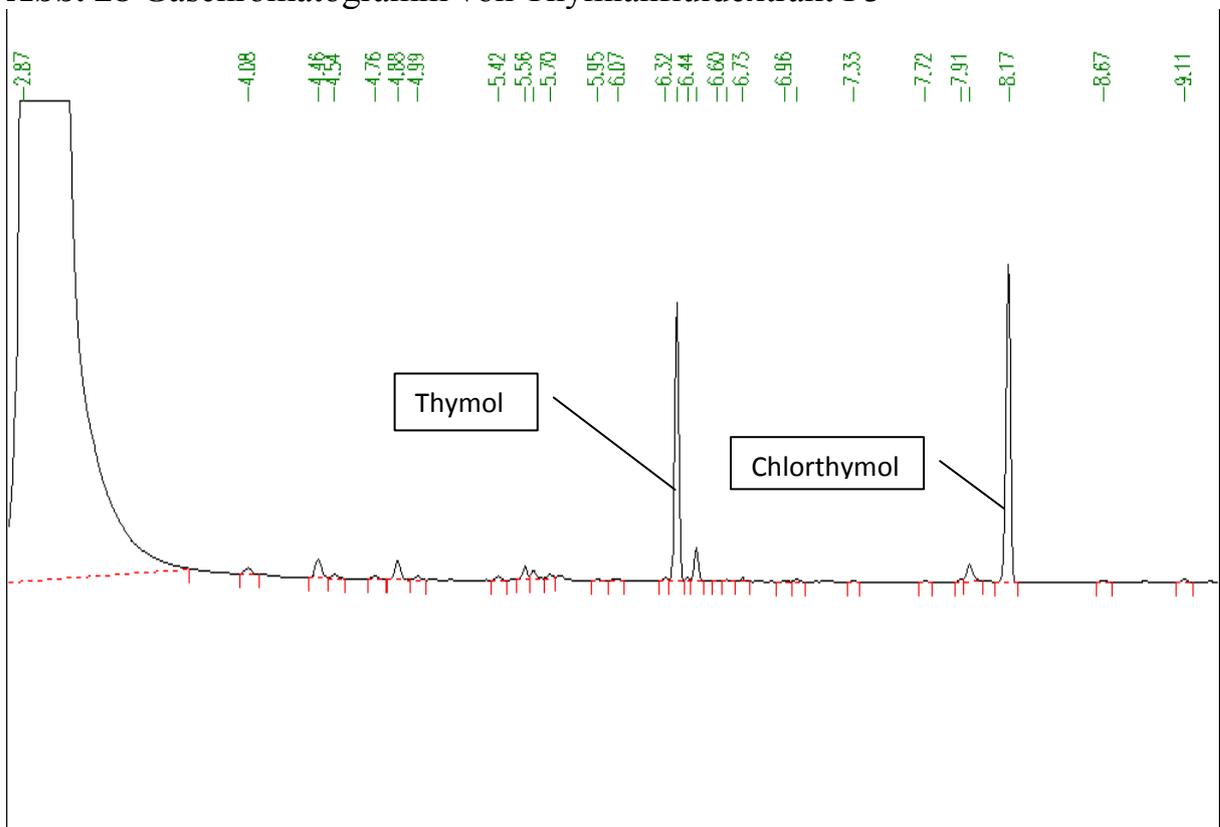


Abb. 29 Gaschromatogramm von Thymianfluidextrakt F4

Mit Hilfe dieser Chromatogramme bzw. der ermittelten Peakflächen konnte der Thymolgehalt vom jeweiligen Thymianfluidextrakt berechnet werden. Alle Extrakte wurden mehrfach gaschromatographisch analysiert. Repräsentativ werden nachfolgend einige Werte und Thymolgehalte der Untersuchungslösungen in einer Tabelle dargestellt.

Extrakt	Peakfläche Thymol	Peakfläche Chlorthymol	Thymolgehalt in %
F1	23658,29	15153,02	0,13
F2	15076,31	13992,43	0,09
F3	12271,92	12552,85	0,08
F4	12761,48	15195,78	0,07
F1	18439,75	11728,72	0,13
F2	14051,12	12950,35	0,09
F3	13409,97	13619,05	0,08
F4	12617,86	15123,71	0,07
F1	24283,19	15461,22	0,13
F2	15767,34	14730,66	0,08
F3	13035,64	13389,32	0,08
F4	11235,87	13461,94	0,07

Tab. 7: Werte der gaschromatographischen Analyse der Thymianfluidextrakte

Aufgrund dieser Berechnungen wurde für die überarbeitete Monographie von Thymianfluidextrakt ein **Mindestgehalt** von **0,07% Thymol** vorgeschlagen.

5.3.3. Berechnung von Carvacrol und dem Verhältnis von Thymol zu Carvacrol

Da auch ein Grenzwert für das Verhältnis von Thymol zu Carvacrol für die Monographie bestimmt werden sollte, wurde der Carvacrolgehalt der Untersuchungslösungen ebenfalls berechnet. Dafür setzt man die Werte der Peakflächen der Carvacrol-Peaks statt der Werte der Thymol-Peaks in die Formel ein. Die Berechnungen der vier verschiedenen Untersuchungslösungen ergaben, dass das Verhältnis Thymol zu Carvacrol zwischen 9:1 und 15:1 lag. Aufgrund dieser ermittelten Werte wurde ein **Verhältnis Thymol zu Carvacrol von mindestens 6:1** vorgeschlagen.

5.3.4. Richtigkeit der GC-Methode zur Bestimmung von Thymol

Um zu belegen, dass die Berechnungen des Thymolgehalts stimmen, wurde eine weitere Untersuchungslösung angefertigt. Der Extrakt F1 (Gatt-Koller) wurde dafür, beim Ausschütteln mit Hexan, nicht nur mit dem internen Standard Chlorthymol versetzt, sondern auch mit Thymol. Die verwendeten Einwaagen sind in der folgenden Tabelle zu sehen.

Thymianfluidextrakt	EW Thymol in mg	EW Chlorthymol in mg
F1 (Gatt-Koller)	5,45	9,66

Tab. 8: EW von Thymol und Chlorthymol für die Bestimmung der Richtigkeit

Durch die Zugabe des Thymols entstand im Chromatogramm natürlich auch ein größerer Peak dieser Substanz. Es sollte nachgewiesen werden, dass die Zugabe einer definierten Einwaage von Thymol dessen Peak um genau diesen Wert vergrößert. Das heißt die Differenz vom Gesamtgehalt und der zugegebenen Menge an Thymol sollte dem vorhin schon berechneten Thymolgehalt des Thymianfluidextrakts F1 (Gatt-Koller) von 0,13% entsprechen. Weiters sollte gezeigt werden, dass die gesamte Menge an eingewogenem Thymol im Chromatogramm „wiedergefunden“ werden kann und nichts davon bei der Herstellung der Untersuchungslösung verloren geht. Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden mehrere Chromatogramme von dieser Untersuchungslösung aufgezeichnet und die jeweiligen Daten zur Berechnung herangezogen. Nachfolgend sieht man ein ausgewähltes Chromatogramm, sowie die dazu passenden Werte in einer Tabelle.

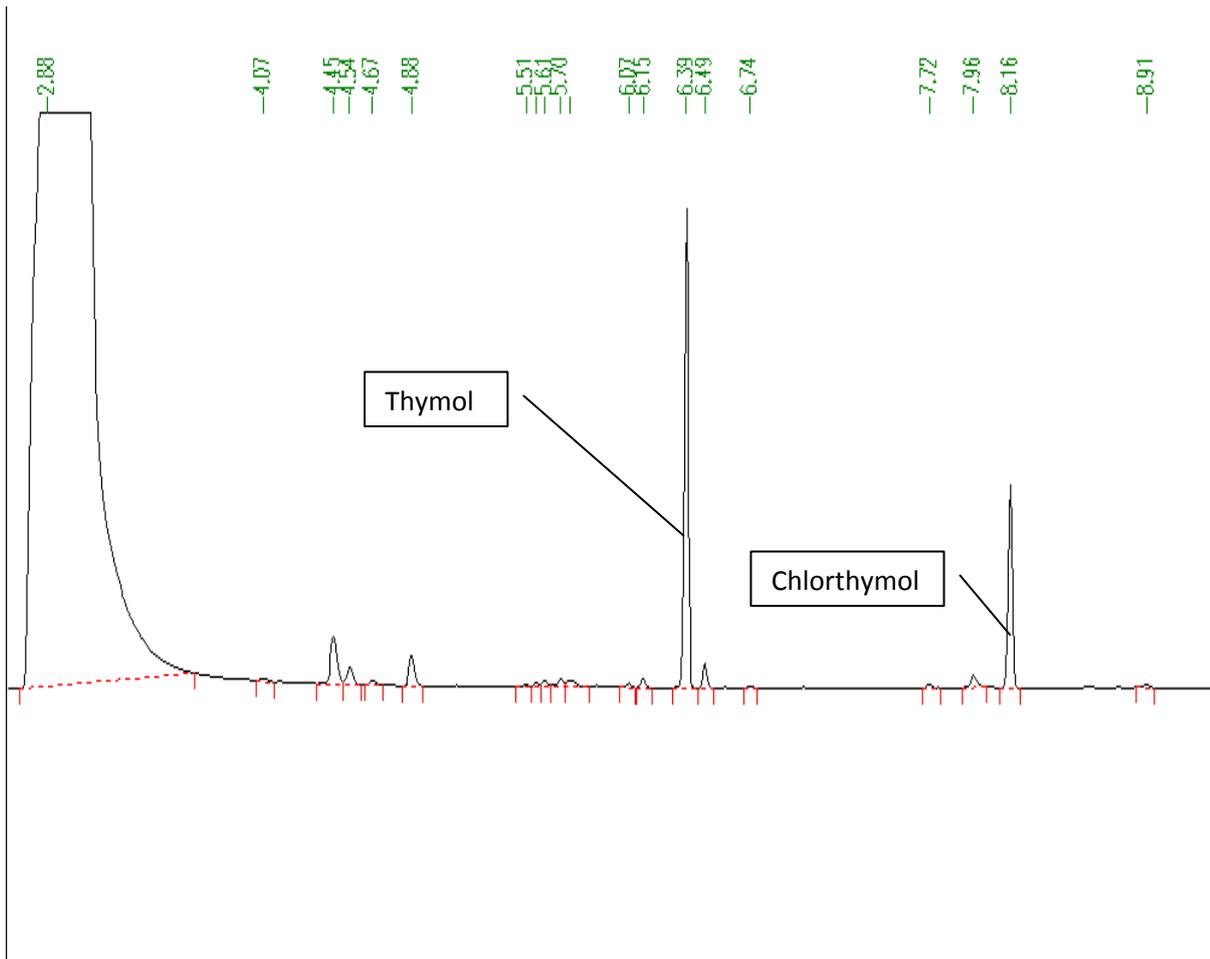


Abb. 30 Gaschromatogramm mit definierter Zugabe von Thymol (5,45 mg)

Thymianfluidextrakt	Peakfläche Thymol	Peakfläche Chlorthymol
F1 (Gatt-Koller)	33754,48	14072,17

Tab. 9: Peakflächen des Chromatogramms aus Abb. 30

Für die Berechnung wurde folgende Formel angewandt:

$$g \text{ Thymol} = \frac{g \text{ Chlorthymol} \cdot \text{Peakfläche Thymol} \cdot f_{St}}{\text{Peakfläche Chlorthymol}}$$

Formel 4: Berechnung der Thymolmenge

Durch Umformung dieser Gleichung, konnte man die Peakfläche ausrechnen, die die Einwaage von 5,45 mg Thymol ergab. Den erhaltenen Wert der Peakfläche setzte man nun in die Formel zur Berechnung des Thymolgehalts ein und bekam damit einen Prozentwert für die 5,45 mg Thymol.

Diesen Wert addierte man mit dem zuvor berechneten Thymolgehalt des Extrakts F1 und kam somit auf den „berechneten Gesamtgehalt“.

Jetzt bestimmte man den Gesamtgehalt an Thymol mit den gemessenen Werten aus Tab. 9 und verglich diesen „bestimmten Thymolgehalt“ mit dem „berechneten Thymolgehalt“. Somit konnte die Wiederfindungsrate ermittelt werden, die bei 100% liegen soll.

Berechnung:

berechnete Peakfläche von 5,45 mg Thymol	= 9924,08
berechneter Thymolgehalt mit dieser Fläche	= 0,0545 %
berechneter Thymolgesamtgehalt : 0,0545 + 0,13	= 0,1845 %
bestimmter Thymol-Gesamtgehalt	= 0,1854 %
wiedergefundener Thymolgehalt: 0,1854 - 0,13	= 0,0554 %

Der „bestimmte Thymol-Gesamtgehalt“ 0,1854 % minus dem zuvor bestimmten Gehalt des Extrakts F1 von 0,13 % ergab den „wiedergefundenen Gehalt“ der Einwaage von 5,45 mg Thymol. Dieser war 0,0554 %. Die Wiederfindungsrate ermittelte man durch die Division des „wiedergefundenen Thymolgehalts“ x 100 durch den berechneten Thymolgehalt von 5,45 mg Thymol.

$$\frac{0,0554 \cdot 100}{0,0545} = 101,7 \%$$

Die Wiederfindungsrate von Thymol lag somit bei 101,7%. Mit diesem Wert konnte gezeigt werden, dass bei der Herstellung der Untersuchungslösung kein Thymol verloren ging, sondern sich das gesamte Thymol in der organischen Phase (Hexan) gelöst hatte und bei der GC-Analyse bestimmt werden konnte. Die definierte, zugegebene Thymolmenge, sowie der zuvor ermittelte Thymolgehalt des Fluidextrakts konnten bei der gaschromatographischen Analyse zur Gänze „wiedergefunden“ werden und somit ist die Richtigkeit der Methode nachgewiesen.

6. Diskussion

Ziel dieser Diplomarbeit war die Überarbeitung der ÖAB-Monographie von Thymianfluidextrakt sowie eine Angleichung an die Vorgaben des EuAB. In der alten ÖAB-Monographie waren nur die Prüfungen des Ethanolgehalts, Methanol und iso-Propylalkohol sowie der Dichte vorhanden. Somit mussten Möglichkeiten gefunden werden, mit denen auf Identität, Reinheit und Gehalt geprüft werden kann. Zur Prüfung auf Identität konnte rasch ein DC-System, in Anlehnung an die EuAB-Monographie von „Thymi herba“, gefunden werden, womit die Hauptinhaltsstoffe des ÄÖ, Thymol und Carvacrol, nachgewiesen wurden. Um eine geeignete Konzentration der Untersuchungslösung zu erreichen, wurden hier Auszüge mit Dichlormethan hergestellt. Zusätzlich wurde ein DC-System für den Nachweis typischer Phenolcarbonsäuren und Flavonoide aus Thymian entwickelt. Nachdem aber für die Identitätsprüfung im Arzneibuch nur ein DC-System herangezogen werden soll, wurde im Sinne der Harmonisierung mit dem EuAB dieses System nicht in die Monographie aufgenommen. Zur Gehaltsprüfung von Thymol und Carvacrol wurde eine GC-Methode ausgearbeitet, mit der mittels des internen Standards Chlorthymol eine einfache, schnelle und gut reproduzierbare Gehaltsbestimmung durchgeführt werden kann. Zu Beginn der Arbeit wurde Linalool als interner Standard verwendet. Nachdem gezeigt werden konnte, dass diese Substanz in geringer Menge in Thymian vorhanden ist, wurde Chlorthymol als interner Standard ausgewählt.

Mit diesen erarbeiteten Methoden wurden alle verschiedenen Chargen von Thymianfluidextrakt geprüft und es konnten damit entsprechende Vorschläge (Aussehen der DC, Mindestgehalte) für die neue ÖAB-Monographie von Thymianfluidextrakt gemacht werden.

7. ÖAB Monographie von Thymianfluidextrakt

Extractum Thymi fluidum Thymianfluidextrakt

Bereitung

Thymiankraut(IV).....	100 Teile
Äthylalkohol.....	nach Bedarf
Gereinigtes Wasser.....	nach Bedarf
Glyzerin (85 Prozent).....	20 Teile

Das Thymiankraut wird mit einer Mischung von 40 Teilen Ethanol 96 % R, 40 Teilen Wasser R und 20 Teilen Glycerin gleichmäßig durchfeuchtet und anschließend nach dem Perkolationsverfahren (ÖAB.: VI) mit einer Mischung von 1 Teil Ethanol 96 % R und 4 Teilen Wasser so lange extrahiert, bis man 85 Teile Vorlauf und 2 Teilperkolate als Nachlauf erhalten hat. Die filtrierte Pressflüssigkeit und der Nachlauf werden unter vermindertem Druck auf 15 Teile eingedampft und mit dem Vorlauf vereinigt. Die weitere Verarbeitung erfolgt in der bei Extracta fluida ÖAB. angegebenen Weise.

Beschreibung

Braune bis rotbraune Flüssigkeit, die charakteristisch nach Thymian riecht und schmeckt.

Mischbarkeit: Thymianfluidextrakt ist mit Wasser oder der gleichen Menge verdünntem Alkohol klar mischbar; mit Alkohol tritt eine Trübung auf.

Prüfung auf Reinheit

Dichte: $\rho = 1,02-1,07$ (ÖAB.: XI, 5).

Alkoholgehalt: Mindestens 33,0 Vol.% (ÖAB.: XII, 7).

Methylalkohol, iso-Propylalkohol: Wie bei **Extracta** Ph. Eur. beschrieben.

Aufbewahrung

Vor Licht geschützt in gut schließenden Gefäßen.

Dosierung

Gebräuchliche Einzeldosis: 2,0 g.

Zubereitungen

Sirupus Thymi, Sirupus Thymi compositus.

8. Vorschlag für die neue Monographie von Thymianfluidextrakt

Thymianfluidextrakt Thymi Extractum fluidum *Extractum Thymi fluidum*

Definition

Thymianfluidextrakt wird aus Thymian (Thymi herba) hergestellt.

Gehalt: mindestens 0,07 % Thymol ($C_{10}H_{14}O$; M_r 150,2)

Verhältnis von Thymol zu Carvacrol mindestens 6 : 1.

Herstellung

Der Thymian wird mit einer Mischung aus Ethanol 96 % *R*, Wasser *R* und Glycerin *R* nach einem geeigneten Verfahren extrahiert.

Eigenschaften

Beschreibung:

Braune bis rotbraune Flüssigkeit mit charakteristischem Geruch und Geschmack.

Prüfung auf Identität

Dünnschichtchromatographie (2.2.27):

Untersuchungslösung: In einem Scheidetrichter werden 9 ml Fluidextrakt mit 3 ml Dichlormethan *R* ausgeschüttelt, die organische Phase wird für die Analyse verwendet.

Referenzlösung : 10 mg Thymol *R* und 20 µl Carvacrol *R* werden in 10 ml Dichlormethan gelöst.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel F_{254} *R* (5 bis 40 µm) [oder DC-Platte mit Kieselgel F_{254} *R* (2 bis 10 µm)]

Fließmittel: Dichlormethan *R*.

Auftragen: 15 µl; bandförmig [oder 10 µl; bandförmig]

Laufstrecke: 18 cm [oder 8,5 cm]

Trocknen: 5 min lang an der Luft

Detektion A: im ultravioletten Licht bei 254 nm

Ergebnis A: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen der Referenzlösungen und der Untersuchungslösung ist aus nachstehender Abbildung ersichtlich. Die fluoreszenzmindernde Zone des Carvacrols in der Untersuchungslösung kann, muss jedoch nicht unbedingt zu sehen sein. Darunter finden sich mehrere fluoreszenzmindernde Zonen.

Oberer Plattenrand	
_____	_____
Thymol: eine fluoreszenzmindernde Zone	eine fluoreszenzmindernde Zone (Thymol)
Carvacrol: eine fluoreszenzmindernde Zone	eine fluoreszenzmindernde Zone (Carvacrol)
_____	_____
	mehrere fluoreszenzmindernde Zonen
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Detektion B: Die Platte wird mit Anisaldehyd-Reagenz *R* besprüht und unter Beobachtung im Tageslicht 5 bis 10 min lang bei 100-105 °C erhitzt.

Ergebnis B: Das Chromatogramm der Untersuchungslösung zeigt eine rötlich bis orange Hauptzone, die in Bezug auf Lage und Farbe der Zone im Chromatogramm der Referenzlösung a entspricht. Im Chromatogramm der Untersuchungslösung sind im unteren Drittel weitere unterschiedlich gefärbte Zonen vorhanden.

Oberer Plattenrand	
<p>_____</p> <p>Thymol: eine rötlich bis orange Zone</p> <p>Carvacrol: eine rötlich bis violette Zone</p> <p>_____</p>	<p style="text-align: right;">_____</p> <p>eine rötlich bis orange Zone (Thymol)</p> <p>eine rötlich bis violette Zone (Carvacrol)</p> <p style="text-align: right;">_____</p> <p>eine graurosa Zone eine violette Zone (Cineol, Linalool) eine graubraune Zone (Borneol) eine hellviolette Zone</p>
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Alkoholgehalt (2.9.10): Mindestens 33,0 Prozent (V/V)

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

Gehaltsbestimmung: Gaschromatographie (2.2.28), mit Hilfe des internen Standards Chlorthymol (4-Chloro-2-isopropyl-5-methylphenol, $C_{10}H_{13}ClO$; M_r 184,67)

Untersuchungslösung: 10 ml Fluidextrakt werden in einem Scheidetrichter mit einer Lösung von 10 mg Chlorthymol in 10 ml Hexan ausgeschüttelt. Anschließend wird noch zweimal mit je 15 ml Hexan ausgeschüttelt. Die Hexanphasen werden in einem 50 ml Messkolben gesammelt und mit Hexan bis zur Marke aufgefüllt.

Säule:

- Material: Quarzglas
- Größe: $l = 60 \text{ m}$, $\varnothing = 0,25 \text{ mm}$
- Stationäre Phase: 5% Phenyl-, 95% Dimethylpolysiloxane (Filmdicke $0,25 \mu\text{m}$)

Trägergas: Stickstoff zur Chromatographie R

Durchflussrate: 2 ml pro min.

Split-Verhältnis: 4 : 1

Temperatur:

	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Säule	0-9,4	100 → 225
Probeneinlass		200
Detektor		200

Detektion: Flammenionisation

Einspritzen: 1,0 µl

Reihenfolge der Elution: Als erstes wird Thymol eluiert und kurz darauf Carvacrol. Als letztes wird der interne Standard Chlorthymol eluiert. Um eine Gehaltsbestimmung durchführen zu können, müssen Thymol und Carvacrol vollständig voneinander getrennt sein (Auflösung: mindestens 1,5 zwischen den Peaks von Thymol und Carvacrol). Die Retentionszeiten der Substanzen werden aufgezeichnet.

Der Prozentgehalt an Thymol wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{m_2 \cdot A_1 \cdot 80}{m_1 \cdot A_2}$$

A_1 = Fläche des Thymol-Peaks im Chromatogramm

A_2 = Fläche des internen Standards (Chlorthymol)-Peaks im Chromatogramm

m_1 = Menge an verwendetem Thymianfluidextrakt in ml

m_2 = Masse des internen Standards (Chlorthymol) in Gramm

Lagerung

Vor Licht geschützt, in gut schließenden Gefäßen.

9. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Diplomarbeit war, die alte ÖAB-Monographie von Thymianfluidextrakt zu bearbeiten, zu modernisieren und gleichzeitig eine Harmonisierung mit dem EuAB zu erreichen. Für die Identitätsprüfung wurden zwei DC-Systeme entwickelt wobei aus Gründen der Harmonisierung mit dem EuAB nur jenes für das ätherische Öl (Thymol, Carvacrol) Einzug in die Monographie fand. Für die Gehaltsbestimmung wurde eine gaschromatographische Methode mit Chlorthymol als interner Standard ausgearbeitet. Anhand mehrerer verschiedener Thymianfluidextrakte konnte gezeigt werden, dass diese Methoden genaue Resultate liefern und reproduzierbar sind. Durch die erhaltenen Ergebnisse dieser Extrakte, konnte ein Mindestgehalt an Thymol und ein Wert für das Verhältnis von Thymol zu Carvacrol vorgeschlagen werden.

10. Summary

The goal of this diploma thesis was to review the old ÖAB-monograph of Extractum thymi fluidum, to modernize it and harmonize it with the European Pharmacopoeia. For the proof of identity we created two TLC-systems for the identification of the compounds of the essential oil (Thymol, Carvacrol) as well as for phenolic compounds like phenolcarbonic acids and flavonoids but only the first one was used for the monograph. For the quantification of thymol in the extract we developed a gaschromatographic method with chlorthymol as internal standard. Analysing various extracts we could show the accuracy and reproducibility of this method. The obtained results were used to make proposals for the minimum amount of Thymol and the relation from Thymol to Carvacrol in Extractum Thymi fluidum.

11. Abkürzungsverzeichnis

ÄÖ	Ätherisches Öl
Sre	Säure
Abb.	Abbildung
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
ÖAB	Österreichisches Arzneibuch
EuAB	Europäisches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
Tab.	Tabelle
UV	ultraviolett
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography, Hochleistungsdünnschichtchromatographie
GC	Gaschromatographie
FID	Flammenionisationsdetektor
V	Volumen
G	Gewicht
f _{St}	Standardkorrekturfaktor
EW	Einwaage
Konzentr.	Konzentration
TLC	Thin-Layer-Chromatography
int.	interner

12. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Thymus vulgaris (http://flora.nhm-wien.ac.at/Bilder-P-Z/Thymus-vulgaris-2.jpg)	1
Abb. 2	Thymus zygis (http://www.conocermoralzarzal.com/flora/thyzygis.jpg)	1
Abb. 3	Thymus serpyllum (http://mrbeessite.com/Thymus_serpyllum.jpg)	1
Abb. 4	Thymol	2
Abb. 5	Carvacrol	2
Abb. 6	p-Cymen (para-Cymen)	2
Abb. 7	γ -Terpinen	2
Abb. 8	Rosmarinsäure	3
Abb. 9	Kaffeensäure	3
Abb. 10	Luteolin	3
Abb. 11	Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen (http:// www.techniklexikon.net/images/f1238_gaschromatographie.gif)	11
Abb. 12	Schematischer Aufbau eines Flammenionisationsdetektors (FID) (http:// www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/3/anc/croma/gc/detektoren/flamme/fid_prinzip1m751200.jpg)	13
Abb. 13	HPTLC für das ätherische Öl aus Thymianfluidextrakt bei 254 nm	17
Abb. 14	HPTLC und DC für das ätherische Öl aus Thymianfluidextrakt nach Besprühen mit Anisaldehyd-Sprühreagens	18
Abb. 15	HPTLC von Phenolcarbonsäuren und Flavonoiden aus Thymianfluidextrakt nach Besprühen mit Naturstoffreagens A und Macrogol 400 bei 365 nm	20
Abb. 16	DC von Phenolcarbonsäuren und Flavonoiden aus Thymianfluidextrakt nach Besprühen mit Naturstoffreagens A und Macrogol 400 bei 365 nm	21
Abb. 17	Gaschromatogramm mit Zugabe von Linalool als int. Standard	24
Abb. 18	Gaschromatogramm ohne Zugabe von Linalool als int. Standard	25
Abb. 19	Gaschromatogramm ohne Zugabe von Chlorthymol als int. Standard	26

Abb. 20 Gaschromatogramm mit Zugabe von Chlorthymol als int. Standard	26
Abb. 21 Gaschromatogramm zur Berechnung des f_{St} von S1	29
Abb. 22 Gaschromatogramm zur Berechnung des f_{St} von S2	29
Abb. 23 Gaschromatogramm zur Berechnung des f_{St} von S3	30
Abb. 24 Gaschromatogramm zur Berechnung des f_{St} von S4	30
Abb. 25 Gaschromatogramm zur Berechnung des f_{St} von S5	31
Abb. 26 Gaschromatogramm von Thymianfluidextrakt F1	34
Abb. 27 Gaschromatogramm von Thymianfluidextrakt F2	34
Abb. 28 Gaschromatogramm von Thymianfluidextrakt F3	35
Abb. 29 Gaschromatogramm von Thymianfluidextrakt F4	35
Abb. 30 Gaschromatogramm mit definierter Zugabe von Thymol (5,45 mg)	38

13. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Fluidextrakte für die Untersuchungen der vorliegenden Diplomarbeit	7
Tab. 2: Vergleich von DC und HPTLC	10
Tab. 3: Parameter und Einstellungen des Gaschromatographen	27
Tab. 4: Verhältnisse und Bezeichnung der Lösungen zur Bestimmung des f_{St}	28
Tab. 5: Peakflächen zur Ermittlung des f_{St}	32
Tab. 6: Einwaagen des internen Standards Chlorthymol	33
Tab. 7: Werte der gaschromatographischen Analyse der Thymianfluidextrakte	36
Tab. 8: EW von Thymol und Chlorthymol für die Bestimmung der Richtigkeit	37
Tab. 9: Peakflächen des Chromatogramms aus Abb. 30	38

14. Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung des Thymolgehalts in % (G/V) von Thymianfluidextrakt	28
Formel 2: Standardkorrekturfaktor f_{St}	31
Formel 3: Thymolgehalt mit bestimmtem f_{St}	33
Formel 4: Berechnung der Thymolmenge	38

15. Literaturverzeichnis

- [1] <http://de.wikipedia.org/wiki/Thymian> (12.2.2011)
- [2] Teuscher, Melzig, Lindequist; Biogene Arzneimittel, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2004)
- [3] Rücker G., Neugebauer M., Willems G.; Instrumentelle pharmazeutische Analytik - Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysenmethoden, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2001)
- [4] Adam K., Becker H.; Analytik biogener Arzneistoffe - Pharmazeutische Biologie, Band 4, 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2000)
- [5] Österreichisches Arzneibuch; Amtliche Ausgabe 2010, Verlag Österreich, Wien (2010)
- [6] Europäisches Arzneibuch; 6. Ausgabe, Grundwerk 2008, Amtliche österreichische Ausgabe, Verlag Österreich

16. Curriculum vitae

Angaben zur Person:

Name: Reinhard PÖLLAUER
Geburtsdatum: 07.05.1982
Geburtsort: Wien
Staatsangehörigkeit: Österreich
Adresse: Rudolf-Virchowstraße 16/1/1111, 1210 Wien
Familienstand: ledig

Eltern:

Manfred Pöllauer, Maschinenbauingenieur

Maria Pöllauer, Kindergärtnerin

Ausbildung:

1988 - 1992: Volksschule Tomaschekstraße, 1210 Wien
1992 - 2000: GRG 21 Ödenburgerstraße, 1210 Wien
Juni 2000: Reifeprüfung mit gutem Erfolg
Okt. 2000 - Jun. 2001: Studium der technischen Chemie an der TU Wien
Okt. 2001: Wechsel zum Studium der Pharmazie an der
Universität Wien