



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Überarbeitung ausgewählter Monographien des
österreichischen Arzneibuchs:
Valerianae tinctura aetherea und Vitis-idaeae folium

Verfasser

Martin Hageneder

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Insbesondere danke ich Univ.-Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp für Ihre Unterstützung, und vor allem für Ihre Geduld, die sie mir entgegen gebracht hat.

Ein herzliches Dankeschön gebührt auch Dr. Judith Singhuber für ihren tatkräftigen Beistand.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, deren vorbehaltlose Unterstützung mir dieses Studium ermöglicht hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeine Einleitung und Zielsetzung	1
2	Valerianae tinctura aetherea	3
2.1	Einleitung	3
2.1.1	Inhaltsstoffe von <i>Valeriana officinalis</i> L. s. l.	4
2.1.2	Pharmakologie und therapeutische Wirksamkeit von <i>Valerianae radix</i>	7
2.2	Material und Methoden	11
2.2.1	Untersuchungsmaterial	11
2.2.2	Reagenzien und Chemikalien	12
2.2.3	Methoden	13
2.3	Ergebnisse.....	16
2.4	Diskussion	26
2.5	Vorschlag für die neue Monographie von <i>Tinctura Valerianae aetherea</i>	31
3	<i>Vitis-idaeae folium</i>	36
3.1	Einleitung	36
3.1.1	Inhaltsstoffe von <i>Vaccinum vitis-idaea</i> L.	37
3.1.2	Pharmakologie und therapeutische Wirksamkeit von <i>Vitis-idaeae folium</i>	39
3.2	Material und Methoden	42
3.2.1	Pflanzenmaterial	42
3.2.2	Reagenzien und Chemikalien	43
3.2.3	Methoden	44
3.3	Ergebnisse.....	47
3.4	Diskussion	65
3.5	Vorschlag für die neue Monographie von <i>Vitis-idaeae folium</i>	70
4	Zusammenfassung	77
5	Summary.....	79

6 Literatur	81
Curriculum vitae	1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: (+)-Borneol	4
Abbildung 2: schwerflüchtige Verbindungen vom Valerenal- Typ	4
Abbildung 3: Monoen-Valepotriate	5
Abbildung 4: Dienvalepotriate	5
Abbildung 5: Baldrinal	6
Abbildung 6: 6-Methylapigenin	6
Abbildung 7: Vergleich von etherischen mit ethanolischen Tinkturen	18
Abbildung 8: HPLC Chromatogramm der Reinsubstanz Valerensäure (99,88 %)	23
Abbildung 9: HPLC Chromatogramm des standardisierten Baldrianextrakts <i>HRS</i>	23
Abbildung 10: HPLC Chromatogramm der Tinktur Nr.2	23
Abbildung 11: zu überarbeitende ÖAB-Originalmonographie von Tinktura Valerianae aetherea	30
Abbildung 12: <i>Vaccinum vitis-idaea</i> L.	37
Abbildung 13: Arbutin	38
Abbildung 14: Fraxin	38
Abbildung 15: Zeichnung einer Aufsicht auf Blattoberseite	49
Abbildung 16: Foto einer Aufsicht auf Blattoberseite, 400-fache Vergrößerung	49
Abbildung 17: Zeichnung einer Aufsicht auf Blattunterseite	50
Abbildung 18: Foto einer Aufsicht auf Blattunterseite, 400-fache Vergrößerung	50
Abbildung 19: Zeichnung einer Drüsenzotte	51
Abbildung 20: Fotos einer Drüsenzotte, 400-fache Vergrößerung	51
Abbildung 21: Zeichnung von Deckhaaren	52
Abbildung 22: Fotos von Deckhaaren, 400-fache Vergrößerung	52
Abbildung 23: Zeichnung eines Blattquerschnitts	53
Abbildung 24: Foto eines Querschnitts durch ein Blatt, 200-fache Vergrößerung	54
Abbildung 25: Foto eines Querschnitts durch ein Blatt, 200-fache Vergrößerung	54
Abbildung 26: Druse in Leitbündelnähe im Querschnitt	55
Abbildung 27: Kristalle entlang des Leitbündels im Längsschnitt	55

Abbildung 28: Überprüfung von ausgewählten <i>Vitis-idaea</i> Proben.....	57
Abbildung 29: Vergleich zweier Extrakte von Probe 1, welche mit verschiedenen Methoden hergestellt wurden.	58
Abbildung 30: Vergleich von <i>Vitis-idaea</i> folium mit <i>Myrtilli folium</i> und <i>Uvae ursi</i> folium.	59
Abbildung 31: Nachweis von Verfälschungen von <i>Uvae ursi</i> folium mit <i>Vitis-idaea</i> folium	60
Abbildung 32: DC-System für die neu überarbeitete Monographie	61
Abbildung 33: HPLC von Arbutin	63
Abbildung 34: HPLC von Probe 1	64
Abbildung 35: die zu revidierende ÖAB-Originalmonographie von <i>Vitis-idaea</i> folium	69
Abbildung 36: mikroskopische Merkmale	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HPLC-Module	14
Tabelle 2: Zeitschema.....	15
Tabelle 3: Ergebnisse der Prüfung auf den Ethergehalt	16
Tabelle 4: Gehaltsbestimmung von Sesquiterpensäuren mittels HPLC mit Valerensäure als Referenzsubstanz.....	19
Tabelle 5: HPLC-Quantifizierung von Sesquiterpensäuren aus etherischen Baldriantinkturen/ Ether wurde zuvor mittels Rotationsverdampfer aus den Proben entfernt.....	20
Tabelle 6: HPLC-Quantifizierung von Sesquiterpensäuren aus etherischen Baldriantinkturen/ Ether wurde zuvor durch Ausblasen mittels Druckluft aus den Proben entfernt.	20
Tabelle 7: HPLC-Quantifizierung von Sesquiterpensäuren aus etherischen Baldriantinkturen/ Ether wurde zuvor am Wasserbad entfernt.	21
Tabelle 8: HPLC- Quantifizierung von Sesquiterpensäuren in den zur Herstellung der Tinkturen 2 und 3 verwendeten Drogen	21
Tabelle 9: Gehaltsbestimmung von Sesquiterpensäuren mittels HPLC mit standardisiertem Baldriantrockenextrakt <i>HRS</i> als Referenzsubstanz	22

Tabelle 10: Ergebnisse der Bestimmung der absoluten und relativen Dichte der etherischen Tinkturen 1-4.....	24
Tabelle 11: Einwaagen und Ergebnisse der Prüfung auf Trockenrückstand.....	25
Tabelle 12: Herkunft der untersuchten Drogen	42
Tabelle 13: ermittelte Werte des Aschegehaltes der Proben 1-6.....	56
Tabelle 14: Werte des Aschegehaltes von Stichproben aus verschiedenen Chargen der Fa. Kwizda.....	56
Tabelle 15: Gehaltsbestimmung von Arbutin mittels HPLC mit Referenzlösung Nr.1 .	62
Tabelle 16: Gehaltsbestimmung von Arbutin mittels HPLC mit Referenzlösung Nr.2 .	63
Tabelle 17: Einwaagen und Ergebnisse der Bestimmung des Trocknungsverlusts	64

1 Allgemeine Einleitung und Zielsetzung

Das Österreichische Arzneibuch setzt sich aus dem Europäischen Arzneibuch, amtliche Österreichische Ausgabe (Ph. Eur.) und aus dem verbleibenden nationalen Österreichischem Arzneibuch (ÖAB) zusammen. Durch das ÖAB werden besondere nationale Erfordernisse abgedeckt. In einer unlängst durchgeführten Umfrage der Apothekerkammer Österreichs wurde festgestellt, dass nach der Meinung der österreichischen Apotheker eine Beibehaltung der im ÖAB noch vorhandenen Monographien zweckmäßig ist.

Die amtliche Ausgabe 2009 des ÖAB wurde in Anlehnung an die deutschsprachige Fassung der Ph. Eur. 6.0 erstellt. Eine Vereinheitlichung der Nomenklatur der Arzneibuchmonographien ist dabei von großem praktischen Wert. Neue ÖAB-Monographien werden deshalb wie in der deutschsprachigen Fassung der Ph. Eur. mit deutschsprachigen Haupttiteln versehen. Um die revidierten ÖAB-Monographien in der Umarbeitungsphase übersichtlich in das kontinental-lateinisch strukturierte ÖAB einzuarbeiten, weisen diese unter dem österreichischen deutschsprachigen Haupttitel den lateinischen und den alten kontinental – lateinischen Titel auf.

Die Arzneibuchagenden werden seit Ende 2006 vom Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend durchgeführt. Die Verantwortung der Überarbeitung des ÖAB obliegt der Österreichischen Arzneibuchkommission und der ÖAB-Expertengruppe.

Die ÖAB-Expertengruppe besteht aus Mitarbeitern

- des Bundesministeriums für Gesundheit, Familie und Jugend,
- der AGES-PharmMed (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit)
- des Apothekerkammerlabors,
- der Universität Wien und
- Industrievertretern

Diese Expertengruppe realisiert die Revision der ÖAB Monographien gemäß den Vorschriften des Europäischen Arzneibuches (Aktualisierung der Analysemethoden, ausschließliche Verwendung des europäischen Reagenziensatzes, Harmonisierung in Stil, Inhalt) (siehe Ph. Eur. 6.0).

Ziel dieser Diplomarbeit war es, einen Teil beizutragen, die Monographien des ÖAB an den Standard der Ph. Eur. anzugleichen. Im Speziellen ging es hierbei um die Monographien „Tinctura Valerianae aetherea“, und „Folium Vitis-idaeae“. Diese Monographien werden in der neu überarbeiteten Version der Nomenklatur der Ph. Eur. entsprechend unter den Namen „Baldriantinktur, etherische / Valerianae tinctura aetherea“ und „Peiselbeerblatt / Vitis-idaeae folium“ zu finden sein. Veraltete Prüfmethoden werden durch moderne, dem heutigen Stand der Technik entsprechende Methoden ersetzt. In den neu überarbeiteten Monographien werden nicht nur neue qualitative und quantitative Nachweise, sondern auch Zeichnungen von mikroskopischen Charakteristika zu finden sein.

2 Valerianae tinctura aetherea

2.1 Einleitung

Die Nutzung von Baldrian als Arzneipflanze hat eine sehr lange Geschichte. Schon Galen (131-201 n. Chr.) beschrieb dessen sedative Wirkung. Die ersten heute bekannten Aufzeichnungen über den therapeutischen Gebrauch von Baldrian wurden allerdings erst Mitte des 18. Jahrhunderts von John Hill, einem englischen Arzt verfasst. Aufgrund des alten Wissens über die schlaffördernde und beruhigende Wirkung dieser Pflanze begann bereits im 19. Jahrhundert die chemische Analyse ihrer Inhaltsstoffe (Houghton, 1998). Die Baldrianwurzel zählt daher heutzutage zu den relativ gut erforschten Arzneidrogen, die in Form verschiedenster Präparate (Tinkturen, in Kapseln abgefüllte Trockenextrakte, Tabletten, Dragees, etc.) im Handel erhältlich sind.

Die heute verwendete Droge *Valerianae radix* ist laut Ph. Eur. 6.0 folgendermaßen definiert: Die getrockneten, ganzen, unterirdischen Teile von *Valeriana officinalis* L. s. l. oder Fragmente davon, bestehend aus dem Wurzelstock, den Wurzeln sowie den Ausläufern.

Die Gattung *Valeriana* gehört zur Familie der Valerianaceae, und ist auf der ganzen Welt in den gemäßigten und subtropischen Klimazonen verbreitet (Houghton, 1998). *Valeriana officinalis* L. s. l. ist eine Sammelart, die mehrere in Europa heimische Kleinarten zusammenfasst. Dabei werden vier Grundtypen unterschieden: *V. exalta*, *V. collina*, *V. procurrens* und *V. sambucifolia* (Titz et al., 1982; Reichling, 2007). Global kommen viele verschiedene Arten von *Valeriana* zur Anwendung. Zu den handelsüblichsten Arten außerhalb Europas zählen *Valeriana walchii* DC, der indische Baldrian, *Valeriana fauriei* Briq., der japanische Baldrian und *Valeriana edulis* Nutt. ex. Torr. & Gray, der mexikanische Baldrian. Diese weisen jedoch Unterschiede in ihrer stofflichen Zusammensetzung auf (Houghton, 1998). Im folgenden Kapitel soll ein kurzer Überblick über die wichtigsten, in der Wurzeldroge des offizinellen Baldrian enthaltenen Inhaltsstoffe gegeben werden.

2.1.1 Inhaltsstoffe von *Valeriana officinalis* L. s. l.

Ätherisches Öl

Als Bestandteile des ätherischen Öls finden sich Monoterpene wie (+)-Borneol (siehe Abbildung 1), Bornylacetat, Bornylisovalerat, Camphen, Campher, 1,8-Cineol, Myrcen und α -Pinen.

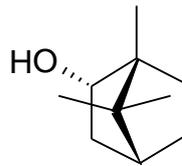


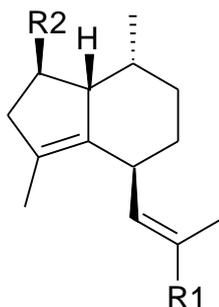
Abbildung 1: (+)-Borneol

Unter den Sesquiterpenen sind im ätherischen Öl des officinellen Baldrians z.B. β -Bisabolen, α -Curcumen und oxigenierte Sesquiterpene wie Kessanderivate, Elemanderivate und Valerenalderivate vertreten. Zu den Valerenalderivaten gehören Valerenal, Valerenol und verschiedene Valerenylester (Houghton, 1998).

Der Gehalt an ätherischem Öl ist auch eine der Qualitätskriterien in der Ph. Eur.. So dürfen nicht weniger als 4 ml ätherisches Öl in 1 Kilogramm getrockneter Droge enthalten sein.

Schwerflüchtige Valerenalderivate

Ebenfalls zu den Valerenalderivaten zählen Valerensäure, Acetoxyvalerensäure und Hydroxyvalerensäure (siehe untenstehende Abbildung) (Houghton (1998)).



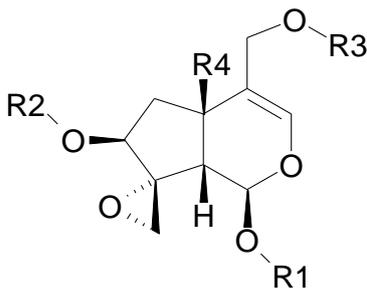
	R1	R2
Valerensäure	COOH	H
Acetoxyvalerensäure	COOH	OCOCH ₃
Hydroxyvalerensäure	COOH	OH

Abbildung 2: schwerflüchtige Verbindungen vom Valerenal- Typ

Die Valerensäure ist typisch für den offizinellen Baldrian und mitverantwortlich für die therapeutische Wirkung der Droge (Khom et al., 2007). In der Ph. Eur. ist deren Gehaltsbestimmung (neben Acetoxyvalerensäure) im Zuge der Identitätsprüfung vorgeschrieben.

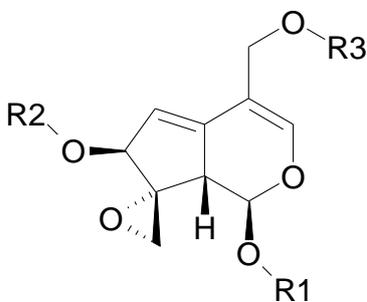
Iridoide

Die in der Wurzel Droge von Baldrian vorkommenden Iridoide werden als Valepotriate (**Valeriana-Epoxytriester**) bezeichnet. Diese lassen sich aufgrund der Anzahl der Doppelbindungen im Ringsystem in Monoenvalepotriate und Dienvalepotriate einteilen (Houghton, 1998). Die wichtigsten Vertreter dieser beiden Gruppen sind in den Abbildungen 3 und 4 veranschaulicht.



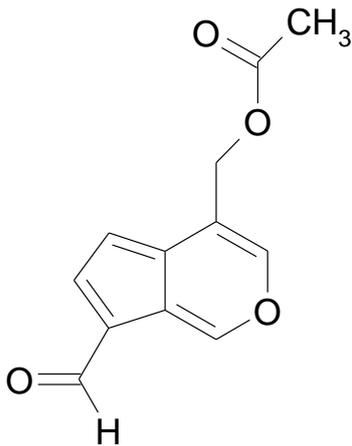
Monoenvalepotriate	R1	R2	R3	R4
Didrovaltrat	Isovalery	Acetyl	Isovalery	H
Homodidrovaltrat	Isocapryl	Acetyl	Isovalery	H
Isovaleryloxy-hydroxydidrovaltrat	Isovalery	Acetyl	2-Isovaleroxy- isovaleryl	OH

Abbildung 3: Monoen-Valepotriate



Dienvalepotriate	R1	R2	R3
Valtrat	Isovalery	Isovalery	Acetyl
Homovaltrat	Isovalery	Isocapryl	Acetyl
Isovaltrat	Isovalery	Acetyl	Isovalery
Acevaltrat	Isovalery	Acetoxyisovaleryl	Acetyl

Abbildung 4: Dienvalepotriate



Aufgrund der instabilen zyklischen Acetalstruktur zerfallen Valepotriate relativ rasch. Es ergeben sich dabei typische Abbauprodukte wie Baldrinol (siehe Abbildung 5), Homobaldrinol und Desacylbaldrinol. Homobaldrinol besitzt eine Isovalerylgruppe statt der Acetyl-Gruppe des Baldrinols, beim Desacylbaldrinol ist diese Acetylgruppe abgespalten (Houghton, 1998).

Abbildung 5: Baldrinol

Lignane

Die aus *Valerianae radix* isolierten Lignane lassen sich in Monoepoxy-Lignane und Diepoxy-Lignane einteilen. Zur ersten Gruppe zählen Massinoniresinol-4'-O- β -D-glucosid und 4'-O- β -D-Glucosyl-9-O-(6''-desoxy-saccharosyl)-olivil. Vertreter der Diepoxy-Lignane sind Pinoresinol und 8-Hydroxypinoresinol (Schumacher et al., 2001).

Flavonoide

Zu den aus *Valerianae radix* isolierten und identifizierten Flavonoiden zählen unter anderem Linarin, 6-Methylapigenin (siehe Abbildung 6) und Hesperidin.

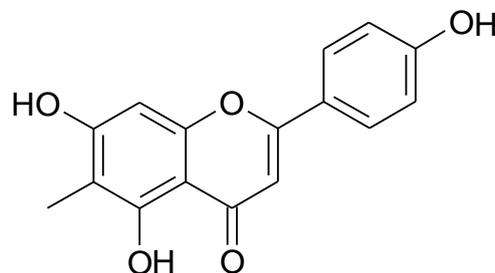


Abbildung 6: 6-Methylapigenin

Ebenfalls sind in der Droge enthalten sind: Alkaloide, Aminosäuren (unter anderem γ -Aminobuttersäure) und Phenolcarbonsäuren wie Chlorogen- und Kaffeesäure (Houghton, 1998).

2.1.2 Pharmakologie und therapeutische Wirksamkeit von Valerianae radix

Wie anfangs bereits erwähnt, wissen die Menschen schon lange um die beruhigende und schlaffördernde Wirkung der Baldrianwurzel bescheid. Im Tierversuch und inzwischen auch in einigen klinischen Studien konnte dies bestätigt werden.

Eine randomisierte, multizentrische Doppelblindstudie hatte das Ziel, die Wirkung von 600 mg Baldrianextrakt LI 156 (Sedonium) mit dem gängigen Schlafmittel Oxazepam (10 mg), verabreicht über einen Zeitraum von sechs Wochen, zu vergleichen. Die Schlafqualität beider Gruppen wies keine signifikanten Unterschiede auf (Ziegler et al., 2002).

In einer randomisierten, internet-basierten Studie (Oxman et. al, 2007) wurden 405 an Schlaflosigkeit leidenden Teilnehmern im Alter von 18 bis 75 Jahren zwei Wochen lang täglich je 3 Filmtabletten à 200 mg Baldrianextrakt verabreicht. Die Anzahl der Teilnehmer, welche am Ende der Testphase eine mittelmäßige bis starke Verbesserung der subjektiv empfundenen Schlafqualität verzeichneten, war in der Baldriangruppe um 5,5% höher als in der Placebogruppe. Bezüglich der Schlafdauer und nächtlichem Erwachen konnten ähnliche Trends festgestellt werden. Donath et al. (2000) kamen in einer randomisierten, placebokontrollierten, doppelblinden Cross-Over-Studie zu ähnlichen Ergebnissen, wobei eine einmalige Gabe keinen Effekt auf die untersuchten Schlafparameter hatte, jedoch bei 14-tägiger Verabreichung signifikante Verbesserungen eintraten.

Der Versuch, die in klinischen Studien bestätigte Wirkung der Baldrianwurzel einem bestimmten Inhaltsstoff oder einer Substanzklasse zuzuschreiben, war jedoch nicht zielführend. Man isolierte Inhaltsstoffe aus dem Vielkomponentengemisch und untersuchte deren Effekte im Tierversuch und in verschiedenen Rezeptorbindungsstudien. Dabei waren Rezeptortypen von Interesse, deren Modulation

den Wach-Schlaf-Rhythmus, bzw. die neuronale Aktivität des ZNS beeinflussen. Solche Eigenschaften haben z. B. Adenosin A₁, GABA_A, 5HT_{5A} Rezeptoren.

Schon 1969 konnte die sedierende Wirkung der Valepotriate an Katzen gezeigt werden (Eickstedt und Rahman, 1969). Weiters konnte durch Untersuchungen am Ileum von Meerschweinchen eine durch Valepotriate induzierte spasmolytische Aktivität festgestellt werden (Wagner und Jurcic, 1979). Spätere Analysen erzielten jedoch gegenteilige Ergebnisse. Dabei wurde die allgemeine Beweglichkeit von Ratten sogar gesteigert. Eine Senkung des cerebralen Glukoseumsatzes in Rattengehirnen ist ein Indiz für eine zentral dämpfende Wirkung. Dies wurde zwar durch die Gabe von Baldrianextrakt, nicht aber durch die Verabreichung der Valepotriate erreicht (Grusla et al., 1986). Lacher et al. (2007) bewiesen für Isovaltrat sogar eine invers agonistische Aktivität am Adenosin A₁-Rezeptor und damit eine stimulierende Wirkung. Aufgrund der chemischen Instabilität der Valepotriate zerfallen diese relativ rasch. Ebenso werden sie im Gastrointestinaltrakt sehr schnell metabolisiert. Ältere Zubereitungen, welche keine Valepotriate mehr enthalten, entfalten trotzdem die für Baldrian bekannte sedierende Wirkung. Daher kann davon ausgegangen werden, dass für die Hauptwirkungen von Baldrian andere Inhaltsstoffe verantwortlich sind (Houghton 1998).

Für das Olivilderivat 4'-O-β-D-Glucosyl-9-O-(6''-desoxysaccharosyl)-olivil wurde gezeigt, dass es den Antagonisten Koffein kompetitiv vom Adenosin A₁-Rezeptor verdrängt. Allerdings ist diese Substanz nur partialagonistisch aktiv und ruft im Vergleich zu vollen Agonisten eine geringere Wirkung hervor (Schumacher et al., 2002). Da dieses Derivat hydrophil ist, ist zu untersuchen, wie es in vivo resorbiert und metabolisiert wird, und ob es die Blut-Hirnschranke passieren kann, bevor man eine Aussage über die Wirksamkeit treffen kann (Trauner, 2009).

Eine Affinität zum GABA_A- Rezeptor wurde für das Flavonoid 6-Methylapigenin nachgewiesen (Wasowski et al. 2002). Diese Substanz und auch das Flavonoid Hesperidin wurden an Mäusen getestet, wobei 6-Methylapigenin anxiolytisch wirkte, während Hesperidin schlaffördernde und hypnotische Effekte zeigte. Bei gleichzeitiger Applikation beider Substanzen wurden zusätzlich synergistische Effekte beobachtet, da die schlaffördernde Wirkung um ein Vielfaches erhöht war (Marder et al., 2003).

Für die Wirkung von Valerianae radix maßgebliche Verbindungen sind Valerensäure und Valerenol. Diese greifen ebenfalls am GABA_A- Rezeptor an, und bewirken dort

eine positive Modulation (Khom et al., 2007; Benke et al., 2009). In Rezeptorbindungsstudien wurde gezeigt, dass Valerensäure keine Affinität zur Benzodiazepinbindungsstelle hat (Marder et al., 2003), und dass die allosterische Modulation von der β_2 - bzw. der β_3 -Untereinheit abhängig ist (Khom et al., 2007). In neuen Untersuchungen wurde deutlich, dass sich die Bindungsstelle von Valerensäure und Valerenol am GABA_A-Rezeptor von allen bisher bekannten unterscheidet (Benke et al., 2009). Diese Substanzen erzielten auch bei *in vivo*-Untersuchungen positive Ergebnisse. Mittels Elevated Plus Maze Test und dem light/dark choice Test konnte an Mäusen ein anxiolytischer Effekt beobachtet werden (Benke et al., 2009). Diese Erkenntnisse sind insofern relevant, weil man hofft, mit Valerensäure und Valerenol Substanzen gefunden zu haben, die die typischen Nebenwirkungen von Benzodiazepinen nicht besitzen, da sie an einer anderen Bindungsstelle angreifen.

Ein weiterer Wirkungsmechanismus der Valerensäure ist die agonistische Aktivität am 5HT_{5a}-Rezeptor. 5HT_{5a} ist ein Serotonin-Rezeptor und ist an der Regelung des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt (Dietz et al. 2005). Das Lignan 8-Hydroxypinoresinol besitzt Affinität zum 5HT_{1a}-Rezeptor, welcher ebenfalls den Schlaf-Wach-Rhythmus steuert (Bodesheim und Hölzl, 1997).

Borneol kann als eine wirksamkeitsmitbestimmende Substanz angesehen werden. So wird es zum Beispiel in der traditionellen chinesischen Medizin als Analgetikum und Anästhetikum verwendet (Bensky et al., 2004). In *in vitro* Studien am GABA_A Rezeptor wurde gezeigt, dass Borneol zu einer starken Potenzierung des durch GABA ausgelösten Cl⁻ Stroms führt, vergleichbar mit der des Anästhetikums Etomidat (Granger et al., 2005).

Es sind jedoch nicht nur Baldrianinhaltsstoffe, die bei Einnahme von etherischer Baldriantinktur einen sedativen/anxiolytischen Effekt auslösen. In einer Studie wurde der Einfluss von Ethanol und Diethylether auf den GABA_A-Rezeptor im Rattenhirn untersucht. Beide Substanzen verringerten die Affinität der Benzodiazepin-Bindungsstelle zum Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil. Ethanol verursachte konzentrationsabhängig sogar eine Inhibition der Bindung von Flumazenil. Diese Inhibition hatte aber keinen Einfluss auf die Affinität des Benzodiazepin-Agonisten Flunitrazepam. Schlußfolgernd wurde festgestellt, dass Ethanol und Diethylether eine von GABA unabhängige Wirkung an der Benzodiazepine-Bindungsstelle entfalten (Quinlan J., 1992).

Da Valerensäure, Valerenol und Borneol auch am GABA_A- Rezeptor angreifen, wäre es interessant zu untersuchen, ob bei der Kombination dieser Substanzen mit Diethylether und Ethanol synergistische Effekte oder andere Wirkungsveränderungen zu beobachten sind. Generell ist die Wirkung von pflanzlichen Arzneimitteln meist durch ein komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Wirkstoffe, und in diesem Fall vielleicht auch der Zubereitungsform zu erklären. Obwohl schon viele wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe von *Valerianae radix* entdeckt und untersucht worden sind, kann davon ausgegangen werden, dass noch viel Forschungsarbeit notwendig ist, um die Gesamtwirkung dieser Droge zu erklären.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Untersuchungsmaterial

Baldrianwurzel, geschnitten von Martin Bauer GmbH & Co.KG, Dutendorfer-Straße 5-7, 91487 Vestenbergsgreuth, Deutschland, mit der Typ Nummer 117709, abgelaufen: 01/2006; dieser Droge wurde die Probennummer 1 zugeordnet.

Baldrianwurzel, geschnitten von Alfred Galke GmbH, Am Bahnhof 1, 37534 Gittelde/Harz, Deutschland; dieser Droge wurde die Probennummer 2 zugeordnet.

Baldrianwurzel, geschnitten von Kottas Pharma GmbH, Eitnergasse 8, A-1230 Wien, mit der Typ Nummer A723155-01, Chargennummer KLA80003, Ablauf: 04.2010; dieser Droge wurde die Probennummer 3 zugeordnet.

Tinktur 1 und 2 wurden vom Department für Pharmakognosie zur Verfügung gestellt.

Tinktur 3 wurde selbst hergestellt. Dafür wurde die Droge Nr. 3 verwendet.

Tinktur 4, von Gatt- Koller GmbH, Daniel-Swarovski-Straße 74, A-6067 Absam, mit der Kontrollnummer 0839/03071107, Ablauf: 03.2010

Zum Vergleich von ethanolischer und etherischer Tinktur wurden noch folgende ethanolische Tinkturen verwendet:

Tinktur 5 von der Herz Jesu Apotheke, Mag. pharm. Marianne Keller KG, Wiedner Hauptstraße 95, 1050 Wien, hergestellt: 02/09

Tinktur 6 von der Apotheke zum Schutzengel, Gentzgasse 26, 1180 Wien, mit der Kontrollnummer K22027

Tinktur 7 von „Die blaue Apotheke“ Mag. Ganster KG, Hauptstraße 153, A-3412 Kierling, mit der Chargennummer 30025072

2.2.2 Reagenzien und Chemikalien

Verwendete Chemikalien

- Anisaldehyd (Firma FLUKA Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
- Ethanol *R* (96 %) (Firma Brenntag CEE GmbH, Wien, Österreich)
- Ethanol 70% *R* (aus Ethanol 96 % hergestellt)
- Diethylether *R* (Firma VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Dichlormethan *R* (Firma VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Ethylacetat *R* (Firma VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Methanol *R* (Firma VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Methanol *R I*, p.a. (Firma VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Essigsäure 99% *R* (Firma Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland)
- Cyclohexan (Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Acetonitril p.a. (Firma VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- o-Phosphorsäure 85% *R* (Firma Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland)
- Wasser *R*
- Kaliumcarbonat (Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumacetat (Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Schwefelsäure konzentriert *R* (Firma Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland)

Verwendete Reinsubstanzen

- Valerensäure (ChNr.:3033, Art.Nr.: 89288, Firma PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland)

- Hydroxyvalerensäure (ChNr.: 937, Art.Nr.: 89224, Firma PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland)
- Acetoxyvalerensäure (ChNr.: 3243, Art.Nr.: 89151, Firma PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland)

2.2.3 Methoden

Tinkturenherstellung

Die Ausgangsdroge wurde pulverisiert (Siebgröße IV ÖAB, 750µm). Anschließend wurden 20 Teile Droge (entsprechen jeweils 90 g) mit 100 Teilen (entsprechen jeweils 450 g) Etheralkohol (Ether + Alkohol: 1 + 3 V/V) nach dem Mazerationsverfahren (ÖAB VI) zur Tinktur (Probennummer 3) verarbeitet.

Bestimmung des Ethergehalts

Die Bestimmung des Ethergehaltes wurde nach dem Verfahren des ÖAB 2009 (Monographie „Tinctura Valerianae aetherea“) durchgeführt. 5 ml Tinktur werden mit 5 ml Kaliumacetat-Lösung ($\rho = 1,174 - 1,186 \text{ g/ml}$) in einem 10 ml fassenden Mischzylinder geschüttelt. Danach wird auf die Ausbildung der Etherschicht gewartet und diese in ml vermessen.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F254 20x20 cm oder HPTLC Kieselgel 60 F254 10x10 cm Fertigplatten (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)

Mobile Phase: $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{EtOAc} : \text{Cyclohexan}$ (2:38:60)

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz *R* (ASR): 0,5 ml Anisaldehyd werden mit 50 ml Eisessig vermischt und anschließend 1 ml konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt.

Die fertig entwickelte und bereits trockene Platte wurde mit ASR besprüht und anschließend 5 bis 10 min lang bei 100 bis 105 °C erhitzt. Die Auswertung erfolgte im Tageslicht.

Alle Platten wurden mit Kammersättigung (30 min) entwickelt.

Auftragen: 20 µl [oder 5 µl]; bandförmig

Laufstrecke: 10 cm [oder 6 cm]

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Das verwendete Gerät setzt sich aus folgenden Modulen zusammen:

Pumpe	Shimadzu SPD 10AD VP Liquid Chromatograph
Controller	Shimadzu SCL-10AD VP Septum Controller
Detektor	Shimadzu SPD M10AD VP Diode Array Detektor
Autosampler	Shimadzu SIL-10AD VP Auto Injector
Degasser	Shimadzu DGU-14A Degasser
Software	LCSolution

Tabelle 1: HPLC-Module

Trennsystem:

Stationäre Phase: Vorsäule: Hypersil Agilent ODS, 5µm, 4x4 mm
 Säule: Hypersil Agilent BDS, 5 µm, l = 0.25 m Ø = 4 mm
 Seriennummer USIN002700

Mobile Phase: Phase A: Acetonitril *R I*, Lösung von Phosphorsäure 85 % *R*
 (5 g · l⁻¹) (20:80 V/V)
 Phase B: Acetonitril *R I*, Lösung von Phosphorsäure 85 % *R*
 (5 g · l⁻¹) (80:20 V/V)

Durchflussrate: 1,5 ml · min⁻¹

Detektion: 220 nm

Injektionsvolumen: 20 µl

Untersuchungslösung: 10,0 g Tinktur wird mit Methanol *R I* zu 50,0 ml verdünnt.

Referenzlösung:

1. 1,0 mg Valerensäure wird in Methanol *R I* zu 10,0 ml gelöst .
Eingewogen wurde 1,02 mg Valerensäure in 10,0 ml Methanol.
2. Eine 1,0 mg Valerensäure entsprechende Menge an standardisiertem Baldriantrockenextrakt *HRS* wird in Methanol *R I* zu 10,0 ml gelöst. Es wurden 102,15 mg standardisierter Trockenextrakt *HRS* in 5,0 ml Methanol gelöst (entspricht 204,30 mg / 10,0ml).

Zeit (min)	Mobile Phase A (% V/V)	Mobile Phase B (% V/V)
0 – 5	55	45
5 – 18	55 → 20	45 → 80
18 – 20	20	80

Tabelle 2: Zeitschema

Relative Dichte

Die relative Dichte wurde anhand eines Pyknometers nach dem Verfahren der Ph. Eur. (Ph. Eur. 6.0, 2.2.5) und dem Verfahren des ÖAB (ÖAB, amtliche Ausgabe 2009, XI, 5 a) bestimmt.

Trockenrückstand

Der Trockenrückstand wurde lt. ÖAB, amtliche Ausgabe 2009: IX, 2, b, ζ durchgeführt.

2.3 Ergebnisse

Bestimmung des Ethergehalts

Die Bestimmung des Ethergehalts wurde nach Anleitung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3 Methoden, Seite 13).

Für die 1. Bestimmung des Ethergehaltes wurde die zur Durchführung benötigte Kaliumacetatlösung lt. ÖAB Monographie *Solutio Kalii acetici R* aus K_2CO_3 und CH_3COOH hergestellt. Jedoch war diese Anleitung mit den angegebenen Mengenverhältnissen ohne gewisse Modifikationen nicht durchführbar: Man sollte den Großteil der angegebenen Menge K_2CO_3 zusetzen, zum Sieden erhitzen, und anschließend portionsweise so viel K_2CO_3 zusetzen, bis eine entnommene Probe mit der zweifachen Menge kohlensäurefreiem Wasser *R* verdünnt, gerade alkalisch reagiert. Jedoch erstarrte die Lösung bei Raumtemperatur, solange sie noch sauer war, weshalb man die entnommene Probe rasch mit Wasser verdünnen musste. In der Monographie sind 60 Teile CH_3COOH und etwa 24 Teile K_2CO_3 angegeben. Bei einer Menge von 30 g CH_3COOH entspräche das etwa 12 g K_2CO_3 . Tatsächlich wurden aber etwa 22 g benötigt. Nach dem Erkalten der Kaliumcarbonatlösung war durch Verdünnen mit Wasser die Dichte auf $\rho = 1,174 - 1,186$ g/ml einzustellen, wobei die Dichte der hergestellten Lösung hier $\rho = 1,177$ g/ml betrug.

Tinktur Nr.	1. Bestimmung	2. Bestimmung	3. Bestimmung
1	2,0 ml	1,9 ml	2,1 ml
2	2,0 ml	1,9 ml	2,2 ml
3	1,9 ml	2,1 ml	2,3 ml
4	-	keine Schicht	keine Schicht

Tabelle 3: Ergebnisse der Prüfung auf den Ethergehalt

Aus Gründen der Zeitersparnis wurde bei den weiteren Bestimmungen darauf verzichtet, das benötigte Kaliumacetat selbst herzustellen. Es wurde wieder eine Lösung von Kaliumacetat in Wasser *R* mit erforderlicher Dichte zubereitet ($\rho = 1,175 \text{ g/ml}$). Um beide Varianten zu vergleichen wurde eine weitere Bestimmung durchgeführt (2. Bestimmung). Um zu untersuchen, ob sich das Volumen der Etherphase verändert, wenn mehr oder weniger Kraft für das Schütteln aufgewandt wird, wurde in der 3. Bestimmung der Meßzylinder nur geschwenkt. Dabei wurde dieselbe Kaliumacetatlösung wie bei der 2. Bestimmung verwendet. Wie in Tabelle 3 (Seite 16) ersichtlich, führt ein stärkeres Schwenken/Schütteln des Zylinders zu einer geringeren Etherschicht. Bei allen 3 Bestimmungen entspricht nur Probe 4 den in der Monographie vorgeschriebenen Werten für den Gehalt an Ether nicht.

Mischbarkeit

„Die Tinktur ist mit Alkohol oder der gleichen Menge verdünntem Alkohol klar, mit Wasser trüb mischbar.“

Hier entsprachen alle Proben der Anforderung des ÖAB.

Dünnschichtchromatographische Identitätsprüfung

Zur Identifizierung der etherischen Baldriantinkturen wurde das DC-System der Monographie „Baldriantinktur“ nach Ph. Eur. 6.0 herangezogen. Dieses Fließmittelsystem setzt sich aus $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{EtOAc} : \text{Cyclohexan}$ in einem Verhältnis von 2:38:60 zusammen. Als Referenzsubstanzen dienen die beiden Sesquiterpensäuren Acetoxyvalerensäure ($R_{f_{\text{Acetoxyval}}} \sim 0,35$) und Valerensäure ($R_{f_{\text{Val}}} \sim 0,50$) (siehe Abbildung 7, Seite 18).

Um zu prüfen, ob sich Unterschiede in der Zusammensetzung der etherischen und der ethanolischen Tinktur ergeben, wurden diese miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass die etherische Tinktur - zusätzlich zu den den Referenzsubstanzen entsprechenden Banden für Valerensäurederivate - auch noch 2 prominente Zonen mit hohen R_f -Werten ($R_{f_1} \sim 0,80$ und $R_{f_2} \sim 0,83$) aufweist (siehe Abbildung 7, Seite 18).

Diese konnten in der ethanolischen Tinktur nicht detektiert werden. Damit eignet sich diese Methode auch für den direkten Vergleich der beiden Tinkturen.

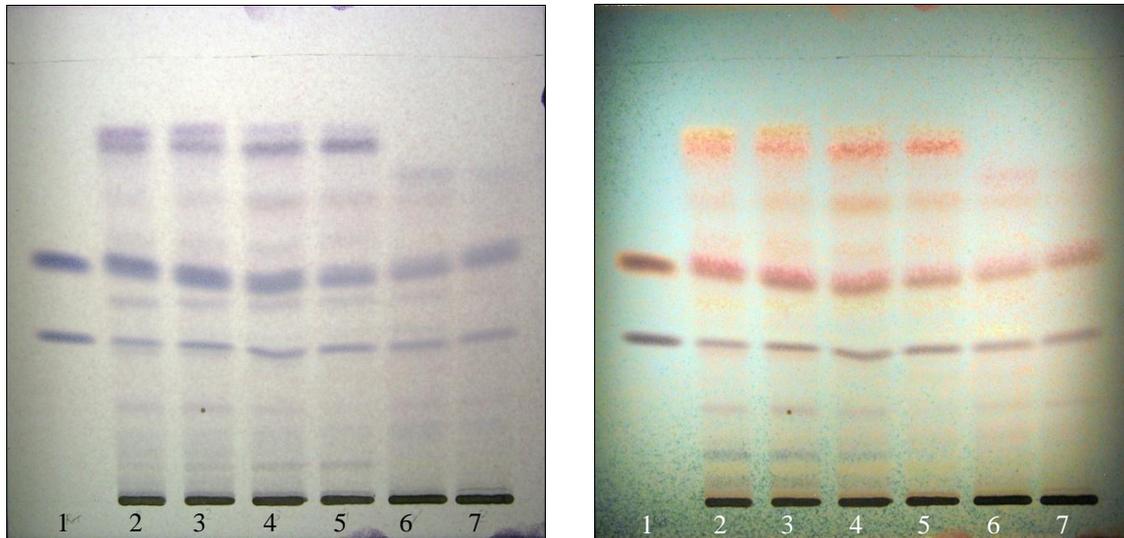


Abbildung 7: Vergleich von etherischen mit ethanolischen Tinkturen- Detektion: ASR/ vis (links)/ UV366 (rechts), DC-Platten Kieselgel 60 F254 20x20 cm, Auftragemenge: 20µl, Bahn 1: Valerensäure, Acetoxyvalerensäure (jeweils 0.25 mg/ml), Bahn 2-5: etherische Tinktur 1, 2, 3 und 4, Bahn 6 und 7: ethanolische Tinktur 1 und 2. 1:1 verdünnt mit Ethanol

Die dünnschichtchromatographische Identifizierung der Baldriantinktur nach Ph. Eur. ist auch für die etherische Baldriantinktur geeignet. In dieser Prüfvorschrift werden entweder DC-Platten (20x20 cm) mit einer vorgeschriebenen Laufstrecke von 10 cm oder HPTLC-Platten (high performance thin layer chromatography) (10x10 cm) mit einer vorgegebenen Laufstrecke von 6 cm verwendet (nicht abgebildet). Mit dem hier verwendeten DC-System werden auf beiden Plattentypen gleich gute Ergebnisse hinsichtlich Trennleistung erzielt.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC wird in der Ph. Eur. sehr häufig zur Gehaltsbestimmung relevanter Inhaltsstoffe verwendet. Zur quantitativen Bestimmung der Sesquiterpensäuren wurde grundsätzlich die in der Ph. Eur.: Monographie „Baldriantinktur“ verwendete Methode eingesetzt (vgl. Seite 14 und 15). Es wurde jedoch zunächst Valerensäure statt dem standardisierten Baldriantrockenextrakt *HRS* als Referenzsubstanz verwendet.

Der Prozentgehalt an Sesquiterpensäuren wird als Valerensäure nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(A_1 + A_2) \cdot m_2 \cdot p \cdot 5}{A_3 \cdot m_1}$$

A_1 = Fläche des Peaks von Acetoxyvalerensäure im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_2 = Fläche des Peaks von Valerensäure im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_3 = Fläche des Peaks von Valerensäure im Chromatogramm der Referenzlösung

m_1 = Einwaage der Tinktur in Gramm

m_2 = Einwaage der zur Herstellung der Referenzlösung verwendeten Menge an Valerensäure in Gramm

p = 99,88 (Reinheit der Valerensäure = 99,88 %), bzw. $p = 0,45$, wenn standardisierter Baldriantrockenextrakt *HRS* mit 0,45 % Valerensäure verwendet wird.

In der nachstehenden Tabelle sind die jeweiligen Einwaagen der Proben und der Referenzsubstanz, sowie die erhaltenen Flächen der Peaks (AUC = area under the curve) und die daraus resultierenden Prozentgehalte an Valerensäure aufgelistet:

Proben	Einwaage in Gramm	AUC	% Valerensäure
Referenzsubstanz	0,00102 (in 10 ml)	4516586	
Tinktur 1	10,01	1625567	0,0183
Tinktur 2	10,01	2737073	0,0308
Tinktur 3	10,01	2459032	0,0277

Tabelle 4: Gehaltsbestimmung von Sesquiterpensäuren mittels HPLC mit Valerensäure als Referenzsubstanz – Werte der Einwaagen, AUCs und berechnete Ergebnisse der Tinkturen 1-3

Es wurde auf eine Doppelbestimmung der Werte verzichtet, da der Gehalt der verwendeten Tinkturen aus folgendem Grund wiederholt bestimmt wurde:

Da Diethylether die physikalischen und chemischen Eigenschaften des zur Herstellung der Tinkturen verwendeten Lösungsmittels verändert, musste überprüft werden, ob dadurch das HPLC System per se und damit der Nachweis der Sesquiterpensäuren beeinflusst wird. Wie in der nachstehenden Tabellen 5-7 (Seite 20 und 21) ersichtlich, wurde der Ether versuchsweise mittels Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck, am Wasserbad und durch Ausblasen mittels Druckluft aus den Proben entfernt, und die Ergebnisse mit denen der unbehandelten, etherhaltigen Tinkturen (siehe Tabelle 4, Seite 19) verglichen.

Proben	Einwaage in Gramm	AUC	% Valerensäure
Tinktur 1	10,01	1625898	0,0183
Tinktur 2	10,02	2761494	0,0311
Tinktur 3	10,02	2475506	0,0279

Tabelle 5: Quantifizierung von Sesquiterpensäuren aus etherischen Baldriantinkturen mittels HPLC/ Ether wurde zuvor mittels Rotationsverdampfer aus den Proben entfernt.

Proben	Einwaage in Gramm	AUC	% Valerensäure
Tinktur 1	10,00	1639512	0,0185
Tinktur 2	10,00	2747135	0,0310
Tinktur 3	10,02	2461410	0,0277

Tabelle 6: Quantifizierung von Sesquiterpensäuren aus etherischen Baldriantinkturen mittels HPLC/ Ether wurde zuvor durch Ausblasen mittels Druckluft aus den Proben entfernt.

Proben	Einwaage in Gramm	AUC	% Valerensäure
Tinktur 1	10,04	1638677	0,0184
Tinktur 2	10,27	2811339	0,0309
Tinktur 3	10,05	2478442	0,0278

Tabelle 7: Quantifizierung von Sesquiterpensäuren aus etherischen Baldriantinkturen mittels HPLC/ Ether wurde zuvor am Wasserbad entfernt.

Wie in Tabelle 4-7 (S. 19 bis 21) zu sehen ist, ist der Gehalt an Sesquiterpensäuren vergleichbar. Die Anwesenheit des Ethers und auch die verschiedenen Methoden, diesen zu entfernen, haben keinen wesentlichen Einfluss auf den Gehalt. Somit kann der Ether problemlos in der Probe belassen werden.

Der Gehalt an Sesquiterpensäuren wurde auch für die Ausgangsdrogen bestimmt, die für die Herstellung der Tinkturen Nr. 2. und Nr. 3 verwendet wurden (lt. Monographie Baldrianwurzel, Ph. Eur. 6.0, jedoch mit der in Tabelle 4 (S.19) beschriebenen Referenzsubstanz).

Drogen	Einwaage	AUC	% Valerensäure
Droge für Tinktur 2	1,51	1949978	0,15
Droge für Tinktur 3	1,55	1790462	0,13

Tabelle 8: Quantifizierung von Sesquiterpensäuren in den zur Herstellung der Tinkturen 2 und 3 verwendeten Drogen mittels HPLC

Der im Ph. Eur. festgelegte Grenzwert für Valerensäure beträgt 0,1 %. Die Wurzel drogen entsprachen somit den Anforderungen des Arzneibuches.

Zum Vergleich wurde die Gehaltsbestimmung anstatt mit Valerensäure auch mit dem im Ph. Eur. vorgesehenen standardisierten Baldriantrockenextrakt *HRS* als Referenz durchgeführt. Da die Tinktur Nr. 4 für vorhergehende Analysen noch nicht zur Verfügung stand, wurde sie doppelt bestimmt und der Mittelwert berechnet.

Die nachstehende Tabelle zeigt die jeweiligen Einwaagen der Proben und der Referenzsubstanz sowie die erhaltenen Flächen der Peaks und die daraus resultierenden Prozentgehalte an Valerensäure:

Proben	Einwaage in Gramm	AUC	% Valerensäure
Referenz a	0,20430 (in 10 ml)	4075589	
Referenz b	0,20430 (in 10 ml)	4274960	
Tinktur 1 a	10,01	1562676	0,0176
Tinktur 2 a	10,01	2677323	0,0302
Tinktur 3 b	10,01	2500396	0,0269
Tinktur 4 a	10,02	2179634	0,0245
Tinktur 4 b	10,02	2211982	0,0237
Tinktur 4 Mittelwert			0,0241

Tabelle 9: Gehaltsbestimmung von Sesquiterpensäuren mittels HPLC mit standardisiertem Baldriantrockenextrakt *HRS* als Referenzsubstanz – Werte der Einwaagen, AUC's und berechnete Ergebnisse der Tinkturen 1-4

In der Monographie für (ethanolische) Baldriantinktur in der Ph. Eur 6.0 ist ein Mindestgehalt von 0,015 % Sesquiterpensäuren festgelegt. Da alle 4 Tinkturen dieser Anforderung entsprechen (Tabelle 9), wird vorgeschlagen, diesen Grenzwert auch für die etherische Baldriantinktur beizubehalten.

Vergleicht man die erhaltenen Prozentgehalte der Tinkturen 1-3 unter Verwendung der zwei Referenzsubstanzen Valerensäure und standardisierter Baldriantrockenextrakt *HRS* (vgl. Tabelle 4, Seite 19 und Tabelle 9, Seite 22), so kann gezeigt werden, dass beide für die quantitative Analyse von Sesquiterpensäuren geeignet sind. Die erhaltenen HPLC-Chromatogramme (siehe Abbildung 8-10, Seite 23) von *HRS*- Extrakt und Tinktur weisen durch das Auftreten zusätzlicher Peaks eine leichte Verschiebung der Retentionszeit von Valerensäure von etwa 15,5 min auf ca. 16 min auf. Der standardisierte Baldriantrockenextrakt *HRS* ist als Vergleich für die etherische Tinktur dem Standard Valerensäure gleichwertig.

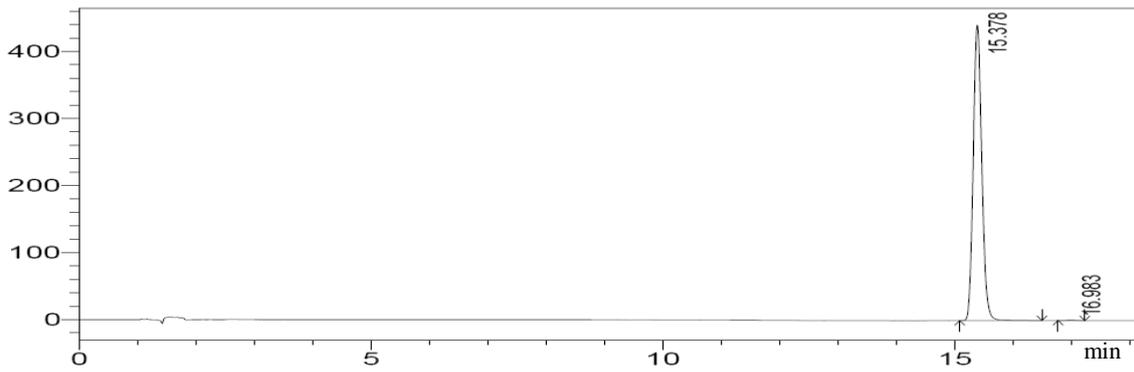


Abbildung 8: HPLC Chromatogramm der Reinsubstanz Valerensäure (99,88 %)
 (Retentionszeit 15.38 min); HPLC- Bedingungen siehe Kapitel 2.2.3, Seite 14 und 15.

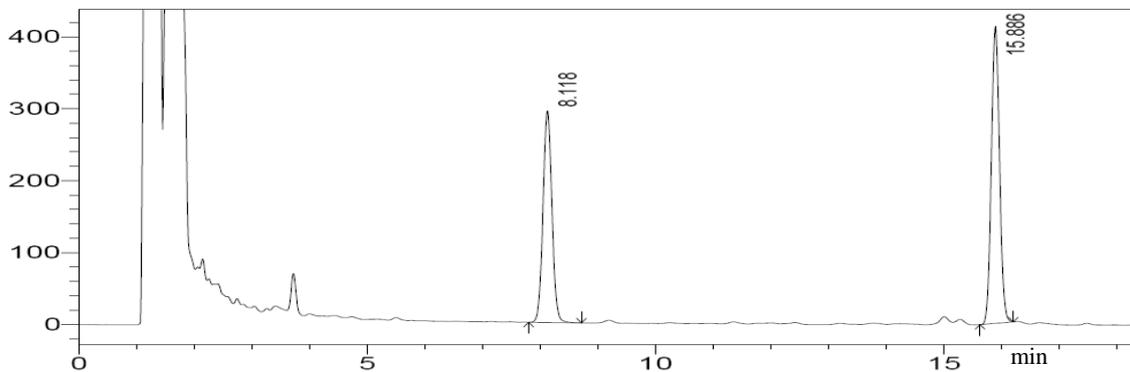


Abbildung 9: HPLC Chromatogramm des standardisierten Baldrianextrakts HRS
 Peak 1 (Retentionszeit 8.12 min): Acetoxyvalerensäure;
 Peak 2 (Retentionszeit 15.89 min): Valerensäure;
 HPLC- Bedingungen siehe Kapitel 2.2.3, Seite 14 und 15.

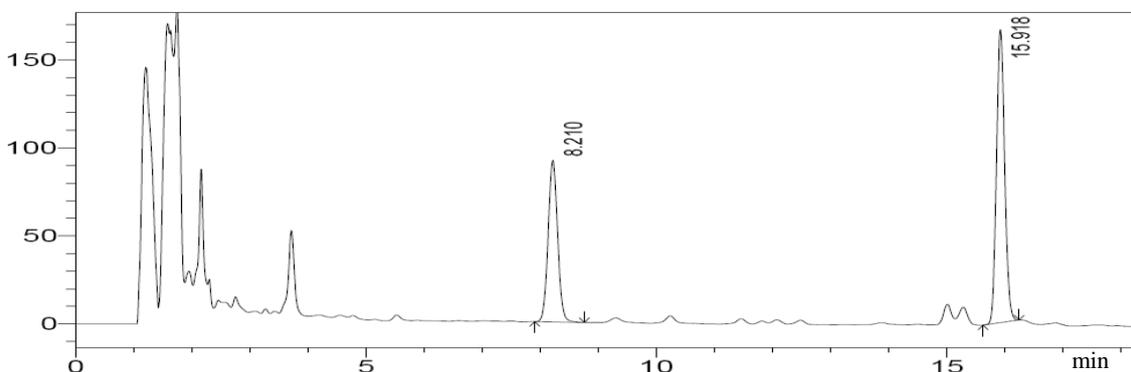


Abbildung 10: HPLC Chromatogramm der Tinktur Nr.2
 Peak 1 (Retentionszeit 8.21 min): Acetoxyvalerensäure;
 Peak 2 (Retentionszeit 15.918 min): Valerensäure;
 HPLC- Bedingungen siehe Kapitel 2.2.3, Seite 14 und 15.

Dichtebestimmung mittels Pyknometer

Im Gegensatz zu den bisherigen Angaben der absoluten Dichte ρ_{20} in den Monographien des ÖAB (amtliche Ausgabe 2009) sind im Ph. Eur. die Grenzwerte der relativen Dichte angeführt. In den neu überarbeiteten Monographien des ÖAB sollen daher ebenfalls die jeweiligen Werte der relativen Dichte angegeben sein.

Im Folgenden wurde zunächst die absolute Dichte der Tinkturen 1-4 (lt. ÖAB, XI, 5 a) in Doppelbestimmung ermittelt und anschließend die Werte mit einem Umrechnungsfaktor (lt. Ph. Eur. 6.0, 2.2.5) in Werte der relativen Dichte umgerechnet.

Die Berechnung der absoluten Dichte erfolgt nach folgender Formel:

$$\rho_{20} = \frac{b - p}{v} - K$$

ρ_{20} = absolute Dichte bei 20 °C

b = Gewicht des gefüllten Pyknometers bei 20 °C

p = Gewicht des leeren Pyknometers

v = Volumen des Pyknometers bei 20 °C

K = Korrekturfaktor zur Berücksichtigung des Auftriebs in Luft (kann lt. ÖAB, XI, 5 a und lt. Ph. Eur. 6.0, 2.2.5 für die hier geforderte Genauigkeit vernachlässigt werden)

Anhand folgender Formel kann aus der absoluten Dichte die relative Dichte d^{20}_{20} berechnet werden:

$$d^{20}_{20} = 1,0018 * \rho_{20}$$

Proben	p [g]	b [g]	v [cm ³]	ρ_{20} [g/ml]	d^{20}_{20}	d^{20}_{20} Mittelwert
Tinktur 1a	17,56112	25,55400	10,160	0,787	0,788	0,788
Tinktur 1b	20,24316	28,09030	9,968	0,787	0,788	
Tinktur 2a	17,60517	25,80820	10,405	0,788	0,789	0,790
Tinktur 2b	16,58055	24,91200	10,566	0,789	0,790	
Tinktur 3a	17,68660	25,73144	10,193	0,789	0,790	0,790
Tinktur 3b	17,16543	25,19897	10,184	0,789	0,790	
Tinktur 4a	17,50937	25,62824	10,192	0,797	0,798	0,798
Tinktur 4b	17,27307	25,39064	10,190	0,797	0,798	

Tabelle 10: Ergebnisse der Bestimmung der absoluten und relativen Dichte der etherischen Tinkturen 1-4

Wie aus der obenstehenden Tabelle (Tabelle 10, Seite 24) zu entnehmen ist, hatten die Proben durchwegs eine niedrigere Dichte als in der Monographie „ätherische Baldriantinktur“ vorgeschlagen wurde. Daher müssen die Grenzwerte für die Dichte von $\rho_{20} = 0,800 - 0,810$ g/ml auf $d^{20}_{20} = 0,785 - 0,800$ geändert werden.

Trockenrückstand

Die Bestimmung des Trockenrückstands wurde nach Vorschrift lt. ÖAB, amtliche Ausgabe 2009: IX, 2, b, ζ durchgeführt (Doppelbestimmung). Hierbei werden 3,0000 – 5,0000 g der Tinktur eingewogen, am Wasserbad eingedampft und anschließend im Trockenschrank bei 103 – 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Im Vergleich dazu ist in der Ph. Eur. 6.0: 2.8.16 eine Einwaage von 2,00 g bzw. 2,0 ml vorgeschrieben, und es wird nach dem Eindampfen am Wasserbad drei Stunden lang im Trockenschrank getrocknet. Somit liefert die Vorschrift des ÖAB genauere Ergebnisse. In der neu überarbeiteten Monographie des ÖAB wird jedoch die etwas zeitsparendere Methode der Ph. Eur. verwendet.

Proben	Einwaage [g]	Rückstand [g]	Trockenrückstand [%]	Mittelwert
Tinktur 1a	4,5460	0,0468	1,03	1,02
Tinktur 1b	4,6430	0,0467	1,01	
Tinktur 2a	4,2470	0,0465	1,09	1,09
Tinktur 2b	4,0203	0,0440	1,09	
Tinktur 3a	4,3882	0,0481	1,10	1,11
Tinktur 3b	4,6841	0,0525	1,12	
Tinktur 4a	4,4915	0,0394	0,88	0,86
Tinktur 4b	4,9630	0,0422	0,85	

Tabelle 11: Einwaagen und Ergebnisse der Prüfung auf Trockenrückstand (lt. ÖAB, amtliche Ausgabe 2009: IX, 2, b, ζ)

3 der 4 Proben entsprachen der Anforderung des ÖAB: mind. 1,0 % Trockenrückstand. Die vierte Probe, die von Gatt Koller zur Verfügung gestellt worden ist, unterschreitet diesen Wert, daher wird vorgeschlagen, den Mindestgehalt auf 0,9 % hinab zu setzen.

2.4 Diskussion

Valerianae tinctura aetherea wird mit einer Ethanol-Diethylether-Mischung hergestellt. Diethylether als Inhalationsnarkotikum wurde wegen der unangenehmen Nebenwirkungen schon vor langer Zeit durch neuere Wirkstoffe ersetzt. Orale Anwendung findet Diethylether immer noch in den Hoffmannstropfen (siehe auch Solutio Aetheris spirituosa im ÖAB), welche nach wie vor erhältlich sind. Das Mischungsverhältnis von Diethylether und Ethanol zur Herstellung der etherischen Tinktur ist ident mit den Hoffmannstropfen (~1870 von Friedrich Hoffmann erfunden) Diese Rezeptur wurde wie auch Baldrian traditionell zur Linderung von nervösen Beschwerden eingesetzt (Kleij, 2003). Eine Literaturrecherche und Rücksprache mit „Experten“ ergab, dass die orale Anwendung von Diethylether in den verwendeten Mengen nicht reglementiert ist. Die akute Toxizität bei oraler Anwendung von Diethylether liegt bei etwa 260 mg/kg Körpergewicht (LD_{LO} Mensch) (Merck Sicherheitsdatenblatt), wohingegen die gebräuchliche Einzeldosis von etherischer Baldriantinktur einer Einnahme von etwa 125 - 250 mg Ether eines normalgewichtigen Erwachsenen (70 kg) entspricht. Daher kann die fachgerechte Einnahme von etherischer Baldriantinktur als unbedenklich angesehen werden. Die kombinierte Anwendung von Baldrian, Diethylether und Ethanol könnte zu einer verbesserten sedativen Wirkung führen. So wurde zum Beispiel in wissenschaftlichen Studien nachgewiesen, dass sowohl Baldrian (Khom et al., 2007; Benke et al., 2009) als auch Ethanol und Diethylether (Quinlan J J., 1992) am GABA_A- Rezeptor wirksam sind. Aufgrund der höheren Lipophilie der zur Herstellung dieser Tinktur verwendeten Mischung aus 3 Teilen Ethanol 96 % und 1 Teil Diethylether im Vergleich zum in der Monographie „Baldriantinktur“ verwendeten Ethanol (70 %) kann davon ausgegangen werden, dass sich auch das Spektrum der aus der Droge extrahierten Substanzen verändert. Die bisher identifizierten, für die Hauptwirkung verantwortlichen Inhaltsstoffe, wie z. B. Valerensäure, Valerenol und Borneol sind ebenfalls lipophil. Um zu beweisen, ob deren Anteile in der etherischen Tinktur wirklich höher sind als in der ethanolischen, müsste man beide Tinkturen vergleichen. Diese müssten aus derselben Rohdroge hergestellt sein, da Inhaltsstoffe von Arzneidrogen je nach Anbaugebiet, Wetter, Erntezeitpunkt etc. natürlichen Schwankungen unterliegen können.

Anhand der Originalmonographie (Abbildung 11, Seite 30) und der im Kapitel 2.5 (Seite 31–35) vorgestellten neuen Version einer Monographie sind die vorgenommenen Änderungen gut einzusehen. Vom neuen Namen und einigen Veränderungen der Form abgesehen, wurden auch zwei sehr wesentliche Punkte abgeändert: Identifizierung mittels DC und Gehaltsbestimmung mittels HPLC. In beiden Fällen werden sowohl Valerensäure als auch Acetoxyvalerensäure als Referenzsubstanzen herangezogen. Valerensäure ist ein typischer Inhaltsstoff für den offizinell verwendeten Baldrian und wurde bisher in keiner anderen *Valeriana*-Species gefunden (Houghton, 1998). Aus diesem Grund wird dessen Vorkommen, neben Acetoxyvalerensäure, im Zuge der Prüfung auf Identität nachgewiesen, und zwar mittels der für diese Monographie neu eingeführten Dünnschichtchromatographie. Diese hat den großen Vorteil, dass sie sehr kostengünstig und mit wenig apparativem Aufwand relativ rasch in jeder Apotheke durchführbar ist. Da in der Monographie der ethanolischen Baldriantinktur in der Ph. Eur. bereits eine diesbezügliche Prüfvorschrift existiert, konnte diese unverändert übernommen werden. Im experimentellen Teil wurden auch verschiedene Proben der *Valerianae tinctura aetherea* mit Proben der (ethanolischen) *Tinctura Valerianae* verglichen. Die etherische Tinktur weist im Vergleich zur ethanolischen Tinktur zusätzliche Banden mit hohen R_f-Werten auf. Damit kann die Dünnschichtchromatografie auch zur direkten Unterscheidung der beiden Zubereitungen herangezogen werden.

Schon die „Definition“ beinhaltet neben einer kurzen Produktbeschreibung einen festgelegten Mindestgehalt an Sesquiterpensäuren. Die Gehaltsbestimmung spezifischer Hauptinhaltsstoffe ist im Sinne der Qualitätssicherung essentiell. In Kürze können exakte Aussagen über die Güte des vorliegenden Produkts getroffen werden. Durch Vergleiche verschiedener HPLC-Chromatogramme ließe sich diese Methode auch hervorragend zur Prüfung auf Identität einsetzen, bzw. könnten Verfälschungen detektiert werden. Die Durchführung der Bestimmung dieses Gehalts mittels HPLC ist im vorletzten Punkt „Gehaltsbestimmung“ der Monographie genau beschrieben. Da in der Ph. Eur. bereits eine moderne Monographie von der ethanolischen Baldriantinktur existiert, konnte die dort verwendete Prüfvorschrift unverändert übernommen werden. Zum Vergleich wurde dieselbe Vorschrift auch mit Valerensäure statt des in der Ph. Eur. verwendeten standardisierten Trockenextrakts *HRS* als Referenzsubstanz durchgeführt und erzielte dieselben reproduzierbaren Ergebnisse. Da der Anteil an Diethylether die physikalischen und chemischen Eigenschaften des zur Herstellung der

Tinkturen verwendeten Lösungsmittels verändert, war auch zu klären, ob dadurch das HPLC System per se und damit der Nachweis der Sesquiterpensäuren beeinflusst wird. Zusätzlich wurden verschiedene Methoden ausprobiert, den Ether abzutrennen, weil sich manche Substanzen z. B. durch das Erhitzen, Luftsauerstoff etc. vielleicht zersetzen könnten. Dafür wurde der Diethylether versuchsweise am Rotationsverdampfer, am Wasserbad und durch Ausblasen mittels Druckluft entfernt. Die HPLC-Chromatogramme der so behandelten Proben wurden mit dem der unbehandelten etherischen Tinktur verglichen und zeigten allesamt keine nennenswerten Unterschiede. Es ist also nicht notwendig, den Diethylether zu entfernen, um eine HPLC-Bestimmung durchzuführen.

Die Bestimmung des Ethergehalts und der Mischbarkeit waren auch Teil der alten Monographie und wurden nicht verändert. Zur Etherbestimmung ist noch zu erwähnen, dass sich die Herstellung der benötigten Kaliumacetatlösung (lt. ÖAB Monographie *Solutio Kalii acetici R*) als relativ umständlich erwies und deshalb empfohlen wird, die Lösung aus Kaliumacetat und Wasser zuzubereiten. Zusätzlich ist anzumerken, dass sich die abzulesende Etherschicht im Mischzylinder verringert, wenn dieser zu intensiv geschüttelt wird. Höhere Ergebnisse wurden erzielt, wenn der Mischzylinder nur leicht geschwenkt wurde. Es kann deshalb je nach Art der Durchführung zu erheblichen Schwankungen der Ergebnisse kommen.

Weitere Änderungen betreffen den Punkt „Prüfung auf Reinheit“. Die festgelegten Grenzwerte für die Dichte und den Trockenrückstand wurden aufgrund der experimentell ermittelten Werte etwas nach unten korrigiert. Die Dichte als Qualitätskriterium von Tinkturen ist sinnvoll, um Verfälschungen nachzuweisen, welche sich in ihrer Dichte von der der Zubereitung unterscheiden. Handelt es sich hierbei um nicht flüchtige Stoffe, erhöhen diese auch die Auswaage des Trockenrückstands, welcher eigentlich ein Maß für die aus der Droge extrahierten Inhaltsstoffe ist. Auch flüchtige, flüssige Verfälschungen mit einer anderen spezifischen Dichte werden nachgewiesen. Dies könnten z.B. Veränderungen in der zur Herstellung von Tinkturen verwendeten Lösungsmittelzusammensetzung sein. Die Dichte der untersuchten Tinktur Nr. 4 lag innerhalb des vorgeschriebenen Grenzwertbereichs. Der Ethergehalt dieser Probe war jedoch mit der verwendeten Bestimmungsmethode nicht bestimmbar. Die spezifische Dichte von Diethylether (0,713 g/ml) liegt aber deutlich unter der von Ethanol (0,789 g/ml). Im ÖAB ist für die hier verwendete Ether-Ethanol-Mischung eine Dichte

von 0,785-0,790 g/ml angegeben. Es kommt also zu einer Kontraktion des Volumens wie auch bei Ethanol-Wasser-Mischungen. Da durch die Bestimmung der Dichte somit keine Aussagen über den Gehalt an Diethylether getroffen werden können, ist die Bestimmung des Ethergehalts im Speziellen ein wichtiger Punkt in dieser Monographie.

Um den Vorgaben der Ph. Eur. gerecht zu werden, werden die in der alten ÖAB-Monographie im Punkt „Prüfung auf Identität“ zu findende Geruchsprobe, die Reinheitsprüfung auf Methylalkohol und iso-Propylalkohol und der Punkt „Dosierung“ nicht in die neu überarbeitete Monographie übernommen.

Abschließend war nur noch eine Anpassung des Layouts entsprechend dem Stil der Ph. Eur. durchzuführen, um die Revision dieser Monographie als vollständig betrachten zu können.

Tinctura Valerianae aetherea

Ätherische Baldriantinktur

Bereitung

Baldrianwurzel (IV)	20 Teile
Ätheralkohol	100 Teile

werden nach dem Mazerationsverfahren (ÖAB.: VI) zur Tinktur verarbeitet.

Beschreibung

Rötlichbraune Flüssigkeit, die deutlich nach Baldrianwurzel und Äther riecht und schmeckt.

Mischbarkeit: Ätherische Baldriantinktur ist mit Alkohol oder der gleichen Menge verdünntem Alkohol klar, mit Wasser trüb mischbar.

Prüfung auf Identität

Verdünnt man 1 ml Ätherische Baldriantinktur mit 1000 ml Wasser, so muß noch deutlich der Geruch nach Baldrianwurzel wahrnehmbar sein.

Äthergehalt: Schüttelt man 5 ml Ätherische Baldriantinktur mit 5 ml Kaliumazetatlösung (R) in einem 10 ml fassenden Mischzylinder, so muß sich eine ätherische Schichte von mindestens 1,8 ml abscheiden.

Prüfung auf Reinheit

Dichte: $\rho = 0,800 - 0,810$ (ÖAB.: XI, 5).

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

Trockenrückstand: Mindestens 1,0 % (ÖAB.: IX, 2, b, ζ).

Aufbewahrung

Vor direktem Sonnenlicht geschützt, in dicht schließenden Gefäßen, in Mengen über 1 Liter an einem kühlen, feuersicheren Ort.

Dosierung

Gebräuchliche Einzeldosis: 0,5 – 1,0 g.

Abbildung 11: zu überarbeitende ÖAB-Originalmonographie von *Tinctura Valerianae aetherea*

2.5 Vorschlag für die neue Monographie von *Tinctura Valerianae aetherea*

Baldriantinktur, etherische

Valerianae tinctura aetherea

Tinctura Valerianae aetherea

Definition

Baldriantinktur, etherische, wird aus Etheralkohol (Ether + Ethanol 1 + 3) und Baldrianwurzel (*Valerianae radix*) hergestellt.

Gehalt: mindestens 0,015 Prozent (*m/m*) Sesquiterpensäuren, berechnet als Valerensäure ($C_{15}H_{22}O_2$; *Mr* 234,3)

Herstellung

Die Tinktur wird aus 1 Teil Droge und 5 Teilen Etheralkohol (Ether + Alkohol: 1 + 3 V/V) nach einem geeigneten Verfahren hergestellt.

Eigenschaften

Aussehen: Rötlichbraune Flüssigkeit, die deutlich nach Baldrianwurzel und Ether riecht und schmeckt.

Prüfung auf Identität

Mischbarkeit

Die Tinktur ist mit Ethanol oder der gleichen Menge Ethanol 70 % R klar, mit Wasser trüb mischbar.

Ethergehalt

Schüttelt man 5 ml Tinktur mit 5 ml Kaliumazetatlösung (siehe Solutio Kalii acetici *R*, ÖAB) in einem 10 ml fassenden Mischzylinder, so muß sich eine etherische Schichte von mindestens 1,8 ml abscheiden.

Dünnschichtchromatographie (2.2.27)

Untersuchungslösung: 5 ml Tinktur werden mit 5 ml Ethanol 70 % *R* gemischt.

Referenzlösung: 5 mg Acetoxyvalerensäure *R* und 5 mg Valerensäure *R* werden in 20 ml Methanol *R* gelöst.

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

Fließmittel: Essigsäure 99 % *R*, Ethylacetat *R*, Cyclohexan *R* (2:38:60 V/V/V)

Auftragen: 20 µl [oder 5 µl]; bandförmig

Laufstrecke: 10 cm [oder 6 cm]

Trocknen: an der Luft

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

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

Oberer Plattenrand	
_____ Valerensäure: eine violette Zone Acetoxyvalerensäure: eine violette Zone _____	2 schwache bis sehr schwache, violette Zonen eine violette Zone (Valerensäure) eine violette Zone (Acetoxyvalerensäure)
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Relative Dichte (2.2.5): $\rho = 0,785 - 0,800$ g/ml (ÖAB.: XI, 5).

Trockenrückstand (2.8.16): Mindestens 0,9 % (ÖAB.: IX, 2, b, ζ).

Gehaltsbestimmung

Flüssigchromatographie (2.2.29)

Untersuchungslösung: 10,0 g Tinktur mit Methanol R 1 zu 50,0 ml verdünnt.

Referenzlösung: Eine 1,0 mg Valerensäure entsprechende Menge an *standardisiertem Baldriantrockenextrakt HRS* wird in Methanol *R* 1 zu 10,0 ml gelöst.

Säule:

- Größe: $l = 0,25 \text{ m}$, $\varnothing = 4,0 \text{ mm}$
- Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie *R* (5 μm)

Mobile Phase

- Mobile Phase A: Acetonitril *R* 1, Lösung von Phosphorsäure 85 % *R* (5 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) (20:80 V/V)
- Mobile Phase B: Lösung von Phosphorsäure 85 % *R* (5 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), Acetonitril *R* 1 (20:80 V/V)

Zeit (min)	Mobile Phase A (% V/V)	Mobile Phase B (% V/V)
0 – 5	55	45
5 – 18	55 \rightarrow 20	45 \rightarrow 80
18 – 20	20	80

Durchflussrate: 1,5 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Detektion: Spektrometer bei 220 nm

Einspritzen: 20 μl

Identifizierung von Peaks: Zur Identifizierung der Peaks von Acetoxyvalerensäure und Valerensäure werden das mitgelieferte Chromatogramm von standardisiertem Baldriantrockenextrakt *HRS* und das mit der Referenzlösung erhaltene Chromatogramm verwendet.

Eignungsprüfung: Referenzlösung

– Relative Retention (bezogen auf Valerensäure, t_R etwa 15 min):

Acetoxyvalerensäure: etwa 0,5

Der Prozentgehalt an Sesquiterpensäuren wird als Valerensäure nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(A_1 + A_2) \cdot m_2 \cdot p \cdot 5}{A_3 \cdot m_1}$$

A_1 = Fläche des Peaks von Acetoxyvalerensäure im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_2 = Fläche des Peaks von Valerensäure im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_3 = Fläche des Peaks von Valerensäure im Chromatogramm der Referenzlösung

m_1 = Einwaage der Tinktur in Gramm

m_2 = Einwaage der zur Herstellung der Referenzlösung verwendeten Menge an standardisiertem Baldriantrockenextrakt *HRS* in Gramm

p = Prozentgehalt an Valerensäure in standardisiertem Baldriantrockenextrakt *HRS*

Lagerung

Vor Licht geschützt, in dicht schließenden Gefäßen.

3 Vitis-idaeae folium

3.1 Einleitung

Die Teedroge Vitis-idaeae folium wird in der Volksheilkunde schon seit langem bei Gicht, rheumatischen Beschwerden, Steinleiden, hauptsächlich aber bei Entzündungen der Gallen- und Harnwege eingesetzt (Moeck, 1994). Sie stellt eine Alternative zu Bärentraubenblättern dar, welche zur Unterstützung bei der Behandlung von Blasen- und Nierenbeckenkatarrhen angewendet werden (Wichtl und Czygan, 2002). Die harn(wegs)-desinfizierende Wirkung von Vitis-idaeae folium wird durch die darin enthaltenen Phenolglykoside (u.a. Arbutin) erklärt (Holopainen, 1988).

In der zu überarbeitenden Monographie des ÖAB ist die Droge Vitis-idaeae folium als das getrocknete Laubblatt von *Vaccinium vitis-idaea* L. definiert. Diese Pflanze (siehe Abbildung 12, Seite 37) gehört zu der Familie der Ericaceae. Im deutschsprachigen Raum wird sie als Preiselbeere bzw. als Kronsbeere, im Englischen als Cowberry, Lingonberry, Red Whortleberry oder als Mountain- bzw. Rock-Cranberry bezeichnet. Beheimatet ist die Preiselbeere auf der gesamten nördlichen Hemisphäre in Nadelwäldern und Zwergstrauchheiden. Sie gedeiht auf kalkarmen Böden und ist bis in die alpine Stufe hinauf zu finden (Moeck, 1994).

Vaccinium vitis-idaea ist ein immergrüner Halbstrauch, der eine Wuchshöhe von etwa 10 bis 30 cm erreicht. Jüngere Zweige sind flaumig behaart, während ältere verkahlen. Die Blätter sind wechselständig angeordnet. Die genaue Morphologie der Blätter ist in Kapitel 3.5 auf Seite 70 und 71 nachzulesen. Die Blüten sind in vielblütigen hängenden Trauben angeordnet und bestehen aus einem hautigen, 5-lappigen Blütenkelch und einer glockenförmigen, weiß bis schwach rosafarbenen, 8-10 mm langen Blütenkrone, welche bis zur Hälfte 4-5-teilig ist. Der Griffel ragt aus der Blüte heraus und die 10 Staubblätter bestehen aus einem behaarten Filament und zweispitzigen Antheren. Die vielsamigen, kugelig, glänzenden Beeren sind zuerst weiß, dann rot (Moeck, 1994).



Abbildung 12: *Vaccinium vitis-idaea* L.

(aus http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium_vitis-idaea_20060824_003.jpg, 26.03.2010, 11:40)

3.1.1 Inhaltsstoffe von *Vaccinium vitis-idaea* L.

Gerbstoffe und Gerbstoffvorstufen

In *Vitis-idaea* folium sind 9,9-19,5 % Gerbstoffe enthalten. Der Hauptanteil davon sind Catechingerbstoffe. Unter den Gerbstoffvorstufen stellen Catechin (8%) und Epicatechin die Hauptkomponenten dar.

Proanthocyanidine

Aus der Gruppe der Proanthocyanidine stehen mengenmäßig das Catechin-Epicatechin-Dimer B-1 und das Epicatechin-Dimer B-2 mit jeweils 0,1-0,5 % an erster Stelle. Weiters sind das Catechin-Dimer B-3 (0,05-0,1 %), das Epicatechin-Catechin-Dimer B-7 (< 0,01 %) und das Dimer A-1 enthalten.

Phenolische Verbindungen

Zu den wichtigsten in Preiselbeerblättern vorkommenden phenolischen Verbindungen zählen das Phenolglykosid Arbutin (siehe Abbildung 13, Seite 38) mit 3,3-5,4 % neben 0,1-0,2 % Hydrochinon. In viel geringeren Konzentrationen kommen Pyrosid (6-

Acetyl-arbutin, 20 mg / 100 g), Salidrosid (2-(4-Hydroxyphenyl) ethanol- β -D-glucopyranosid, 15 mg / 100 g), Hydrochinongentiobiosid (Arbutin-6'- β -glucosid, 1,2 mg / 100 g)) und 2-O-Caffeoylarbutin vor.

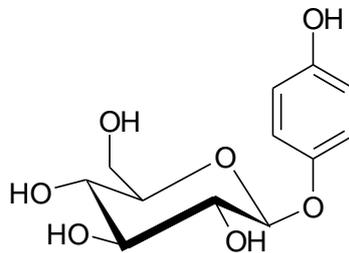


Abbildung 13: Arbutin

Flavonoide

In der Droge wurden Flavonolglykoside wie Avicularin, Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin nachgewiesen

Die Droge enthält weiters Triterpene wie z. B. β -Amyrin, Oleanolsäure und Ursolsäure, einige organische Säuren, wie Kaffeesäure, Cumarsäure, p-Hydroxybenzoesäure und in Spuren Salicylsäure, Ferulasäure und Gentisinsäure sowie Mineralstoffe (Moeck, 1994).

Das Spektrum der in *Vitis-idaea* folium enthaltenen Verbindungen wurde u.a. von Wang et al. (2002) untersucht. Dabei wurden neue Inhaltsstoffe wie z.B. Fraxin (ein Cumarin-glucosid, siehe Abbildung 14) und Daucosterol (β -Sitosteryl β -D-glucosid) bekannt.

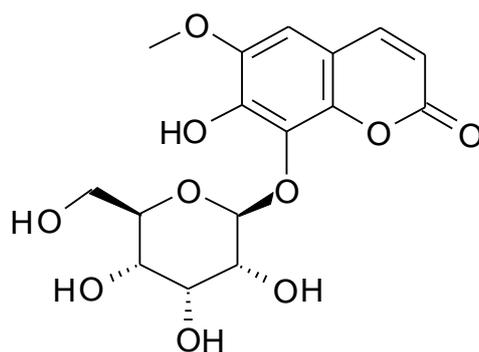


Abbildung 14: Fraxin

3.1.2 Pharmakologie und therapeutische Wirksamkeit von *Vitis-idaeae folium*

Wie in Punkt 3.1 (Seite 36) bereits erwähnt, werden Preiselbeerblätter als Alternative zu Bärentraubenblättern zur Unterstützung bei der Behandlung von Blasen- und Nierenbeckenkatarrhen angewendet. Die antibakterielle Wirkung dieser Drogen wird der Stoffgruppe der Phenolglykoside zugeschrieben. Da in *Vitis-idaeae folium* der Gehalt an Arbutin im Vergleich zu den restlichen Phenolglykosiden unverhältnismäßig hoch ist (siehe Kapitel 3.1.1, Seite 37), wird in erster Linie dieses für die Wirkung verantwortlich gemacht. Aufgrund zahlreicher Experimente konnte diese Annahme auch bestätigt werden.

Verschiedene in Finnland heimische Heidekrautgewächse wurden auf ihre bakterizide Aktivität getestet. Die aus *Vaccinium vitis-idaea* und *Arctostaphylos uva-ursi* hergestellten Extrakte zeigten den größten Effekt auf *Escherichia coli*- und *Proteus vulgaris*-Stämme. Da diese Pflanzen beide viel mehr Arbutin enthielten als die anderen Arten, bestätigte sich der Verdacht, dass die antibakterielle Wirkung hauptsächlich auf diesen Inhaltsstoff zurückzuführen ist (Holopainen, 1988).

Bereits 1969 wurde der harndesinfizierende Effekt von aus *Uvae-ursi folium* hergestellten Extrakten untersucht. Dabei wurde der Metabolismus von Arbutin erforscht. Man fand heraus, dass nach oraler Verabreichung Arbutin sehr schnell hydrolysiert wird und dabei Hydrochinon entsteht. Dieses wird dann mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure konjugiert um es wieder auszuschcheiden zu können. Man kam zu dem Ergebnis, dass Arbutin selbst keine antibakterielle Aktivität besitzt, sondern Hydrochinon. Um eine Wirkung zu erzielen, müssten die inaktiven Hydrochinonkonjugate wieder aufgespalten werden, wozu ein alkalisches Milieu (pH 8) des Harns notwendig ist (Frohne et al., 1969). In darauf folgenden Experimenten wurde versucht, den Harn mit Natriumhydrogenkarbonat auf pH 8 einzustellen. Dabei traten Schwierigkeiten auf, diesen pH-Wert mit oral applizierbaren Dosen zu erreichen. Außerdem wurden selbst bei einer erfolgreichen Alkalisierung des Harns keine therapeutisch wirksamen Konzentrationen von freiem Hydrochinon gefunden (Paper et al. 1993). In einer neueren klinischen Studie wurde bewiesen, dass oral verabreichtes Arbutin unabhängig vom pH-Wert des Harns antibakteriell wirkt. Es konnte gezeigt

werden, dass *Escherichia coli* Bakterien selbst die Fähigkeit besitzen, die Hydrochinonglucuronid- und Hydrochinonsulfat-Bindungen zu spalten. Die inaktiven Konjugate werden in den Bakterien angereichert, wo das aktive Hydrochinon durch Enzyme wieder freigesetzt wird (Siegers et al., 1997 und 2003).

Freies Hydrochinon steht schon länger unter dem Verdacht, mutagene und möglicherweise karzinogene Eigenschaften zu besitzen. Deshalb hat die Kommission E für die innerliche Anwendung von *Uvae-ursi folium* und deren Extrakte eine zeitliche Begrenzung sowie eine entsprechende Dosierung festgelegt (Wichtl und Czygan, 2002). Dieselben Bestimmungen gelten auch für *Vitis-idaeae folium* (Schönfelder und Schönfelder, 2004). Siegers et al. (1997) konnte *in vitro* und *in vivo* mittels Ames-Test und Micronucleus-Test zeigen, dass bei der empfohlenen Dosierung keine genotoxischen Konzentrationen von Hydrochinon im Harn auftreten. Durch eine Studie über die Pharmakokinetik von Arbutin im menschlichen Körper wurden diese Ergebnisse belegt (Quintus et al., 2005).

Aufgrund der Vielfalt verschiedener Inhaltsstoffe in pflanzlichen Arzneimitteln ist selten nur ein Wirkstoff an der Gesamtwirkung beteiligt. Für das in *Vitis-idaeae folium* enthaltene Fraxin wurde im Tierversuch an Ratten bewiesen, dass es wie Arbutin nach oraler Applizierung in den Blutkreislauf absorbiert wird. In weiteren Tests zeigten beide Substanzen anti-inflammatorische, hustenlindernde und schleimlösende Wirkungen bei akuten und chronischen Entzündungen der Atemwege (Wang et al., 2005).

Antivirale Wirkungen eines 10%igen Infuses wurden bewiesen, aber konnten damals noch keinem Inhaltsstoff zugeordnet werden. Man verzeichnete virustatische Effekte bei Herpes-Virus Hominis HVP75 (Typ 2) und bei dem Influenza-Virus A2 Mannheim 57 und zugleich cytotoxische Effekte auf die Wirtszellen (Moeck, 1994). In einer neueren Studie zeigte das aus *Vitis-idaeae folium* isolierte Proanthocyanidin A-1 eine antivirale Aktivität gegen das Herpes Simplex Virus Typ 2 (HSV-2). *In vitro* traten bei wirksamen Konzentrationen keine cytotoxischen Effekte auf. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus konnte aber noch nicht aufgeklärt werden (Cheng et al., 2005).

In zahlreichen Studien wurde somit gezeigt, dass Preiselbeerblätter, dessen Hauptinhaltsstoff Arbutin, aber auch andere enthaltene Verbindungen antibakterielle, anti-inflammatorische und antivirale Wirkung zeigen. Die Anwendung von

Preiselbeerzubereitungen ist somit auch heute noch gerechtfertigt, insbesondere zur Behandlung wiederkehrender Harnwegsinfektion bei Frauen (Jepson and Craig, 2008).

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen an *Vitis-idaea* folium wurde folgendes Ausgangsmaterial verwendet:

Probe Nr.	Firma	Bezeichnung	Chargenr.
1	Richter	KL-16050/07	22568
2	Kottas	Muster 1884	6120237#1
3	Kottas	Muster 1886	8020250#1
4	Kottas	Muster 1885	7110296#1
5	Kottas	Kontr. Nr. KLA 80253	A 820835-001
6	Kottas	Kontr. Nr. KLA 80253	A 822936-001
7	Kottas	Kontr. Nr. KLA 80583	A 822936-001
8	Kottas	Kontr. Nr. KLA 80583	A 828136-001
9	Kottas	Kontr. Nr. KLA 80253	A 817279-002
10	Kottas	Kontr. Nr. KLA 80253	A 819065-001
11	Kwizda	Abl. 03/2012	909095

Tabelle 12: Herkunft der untersuchten Drogen

3.2.2 Reagenzien und Chemikalien

Verwendete Chemikalien

- Methanol *R* (Firma VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Wasser *R*
- Diethylether *R* (Firma VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Ethylacetat *R* (Firma VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Ameisensäure *R* (Firma Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland)
- Chloralhydrat *R*

Reagenzien:

- Dichlorchinonchlorimid (DCCC, Firma FLUKA Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
- Ammoniak konzentriert *R* (Firma Gatt Koller GmbH & CoKG, Absam, Österreich)
- Ammoniaklösung, verdünnt *R I* ($41 \text{ g} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$)
- Natriumkarbonat, wasserfreies *R* (Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumhydroxid *R* (Firma Gatt Koller GmbH & CoKG, Absam, Österreich)
- Kaliumhydroxid *R* (Firma Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland)
- Ethanol *R* (96 %) (siehe Tinktura Valerianae aetherea Seite 12)
- ASR (siehe Tinktura Valerianae aetherea Seite 12)
- AlCl_3 (Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Verwendete Reinsubstanzen

- Arbutin 88 % (Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Arbutin p.a. (ChNr.: 1031, Firma PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland)
- Hydrochinon (Firma FLUKA Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
- Gallussäure (Firma Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland)

3.2.3 Methoden

Makroskopische und mikroskopische Identitätsprüfung

- Stereolupe WILD M38/ Heerbrugg Switzerland
ausgestattet mit der Beleuchtung Intralux 4000/ VOLPI
- Mikroskope LABOPHOT-2/ Nikon
OPTIPHOT-2/ Nikon
jeweils ausgestattet mit einer Drawing Tube/ Nikon
- Objektive 2, 4, 10, 20, 40 fach Vergrößerung/ Nikon
- Okular 10 fache Vergrößerung/ Nikon
- Kamera und Steuergerät Digital sight DS-5M und DS-L1/ Nikon
- Bildschirm Brilliance 17A/ Phillips

Die mikroskopische Untersuchung wurde unter Verwendung von Chloralhydrat-Lösung *R* durchgeführt.

Extrakte

Zur Prüfung auf Identität mittels Dünnschichtchromatografie wurden zwei verschiedene Untersuchungslösungen nach unterschiedlichen Extraktionsmethoden aus den verwendeten Proben hergestellt:

Methode 1: lt. Wagner et. al. (1983), Seite 117

5 g gepulverte Droge wurde mittels einer Mischung aus 37,5 ml Methanol und 12,5 ml Wasser bei Siedetemperatur für 30 min unter Rückflusskühlung extrahiert. Nach dem Filtrieren wurde das Filtrat auf etwa 12 ml eingeeengt und mit 50 ml Wasser in einen Scheidetrichter überführt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit jeweils 30 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die Etherphasen waren zu verwerfen. Anschließend wurde dreimal mit jeweils 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt, und die vereinigten Ethylacetat-

phasen zur Trockene gebracht. Der so erhaltene Rückstand wurde letztlich in 10 ml Methanol aufgenommen.

Methode 2: lt. Ph. Eur. 6.0 Monographie „Bärentraubenblätter“

0,5 g gepulverte Droge wurde für 10 min mit 5 ml einer Mischung gleicher Volumsteile Wasser und Methanol unter Rückflusskühlung erhitzt und dann heiß filtriert. Der Kolben und der Filter wurden mit derselben Lösungsmittelmischung gewaschen, bis das Filtrat etwa ein Volumen von 5 ml aufwies.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F254 20 x 20 cm oder
HPTLC Kieselgel 60 F254 10 x 10 cm Fertigplatten (Merck,
Darmstadt, Deutschland)

Mobile Phase: wasserfreie Ameisensäure *R*, Wasser *R*, Ethylacetat *R*
(6:6:88 V/V/V)

Detektion: Die fertig entwickelte und bereits trockene Platte wurde

- mit einer Lösung von Dichlorchinonchlorimid *R* ($10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) in Methanol *R* und danach mit
 - konzentriertem Ammoniak bedampft, lt. Wagner et. al. (1983) Seite 300.
 - einer Lösung von wasserfreiem Natriumkarbonat *R* ($20 \text{ g} / \text{l}$) in einer 0,1 molaren Natriumhydroxid-Lösung besprüht (lt. Ph. Eur. 6.0, Monographie „Bärentraubenblätter“).
 - ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung *R* besprüht. Für diese Lösung werden 12 g Kaliumhydroxid (KOH) in 10 ml Wasser *R* gelöst, und mit Ethanol *R* (96 %) zu 100 ml verdünnt.
 - Ammoniaklösung, verdünnt *R I* ($41 \text{ g} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$) besprüht.
- mit ASR besprüht und anschließend 5 bis 10 min lang bei 100 bis 105 °C erhitzt.
- mit einer Lösung von Aluminiumchlorid in Ethanol (1 %) (siehe Merck Reagenzien, 1980/ Seite 1) besprüht.

Alle Platten wurden mit Kammersättigung (30 min) entwickelt.

Laufstrecke: 15 cm [oder 8 cm]

Auftragen: 20 µl [oder 5 µl] bandförmig

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Das verwendete Gerät setzt sich aus dem in Punkt 2.2.3 (Tabelle 1, Seite 14) beschriebenen Bestandteilen zusammen.

Trennsystem:

Stationäre Phase: Vorsäule: Hypersil Agilent ODS, 5µm, 4x4 mm
 Säule: Hypersil Agilent BDS, 5 µm, l = 0.25 m Ø = 4 mm
 Seriennummer USIN002700

Mobile Phase: Methanol *R*, Wasser *R* (10:90 V/V)

Durchflussrate: 1,2 ml · min⁻¹

Detektion: 280 nm

Injektionsvolumen: 20 µl

Referenz:

1. 0,0508 g Arbutin (Reinheit = 88,70 %) wurden in 50,0 ml der mobilen Phase gelöst.
2. 0,0495 g Arbutin p.a. (Reinheit = 98,79) wurden in 50,0 ml der mobilen Phase gelöst.

Aschebestimmung

- lt. Ph. Eur. 2.4.16

Trocknungsverlust

- lt. Ph. Eur. 2.2.32

3.3 Ergebnisse

Makroskopische Identitätsprüfung

Es wurden alle in der Monographie des ÖAB beschriebenen makroskopischen Merkmale anhand der Proben 1-11 (siehe Tabelle 12, Seite 42) überprüft. Die makroskopische Charakterisierung wurde in folgenden Punkten abgeändert bzw. ergänzt:

1. Der Blattrand ist glatt und nicht, sowie angegeben, schwach gekerbt.
2. Der Hauptnerv ist an der Oberseite stark eingesenkt (siehe Fischer, 1968, Seite 67).
3. Die Nerven treten an der Unterseite deutlich hervor (lt. Hohmann et. al., 2001, Seite 615).

Mikroskopische Identitätsprüfung

Die Überprüfung der in der zu überarbeitenden Monographie des ÖAB enthaltenen mikroskopischen Beschreibung wurde anhand der Proben 1 – 11 (Siehe Tabelle 12: Herkunft der untersuchten Drogen, Seite 42) durchgeführt. Die Punkte, in denen sich die neu verfasste Charakterisierung von der alten unterscheidet, sind folgende unterstrichen markierte Passagen:

Wie in Abbildung 15-18 auf Seite 49 und 50 zu erkennen ist, besteht die Epidermis der Blattoberseite aus schwach welligen, die der Blattunterseite aus stärker wellig-buchtigen Zellen (lt. Moeck, 1994, Seite 1064).

Die Kutikula der Oberseite ist sehr stark entwickelt (siehe Abbildung 23 und 24, Seite 53 und 54). Sie ist etwa so dick wie das Lumen der Epidermiszellen (lt. Fischer, 1968, Seite 67).

Die Spaltöffnungen kommen nur unterseits vor und sind von zwei dazu parallelen Nebenzellen umgeben (lt. Fischer, 1968, Seite 67) (Abbildung 17 und 18, Seite 50).

Ebenfalls unterseits sind vielzellige, keulenförmige Drüsenzotten mit zweizellreihigem Stiel und braunem Inhalt zu sehen (lt. Moeck, 1994, Seite 1064) (siehe Abbildung 19 und 20, Seite 51).

Im Mesophyll sind Ca-Oxalatdrusen zu finden, vor allem in Leitbündelnähe, wo auch Einzelkristalle und selten Kristallzellreihen vorkommen (wie in Abbildung 26 und 27, Seite 55 zu sehen).

Die neu hinzugefügte Charakterisierung der Merkmale der Pulverdroge lieferte folgende Ergebnisse:

1. Das Pulver ist graugrün.
2. Blattbruchstücke mit oberer Epidermis in Aufsicht: geradwandige bis schwach wellige Epidermiszellen mit durchscheinenden Palisadenzellen (Abbildung 15 und 16, Seite 49).
3. Blattbruchstücke mit unterer Epidermis in Aufsicht: wellig-buchtige Epidermiszellen, Spaltöffnungen, Drüsenzotten (meistens nur Bruchstücke) und durchscheinendes Schwammparenchym (Abbildung 17 und 18, Seite 50).
4. Bruchstücke des Blattes im Querschnitt mit dicker Kutikula der oberen Epidermis und darunter 2-3 Reihen Palisadenzellen (Abbildung 23 und 24, Seite 53 und 54).
5. Weiters sind zu sehen: reichlich Fasern, Fragmente des Schwammparenchyms, einzelne stark verdickte, gewarzte Borstenhaare (Abbildung 21 und 22, Seite 52) sowie Ca-Oxalatdrusen und Einzelkristalle (Abbildung 26 und 27, Seite 55).

Die oben beschriebenen Merkmale des Pulvers sind nachzuschlagen bei Hohmann et al. (2001, Seite 616), Fischer (1968, Seite 68) und Moeck (1994, Seite 1064).

Mikroskopische Zeichnungen und Fotos von charakteristischen Merkmalen

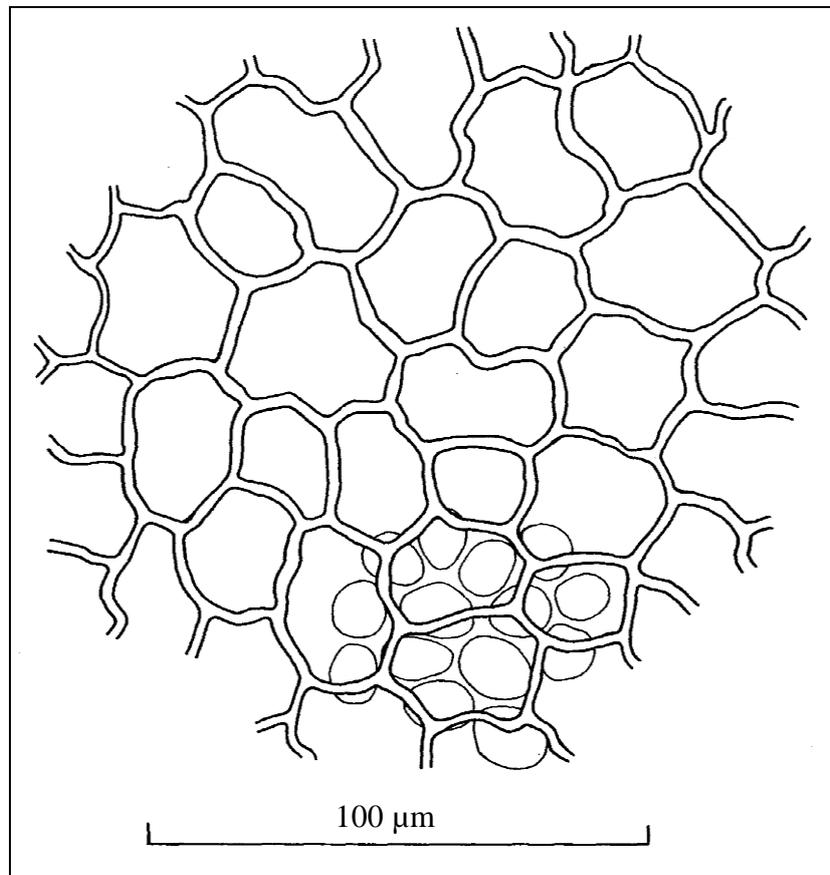


Abbildung 15: Zeichnung einer Aufsicht auf Blattoberseite

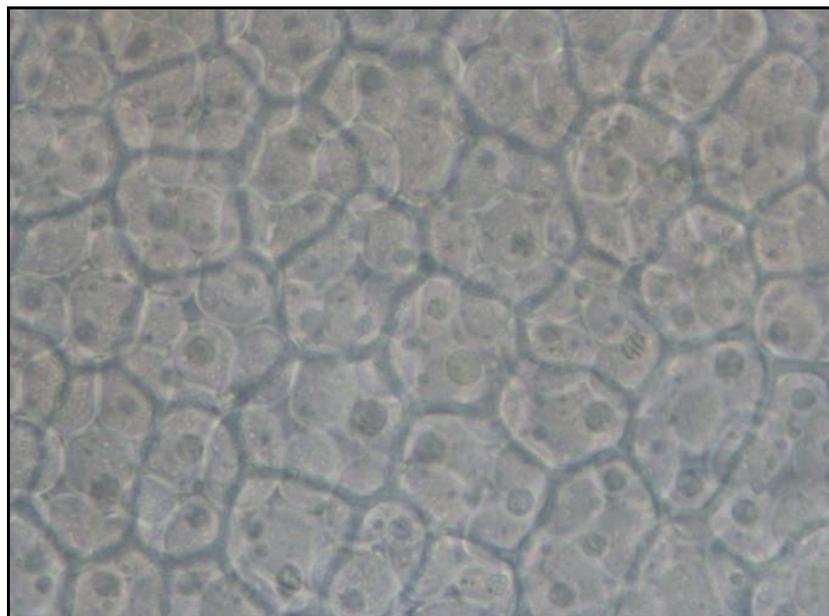


Abbildung 16: Foto einer Aufsicht auf Blattoberseite, 400-fache Vergrößerung

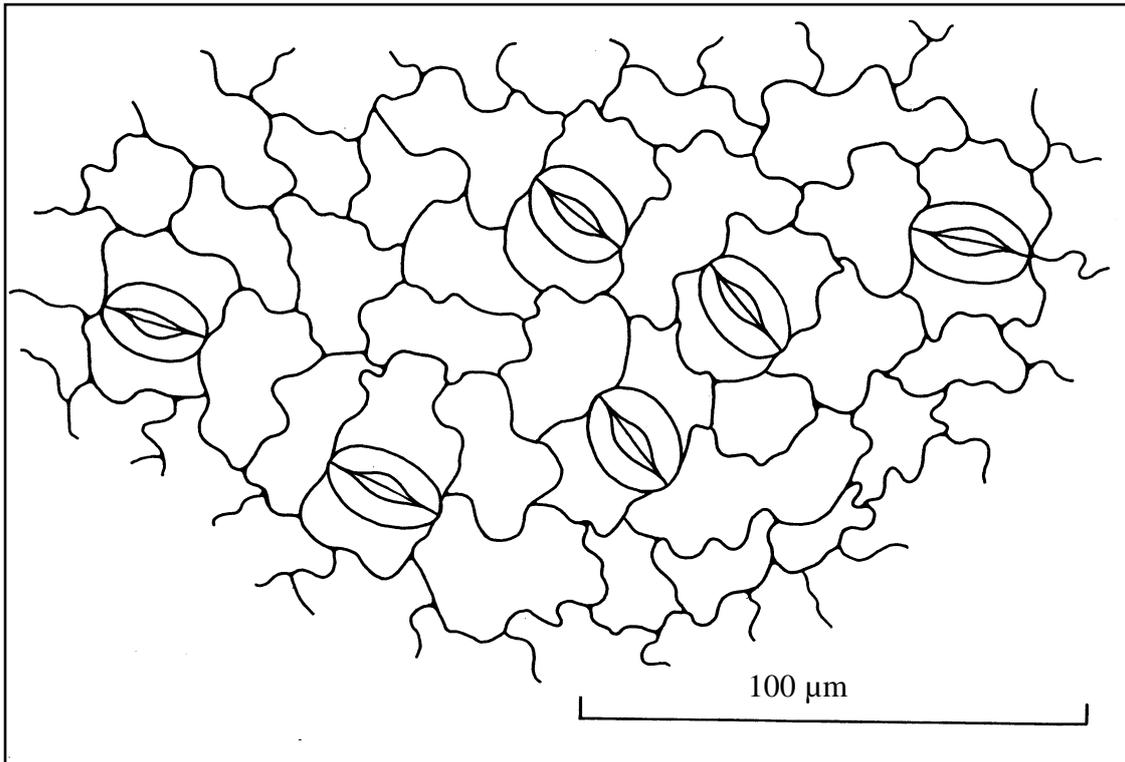


Abbildung 17: Zeichnung einer Aufsicht auf Blattunterseite

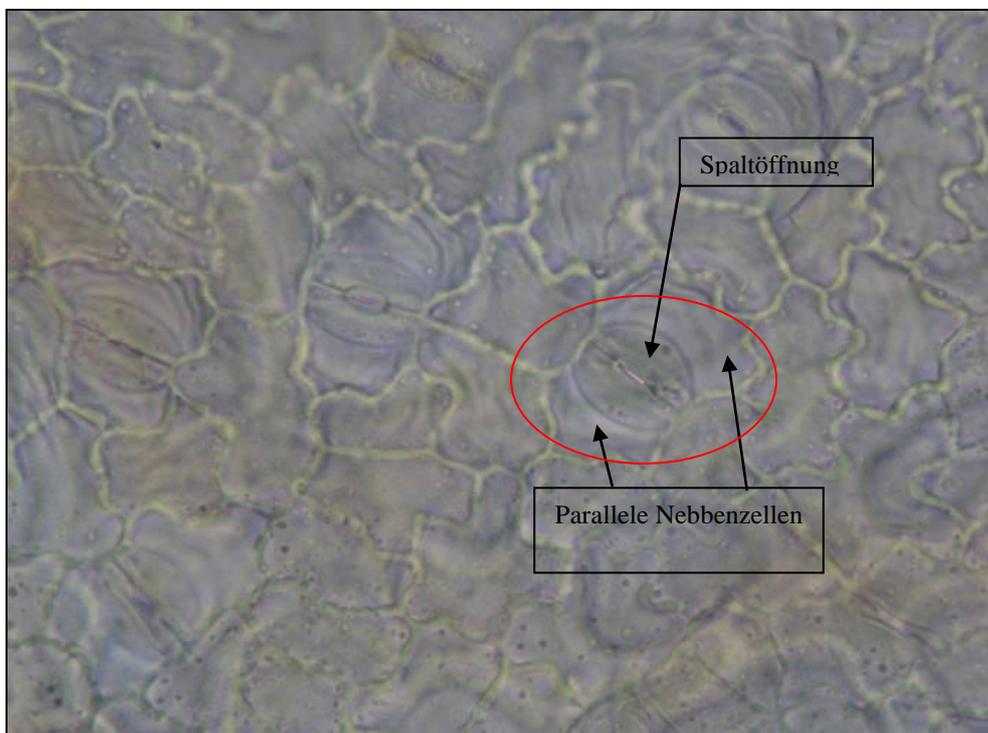


Abbildung 18: Foto einer Aufsicht auf Blattunterseite, 400-fache Vergrößerung

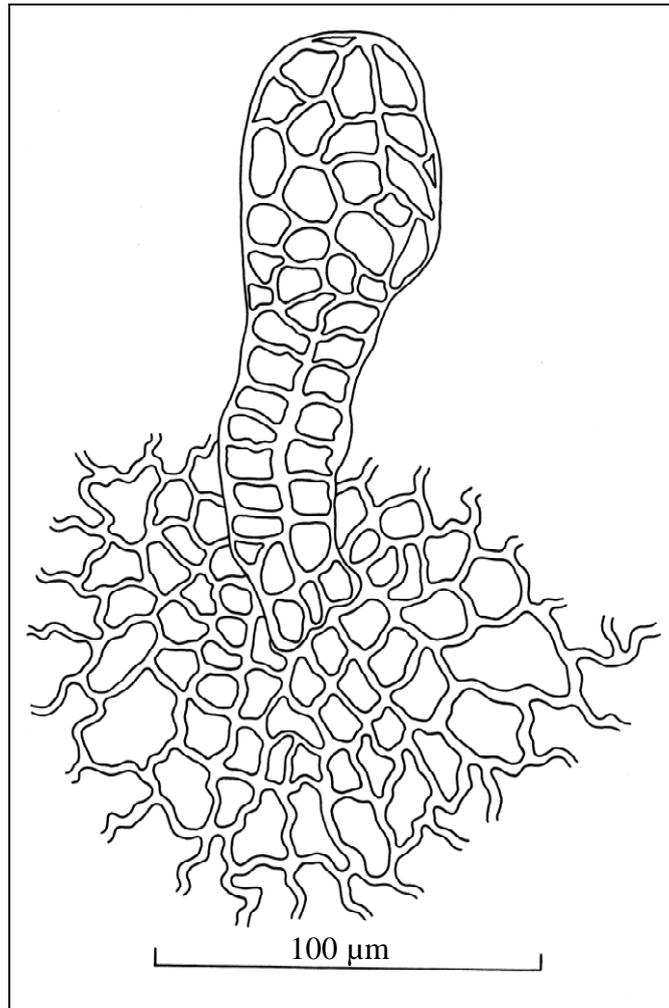


Abbildung 19: Zeichnung einer Drüsenzotte

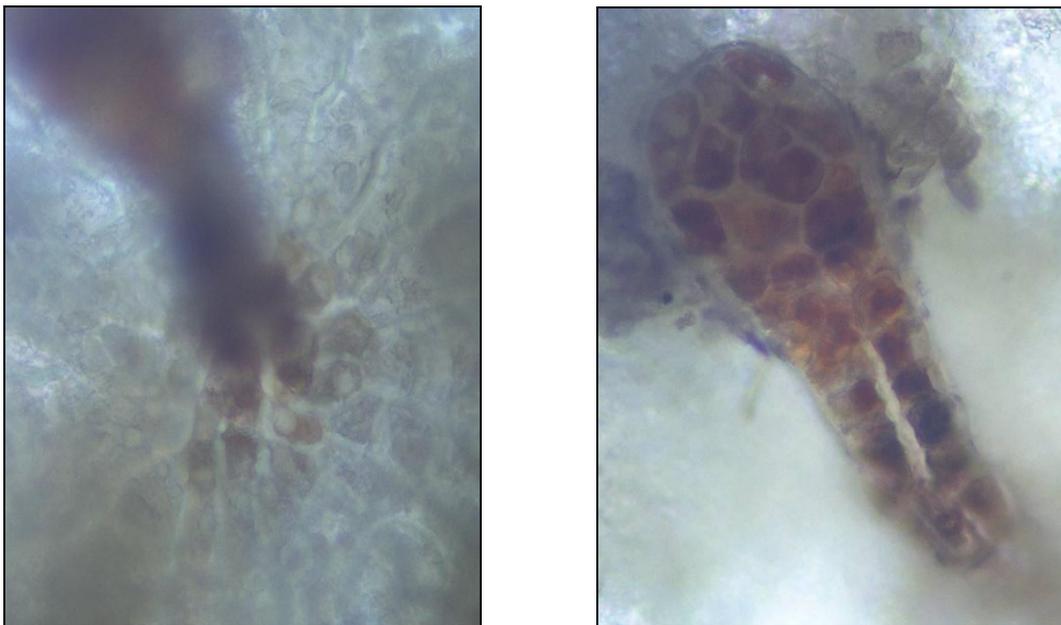


Abbildung 20: Fotos einer Drüsenzotte, 400-fache Vergrößerung

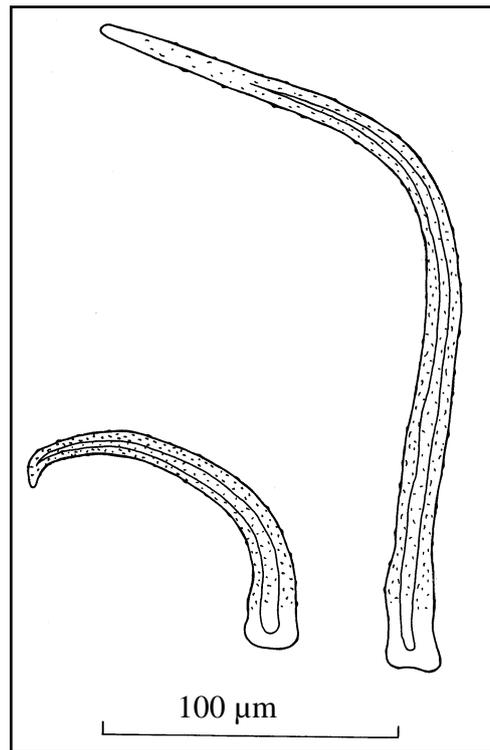


Abbildung 21: Zeichnung von Deckhaaren



Abbildung 22: Fotos von Deckhaaren, 400-fache Vergrößerung

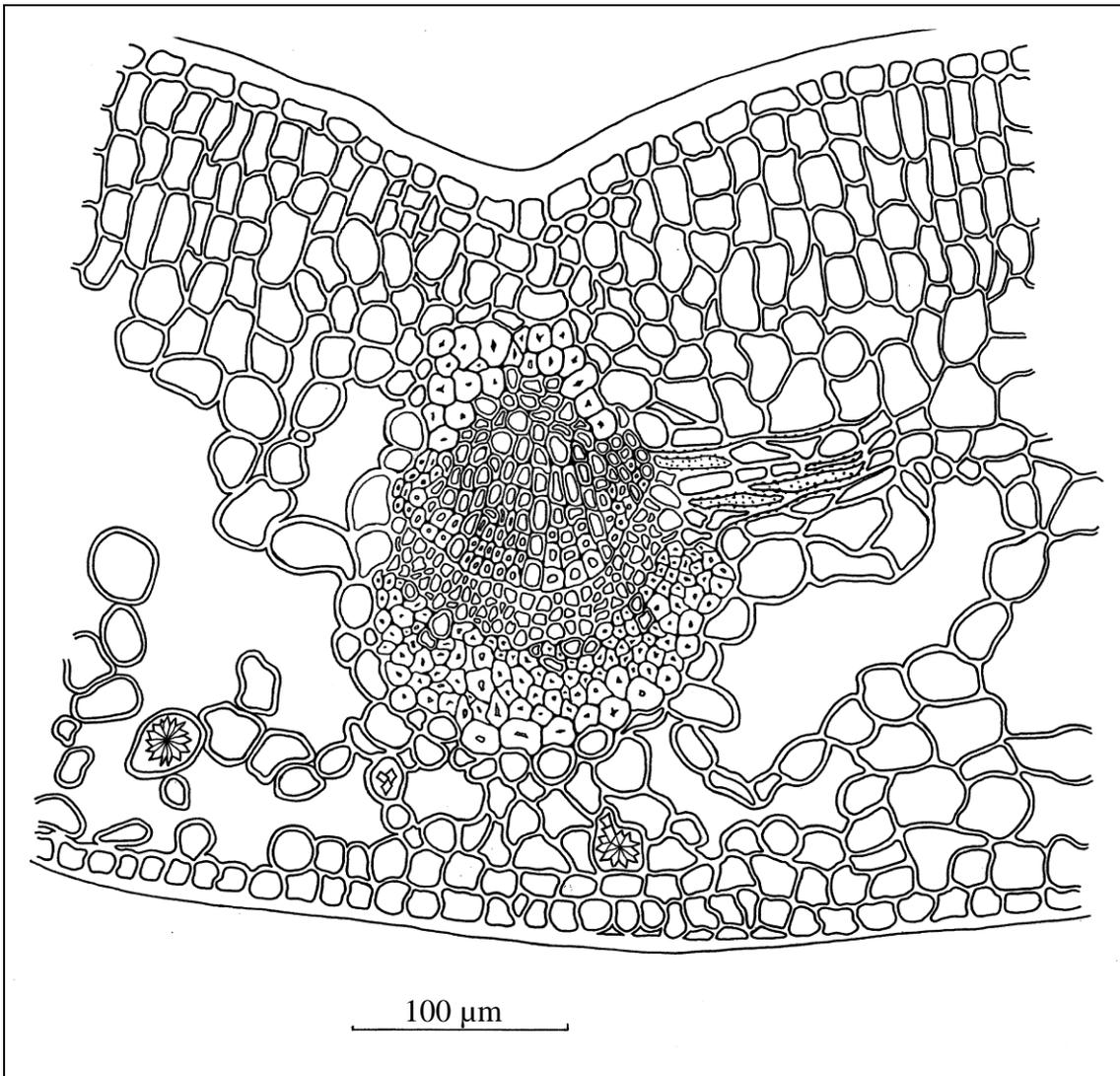


Abbildung 23: Zeichnung eines Blattquerschnitts



Abbildung 24: Foto eines Querschnitts durch ein Blatt, 200-fache Vergrößerung

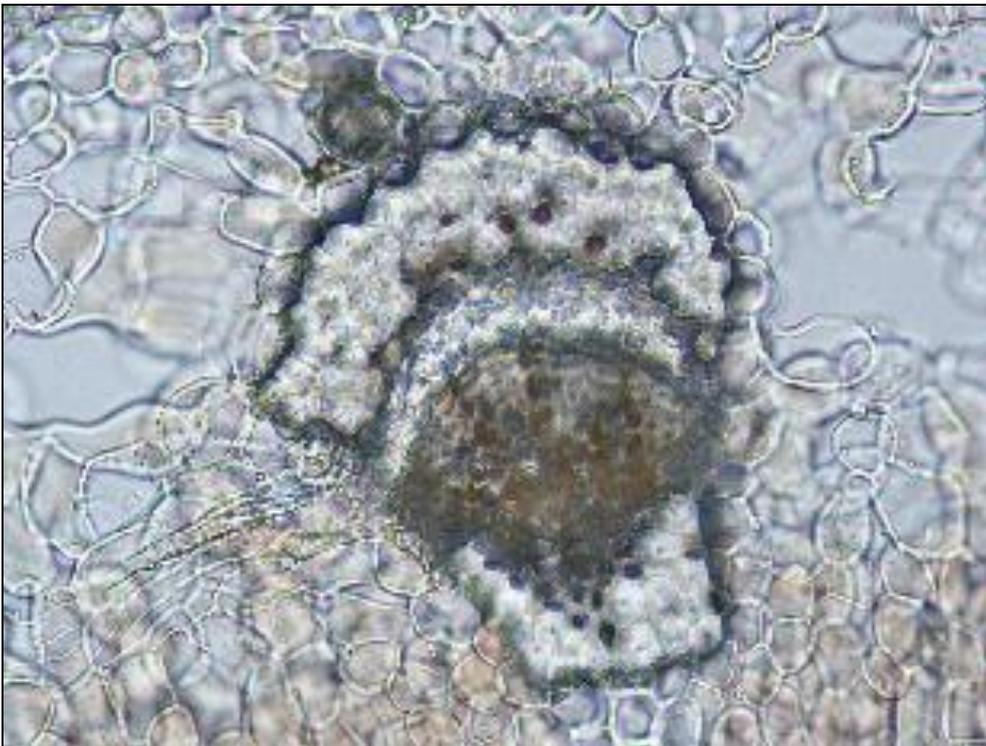


Abbildung 25: Foto eines Querschnitts durch ein Blatt, 200-fache Vergrößerung

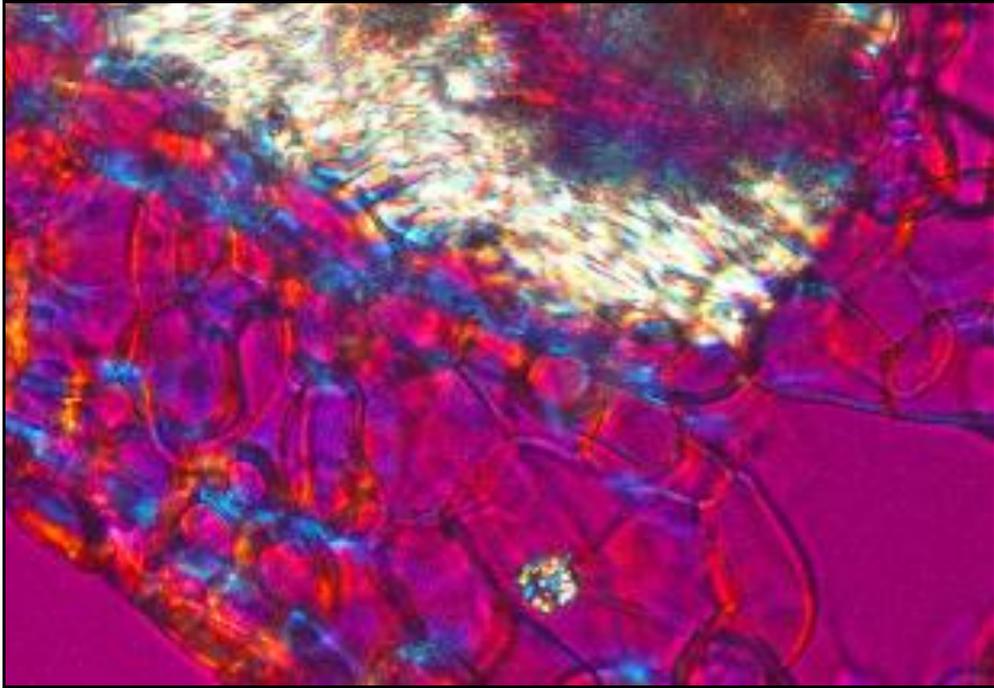


Abbildung 26: Druse in Leitbündelnähe im Querschnitt

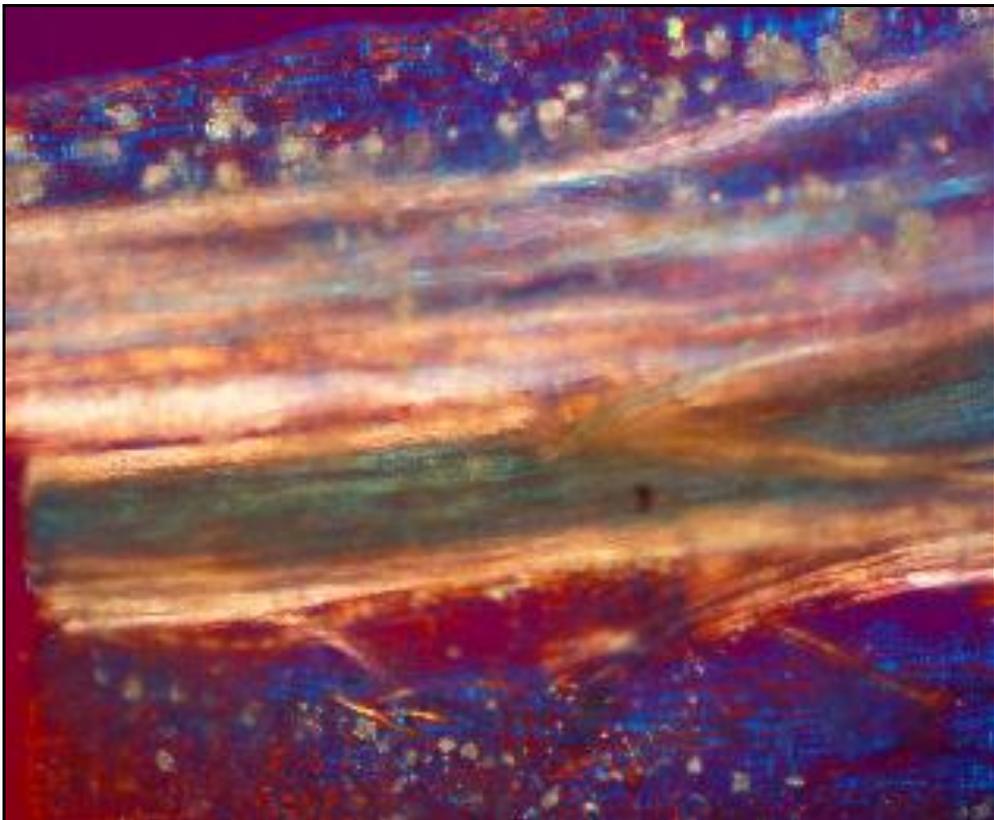


Abbildung 27: Kristalle entlang des Leitbündels im Längsschnitt

Bestimmung des Aschegehaltes

Die Analyse des Aschegehaltes wurde nach der Methode 2.4.16. lt. Ph. Eur. 6.0 durchgeführt, wobei jede Probe doppelt bestimmt wurde. In der folgenden Tabelle sind die Werte der Proben 1-6 zusammengefasst:

Proben Nr.	Einwaage [g]	Asche [g]	Asche [%]	Mittelwert
1a	1,96	0,0596	3,04	3,00
1b	1,93	0,0570	2,95	
2a	1,96	0,0594	3,03	3,05
2b	1,94	0,0595	3,07	
3a	1,95	0,0580	2,98	2,99
3b	1,96	0,0586	2,99	
4a	1,00	0,0328	3,27	3,28
4b	1,05	0,0347	3,29	
5a	1,00	0,0283	2,82	2,80
5b	1,01	0,0280	2,78	
6a	1,01	0,0271	2,67	2,66
6b	1,00	0,0265	2,65	

Tabelle 13: ermittelte Werte des Aschegehaltes der Proben 1-6

Zusätzlich wurden dankenswerterweise Daten aus Analysen verschiedener Chargen aus den Jahren 2002 bis 2009 der Firma Kwizda, Mayrhofer Galenik (Bannerstraße 10, 4060 Leonding, Österreich) als Vergleichswerte zur Verfügung gestellt.

Jahr der Charge	Asche [%]
2002	2,4
2003	3,3
2004	2,6
2006	3,0
2007	2,8
2009	3,2

Tabelle 14: Werte des Aschegehaltes von Stichproben aus verschiedenen Chargen der Fa. Kwizda

Wie in der obenstehenden Tabelle (Tabelle 14, Seite 56) ersichtlich ist, liegen die angegebenen Werte zwischen 2,4 und 3,3 %. Wir schlagen daher vor, den maximalen Aschegehalt von 4,0 % lt. Monographie des ÖAB beizubehalten.

Dünnschichtchromatographische Identitätsprüfung zu *Vitis-idaea* folium

Zur Identifizierung der Preiselbeerblätter wurde das DC-System der Monographie „Bärentraubenblätter“ nach Ph. Eur. 6.0 herangezogen und etwas modifiziert.

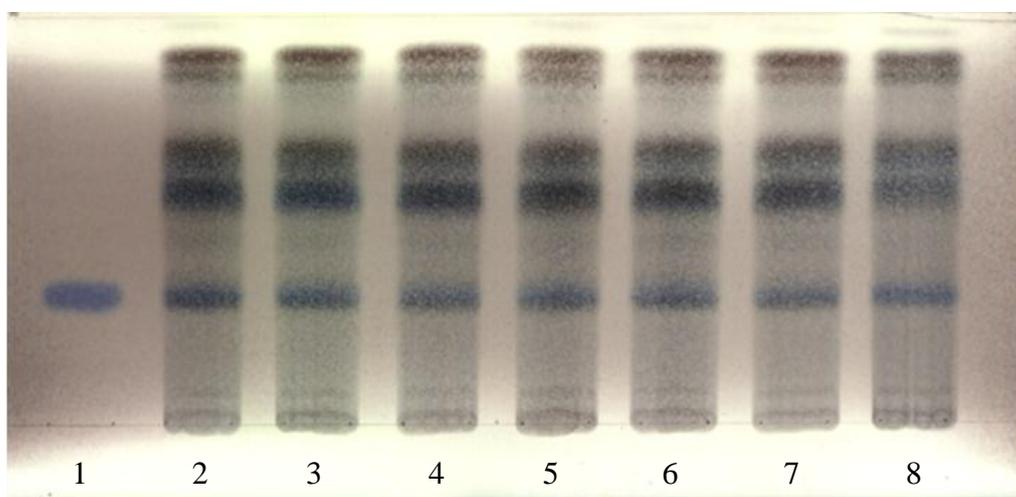


Abbildung 28: Überprüfung von ausgewählten *Vitis-idaea* Proben- Extrakte lt. Wagner et. al. (1983) Seite 118, Kieselgel 60 F254 20x10cm, Fließmittel: EtOAc + HCOOH + H₂O (88 + 6 + 6), Detektion: DCCC/ Dämpfe von konzentriertem Ammoniak, vis, Bahn 1: Arbutin (2.5 mg/ml), Bahn 2-8: Proben 1-7, jeweils 10 µl

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, liefert das in der Monographie „Bärentraubenblätter“ verwendete Fließmittelsystem gute Ergebnisse. Der Vergleich von zufällig ausgewählten *Vitis-idaea* Proben zeigte, dass die DC-Fingerprints durchwegs homogen sind. Im Weiteren wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden (siehe Kapitel 3.2.3 Methoden, Seite 44 und 45) und unterschiedliche Auftragemengen miteinander verglichen (Abbildung 29, Seite 58).

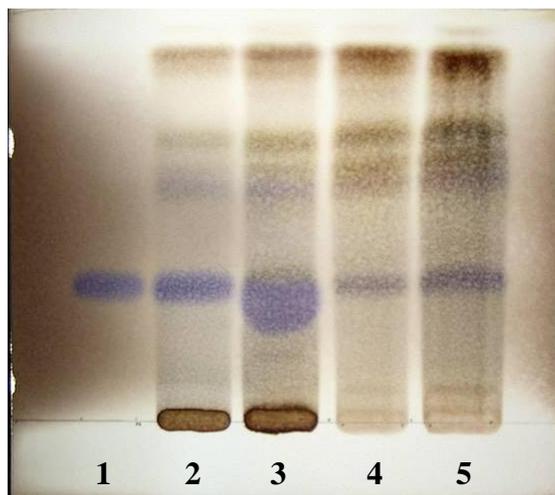


Abbildung 29: Vergleich zweier Extrakte von Probe 1, welche mit verschiedenen Methoden hergestellt wurden- Kieselgel 60 F254 10x10cm, Fließmittel: EtOAc + HCOOH + H₂O (88 + 6 + 6), Detektion: DCCC/ Dämpfe von konzentriertem Ammoniak, vis, Methode 1: lt. Wagner et. al. (1983) Seite 117, Methode 2: lt. Ph. Eur. Monographie „Bärentraubenblätter“ (Methode 1 und 2 siehe auch Kapitel 3.2.3, Seite 44 und 45), Bahn 1: Arbutin (2.5 mg/ml), 10 µl/ Bahn 2: Probe 1, Methode 2, 10 µl/ Bahn 3: Probe 1, Methode 2, 20 µl/ Bahn 4: Probe 1, Methode 1, 10 µl/ Bahn 5: Probe 1, Methode 1, 20 µl

Die Extraktion von phenolischen Inhaltsstoffen lt. Wagner et al. (1983) ist zeitaufwändiger, führt aber nicht zu einem besseren Ergebnis. Alle Banden der Extrakte nach Methode 1 sind auch bei den nach Methode 2 hergestellten Extrakten zu sehen. Es ist nicht notwendig, unerwünschte Begleitstoffe abzutrennen (Methode 1), da diese mit dem verwendeten Fließmittelsystem am Start verbleiben. Deswegen wird die Extraktionsmethode 2 (Ph. Eur.: Monographie *Uvae ursi folium*) empfohlen. Ebenfalls ersichtlich ist, dass eine Auftragemenge von 10 µl (Bahn 2) ausreicht.

Da schon zu Beginn der DC-Untersuchungen festgestellt wurde, dass das in der Monographie „Bärentraubenblatt“ angegebene Sprühreagenz aufgrund des hohen Wassergehalts nicht so einfach zu handhaben ist, wurde versucht, ein anderes Detektionsmittel zu entwickeln. Prinzipiell lässt sich für die Detektion das Universalreagens Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (ASR) verwenden: die Platte wird mit ASR besprüht und dann für 5 - 10 min im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet. Die grüne Zone des Arbutins ($R_{f_{Arb}}: \sim 0,23$) und die hellbraune Zone des Hydrochinons sind sowohl im sichtbaren Licht als auch unter UV₃₆₆ gut erkennbar. Jedoch ist Gallussäure ($R_{f_{Gal}}: \sim 0,77$), die dritte in der Monografie *Folium uvae-ursi* eingesetzte Referenzsubstanz nur unter UV₃₆₆ gut sichtbar (siehe Abbildung 30, Seite 59).

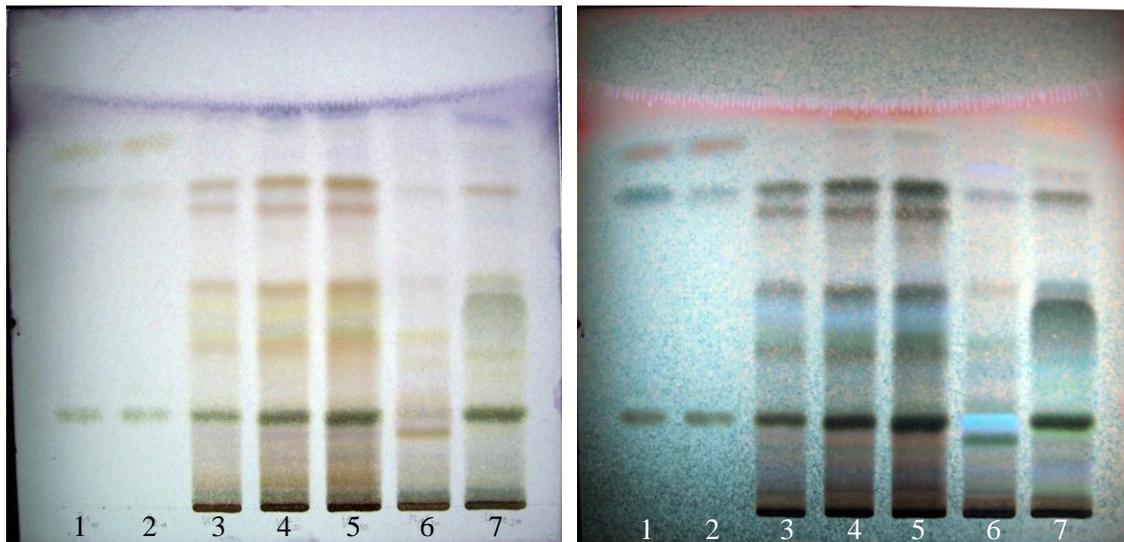


Abbildung 30: Vergleich von *Vitis-idaea* folium mit *Myrtilli folium* und *Uvae ursi folium*, Kieselgel 60 F254 20x20 cm, Detektion: Anisaldehyd/H₂SO₄, vis (links), UV366 (rechts), Fließmittel: EtOAc + HCOOH + H₂O (88 + 6 + 6), Bahn 1: Arbutin, Hydrochinon, Gallussäure jeweils 2,5 mg/ml, 10 µl aufgetragen, Bahn 2: Arbutin, Hydrochinon jeweils 2,5 mg/ml, Gallussäure 1mg/ml, 10 µl aufgetragen, Bahn 3- 5: Preiselbeerblatt Probe 1, von links nach rechts 10 µl, 20 µl, 30 µl aufgetragen, Bahn 6: Heidelbeerblatt, 20 µl aufgetragen, Bahn 7: Bärentraubenblatt, 20 µl aufgetragen.

Die folgende, bei Wichtl und Czygan (2002) angegebene Detektionsmethode mit Aluminiumchlorid für phenolische Inhaltsstoffe eignet sich zwar, um *Vitis-idaea* folium als Verfälschung in *Uvae ursi folium* zu identifizieren, jedoch nicht umgekehrt, da *Uvae ursi folium* keine charakteristischen zusätzlichen Banden aufweist (siehe Abbildung 31, Seite 60). Zudem können Hydrochinon und Arbutin in der hier verwendeten Konzentration von 2,5 mg/ml kaum detektiert werden.

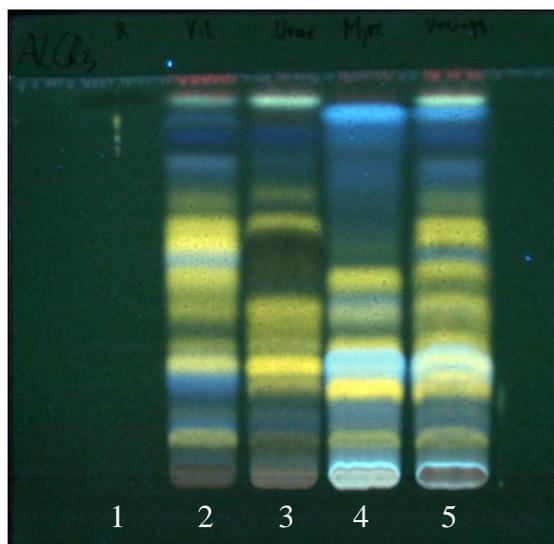


Abbildung 31: Nachweis von Verfälschungen von *Uvae ursi folium* mit *Vitis-idaea folium*- lt. Wichtl und Czygan(2002), Seite 629, Kieselgel 60 F254 10x10cm, Fließmittel: EtOAc + HCOOH + H₂O (88 + 6 + 6), Detektion: Aluminiumchlorid in Ethanol (1%) / UV 366nm, Aufgetragen: jeweils 10 µl, Bahn 1: Arbutin, Hydrochinon- jeweils 2,5 mg/ml, Bahn 2: Preiselbeerblatt Probe 1, Bahn 3: Bärentraubenblatt, Bahn 4: Heidelbeerblatt, Bahn 5: Preiselbeerblatt Probe 1 + Bärentraubenblatt + Heidelbeerblatt.

Schlussendlich wurde die in der Monographie *Uvae-ursi folium* angegeben Detektionsmethode mittels DCCC bezüglich des 2. Detektionsmittels - genauer gesagt des alkalischen Reagenzes - hin variiert (siehe Kapitel 3.2.3 Methoden, Seite 45). Die Verwendung von Ammoniaklösung, verdünnt *R 1* ist der in der Monographie für *Uvae ursi folium* verwendeten Natriumkarbonat-Lösung vorzuziehen. Der höhere pH-Wert des Sprühreagens ermöglicht ein weniger intensives Besprühen. Dadurch wird ein Verrinnen der Zonen durch die wässrige Lösung verhindert. Dieses Verfahren konnte sowohl auf normalen Kieselgel 60 20x20 cm Platten (Abbildung 32, Seite 61) als auch auf HPTLC 10x10 cm Platten (hier nicht gezeigt) erfolgreich angewandt werden. Wie in erwähnter Abbildung ersichtlich, sind die Zonen der Referenzsubstanzen in der verwendeten Konzentration (2,5 mg/ml) gut erkennbar (im Vergleich zu AlCl₃ als Detektionsmittel). Auch kann hier die Gallussäure, im Vergleich zur Detektion mittels ASR, im sichtbaren Licht erkennbar gemacht werden.

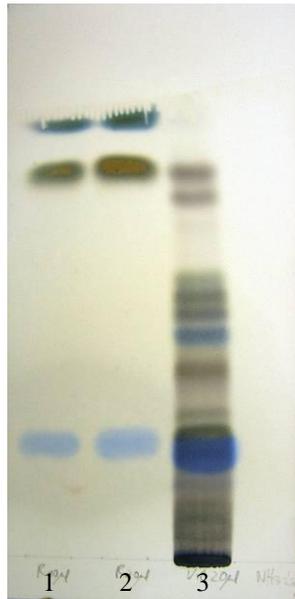


Abbildung 32: DC-System für die neu überarbeitete Monographie, DC Kieselgel 60 F254 20x20cm, Detektion: DCCC/ Ammoniak-Lösung verdünnt R1- vis, Fließmittel: EtOAc + HCOOH + H₂O (88 + 6 + 6), Zone 1: Arbutin, Gallussäure, Hydrochinon jeweils 2,5 mg/ml, 10 µl aufgetragen, Zone 2: Arbutin, Gallussäure, Hydrochinon jeweils 2,5mg/ml, 20 µl aufgetragen, Zone 3: Probe 1, 20µl aufgetragen

Wie in den obigen Abbildungen ersichtlich, ist das Fließmittelsystem aus der Monographie *Uvae ursi folium* auch für die Identitätsprüfung von *Vitis-idaeae folium* verwendbar. Die durch Besprühen mit DCCC/NH₃ entstehende hell- bis dunkelblaue Zone des Arbutins als auch die dunkelblaue Zone des Hydrochinons und die braune Zone der Gallussäure sind klar erkennbar.

Gehaltsbestimmung mittels HPLC

Die quantitative Bestimmung des Arbutingehaltes wurde nach der Methode Flüssigchromatographie 2.2.29 der Monographie *Uvae ursi folium* (It Ph. Eur. 6.0) durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.3, Seite 46). Der Gehalt an Arbutin in Prozent wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 100 \cdot p}{A_2 \cdot m_1}$$

A_1 = Fläche des Arbutin-Peaks im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_2 = Fläche des Arbutin-Peaks im Chromatogramm der Referenzlösung

m_1 = Einwaage der Droge in Gramm

m_2 = Einwaage des Arbutins in der Referenzlösung in Gramm

p = Reinheit der Referenzsubstanz in Prozent (siehe Kapitel 3.2.3, Seite 46)

In den nachstehenden Tabellen 15 und 16 (Seite 62 und 63) sind die jeweiligen Einwaagen der Proben und der Referenzsubstanz sowie die erhaltenen Flächen der Peaks und die daraus resultierenden Prozentgehalte an Arbutin aufgelistet:

Proben	Einwaage [g]	AUC	% Arbutin
Referenz	0,0508	6078236	
Probe 1	0,8051	4868508	4,48
Probe 2	0,8073	4442152	4,08
Probe 3	0,8089	3269549	3,00
Probe 4	0,8127	3845282	3,51
Probe 5	0,8046	3899743	3,59
Probe 6	0,8068	4054542	3,73
Probe 7	0,8085	6571546	6,02

Tabelle 15: Gehaltsbestimmung von Arbutin mittels HPLC mit Referenzlösung Nr.1 (siehe Kapitel 3.2.3, Seite 46)– Werte der Einwaagen, AUCs und berechnete Ergebnisse der Vitis-idaea Proben 1-7

Proben	Einwaage [g]	AUC	% Arbutin
Referenz	0,0495	6701382	
Probe 8	0,8032	6320342	5,74
Probe 9	0,8133	3625089	3,25
Probe 10	0,8033	3992626	3,63
Probe 11	0,8086	4581064	4,13

Tabelle 16: Gehaltsbestimmung von Arbutin mittels HPLC mit Referenzlösung Nr.2 (siehe Kapitel 3.2.3, Seite 46)– Werte der Einwaagen, AUCs und berechnete Ergebnisse der Vitis-idaea Proben 8-11

Der Arbutingehalt der untersuchten Proben bewegt sich zwischen 3,0 und 6,0 % (siehe Tabelle 15 und 16, Seite 62 und 63). Angaben in der Literatur (Moeck, 1994 und Hohmann et. al., 2001) zeigen Werte von 3,3 – 5,4 %. Es wird daher ein Mindestgehalt von 3,0 % Arbutin vorgeschlagen. Wie in den folgenden Abbildungen (Abbildung 33 und 34, Seite 63 und 64) zu sehen ist, ergibt sich für Arbutin unter den im Kapitel 3.2.3 Methoden (Seite 46) festgelegten Bedingungen eine Retentionszeit von ca. 2,9 min.

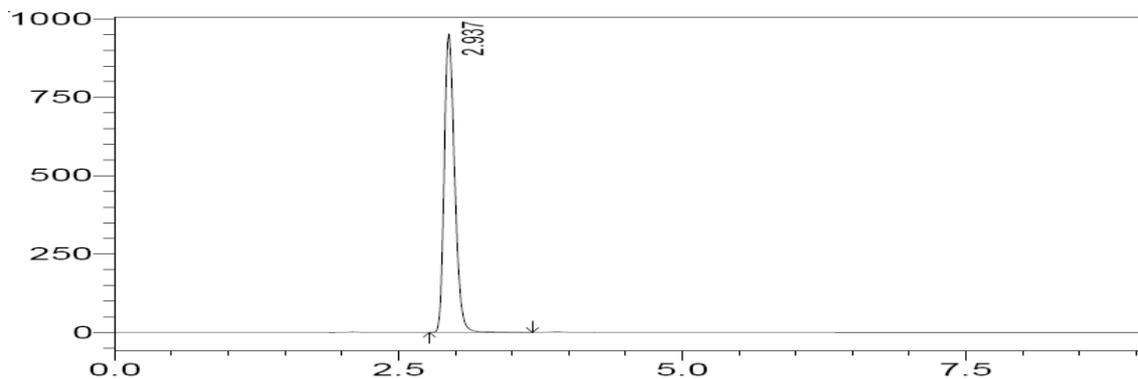


Abbildung 33: HPLC von Arbutin, Retentionszeit: 2,93 min, Bedingungen siehe Kapitel 3.2.3 Seite 46

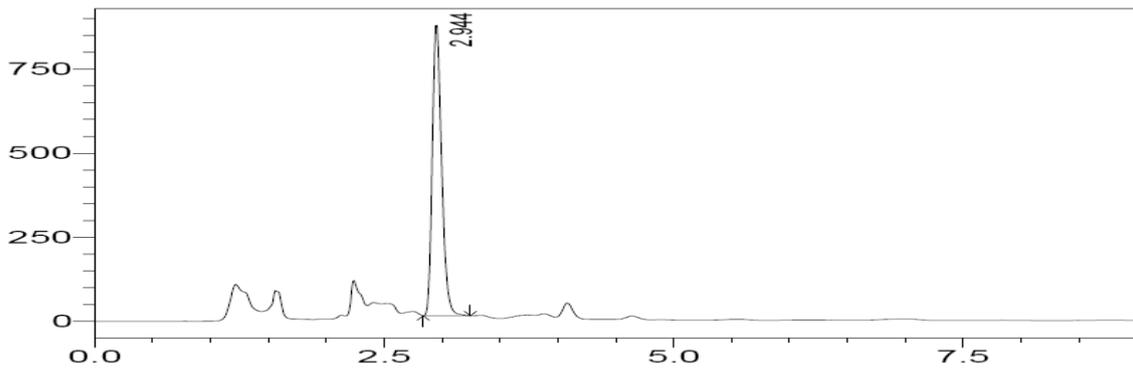


Abbildung 34: HPLC von Probe 1, Retentionszeit: 2,94 min, Bedingungen siehe Kapitel 3.2.3 Seite 46

Trocknungsverlust

Der Trocknungsverlust wurde nach der Methode der Ph. Eur. 6.0 (2.2.32.) durchgeführt, wobei jede Probe doppelt bestimmt wurde. Die daraus berechneten Mittelwerte sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Proben	Einwaage [g]	Auswaage [g]	Trocknungsverlust		Mittelwert
			in Gramm	in Prozent	
Probe 1a	1,0019	0,9415	0,0604	6,03	6,13
Probe 1b	1,0065	0,9438	0,0627	6,23	
Probe 2a	1,0089	0,9397	0,0692	(6,86)	6,22
Probe2b	1,0012	0,9389	0,0623	6,22	
Probe 3a	1,0022	0,9415	0,0607	6,06	6,06
Probe 3b	1,0122	0,9432	0,0690	(6,82)	
Probe 4a	1,0040	0,9456	0,0584	5,82	5,89
Probe 4b	1,0277	0,9665	0,0612	5,96	
Probe 5a	1,0155	0,9552	0,0603	5,94	5,93
Probe 5b	1,0049	0,9454	0,0595	5,92	

Tabelle 17: Einwaagen und Ergebnisse der Bestimmung des Trocknungsverlusts lt. Ph. Eur. 6.0 (2.2.32.), Doppelbestimmung, Angabe der Mittelwerte

Aufgrund der in der obenstehenden Tabelle aufgelisteten Werte wird ein Trocknungsverlust von maximal 7,0 % vorgeschlagen.

3.4 Diskussion

Die allgemeine Vorgehensweise bei der Überarbeitung von veralteten ÖAB-Monographien wurde ja bereits im ersten Teil (etherische Baldriantinktur) dieser Arbeit ersichtlich. Die erarbeiteten Änderungen werden auch hier am besten durch Vergleichen der ÖAB-Originalmonographie (Abbildung 35, Seite 68 und 69) mit der neuen Version (Kapitel 3.5, Seite 70-76) veranschaulicht.

Allen neu überarbeiteten ÖAB-Monographien von Teedrogen sollen schematische Zeichnungen der im Text beschriebenen mikroskopischen Merkmale hinzugefügt werden. Dies ist eine wesentliche Verbesserung gegenüber den ursprünglichen Monographien, da es das Identifizieren von unbekanntem Drogenmaterial sicherlich erleichtert.

Die Beschreibung makroskopischer und mikroskopischer Merkmale ist jetzt Teil der Prüfung auf Identität und wurde um eine Charakterisierung der im Pulver zu findenden Merkmale erweitert. Dabei wurden die in der Literatur vorkommenden Beschreibungen miteinander verglichen und die wichtigsten Charakteristika zusammengefasst (siehe Hohmann et. al. (2001), Fischer (1968) und Moeck (1994)). Diese mussten dann graphisch ausgearbeitet werden. Alle in der ÖAB-Originalmonographie beschriebenen Merkmale wurden überprüft. Dabei wurde ein Detail der makroskopischen Charakterisierung abgeändert, da es in keiner der untersuchten Proben gefunden werden konnte, und zwar ist der Blattrand von *Vitis-idaeae folium* als glatt und nicht, sowie angegeben, als schwach gekerbt zu beschreiben. Da in der Literatur der Blattrand des öfteren als schwach eingekerbt (Moeck, 1994), oder als fein gesägt-gekerbt (Hohmann et al., 2001) beschrieben wird, ist anhand weiterem Untersuchungsmaterial zu prüfen, ob eventuell verschiedene Subspecies existieren, welche sich in diesem Merkmal unterscheiden. Des Weiteren wurde folgendes Merkmal zur makroskopischen Identifizierung hinzugefügt: Die Nerven treten an der Unterseite deutlich hervor (Hohmann et. al., 2001).

Wichtige Änderungen haben sich auch in der Beschreibung der mikroskopischen Merkmale ergeben. Die in der Originalmonographie beschriebenen Zellreihen mit Einzelkristallen in der Nähe der Gefäßbündel konnten in den Proben nur sehr selten identifiziert werden. Viel öfter wurden Drusen beobachtet, etwas weniger häufig traten

Einzelkristalle auf. Ebenfalls wurde eine Charakterisierung des Stomatatyps hinzugefügt, und die Beschreibung der Kutikula und der Drüsenzotten erweitert.

Die in der Originalmonographie im Punkt „Prüfung auf Identität“ angeführten nasschemischen Nachweise des Arbutins und der Gerbstoffe wurden durch die Prüfung mittels DC ersetzt. In der Monographie „Bärentraubenblätter“ der Ph. Eur. 6.0 existiert bereits eine DC- Vorschrift, mit welcher die Anwesenheit von Arbutin kontrolliert wird. Es wurde sichergestellt, dass sich diese Vorschrift auch für die Monographie „Preiselbeerblätter“ eignet. Die in der Monographie „Bärentraubenblätter“ in der Ph. Eur. verwendete Extraktionsmethode wurde mit der Extraktion phenolischer Inhaltsstoffe lt. Wagner et al. (1983) verglichen. Diese Methode ist sehr viel zeitaufwändiger, da unerwünschte Begleitstoffe abgetrennt werden. Da diese bei dem verwendeten Fließmittelsystem ohnehin am Start verbleiben, kann der Nachteil des erhöhten Zeitaufwands nicht durch eine bessere Trennung gerechtfertigt werden. Ebenfalls wurden einige verschiedene Sprühreagenzien miteinander verglichen. Dies führte dann zu einer leichten Modifikation der ursprünglichen in der Ph. Eur. angegebenen Vorschrift. Die darin verwendete wässrige Natriumkarbonatlösung als basisches Sprühreagens führt zum Verrinnen der Banden, wenn sie in zu großen Mengen aufgetragen wird. Aufgrund der geringen Basizität dieser Lösung sind jedoch relativ große Volumina an Sprühreagens nötig. Experimente ergaben, dass sich zur Detektion der Banden statt dem in der Ph. Eur. verwendeten Dichlorchinonchlorimid (DCCC) /NaCO₃-Reagens prinzipiell auch Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagens (ASR) eignet. Damit wurden sogar mehr Banden sichtbar, aber die Referenzsubstanz Gallussäure kann im sichtbaren Licht kaum nachgewiesen werden. Deswegen wurde für weitere Untersuchungen wieder DCCC verwendet. Statt des NaCO₃-Sprühreagens wurde versuchsweise mit konzentriertem Ammoniak bedampft (Wagner et. al., 1983). Damit wurde zwar eine gute, jedoch in ihrer Intensität relativ unregelmäßige Färbung erzielt. Da sich flüssige Lösungen gleichmäßiger auf die Platte verteilen lassen, wurde die im Reagenzienverzeichnis der Ph. Eur. gelistete Ammoniaklösung, verdünnt *R1* verwendet. Diese ist leichter handhabbar als konzentrierter Ammoniak, jedoch deutlich basischer als die NaCO₃ Lösung und daher für die Detektion der Zonen sehr gut geeignet. Zum Vergleich von anderen arbutinhaltigen Drogen wurden Extrakte von *Vitis-idaeae folium*, *Uvae ursi folium* und *Myrtilli folium* nebeneinander mit dem aus der Ph. Eur. übernommenem System entwickelt und mit Aluminiumchlorid Reagens als auch mit ASR besprüht. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich in beiden Fällen die

Drogen eindeutig voneinander unterscheiden lassen. Ist *Vitis-idaea* folium jedoch mit einer der anderen zwei Ericaceae-Drogen verfälscht bzw. vermischt, kann dies nicht nachgewiesen werden.

Der Punkt Prüfung auf Reinheit wurde um die Bestimmung des Trocknungsverlustes erweitert. Der dafür gültige Grenzwert wurde in Anlehnung an die im Ergebnisteil zusammengefassten experimentell ermittelten Werte festgelegt.

Die bisher mittels Rotationspolarimetrie durchgeführte Gehaltsbestimmung von Arbutin wurde durch eine Quantifizierung mittels HPLC ersetzt. Hierfür konnte die in der Monographie „Bärentraubenblätter“ enthaltene Prüfvorschrift unverändert übernommen werden. Der festgelegte Mindestgehalt resultiert auch hier aus den experimentellen Daten.

Folium Vitis-idaeae

Preiselbeerblatt

Synonym: Vitis-idaeae Folium.

Das getrocknete Laubblatt von *Vaccinium vitis-idaea* L.

Gehalt an Glykosiden, berechnet als Arbutin ($C_{12}H_{16}O_7$, M_r 272,3), mindestens 3,0%.

Beschreibung

Preiselbeerblätter sind geruchlos und schmecken zusammenziehend und etwas bitter.

Die bis 2 cm langen und bis 1 cm breiten Blätter sind kurzgestielt, oval oder verkehrt eiförmig, am Rand schwach gekerbt und etwas umgebogen. Die ziemlich dicke, lederige Blattspreite ist oberseits dunkelgrün, glänzend, unterseits heller grün und deutlich braun punktiert. Die Nervatur ist fein netzadrig.

Mikroskopische Merkmale: Die Epidermis der Blattoberseite besteht aus schwach welligen, die der Blattunterseite aus stärker welligen Zellen, die eine sehr stark entwickelte, glatte Kutikula besitzen. Spaltöffnungen kommen nur unterseits vor. Im Mesophyll finden sich 2 – 3 Reihen ungleich großer Palisadenzellen, ferner ein lockeres Schwammparenchym und in der Nähe der Gefäßbündel Zellreihen mit Einzelkristallen aus Kalziumoxalat. Über den Nerven sieht man einzelne, stark verdickte, gewarzte Borstenhaare und vielzellige, keulenförmige Drüsenhaare mit braunen Inhaltsstoffen.

Prüfung auf Identität

1. *Nachweis des Arbutins und der Gerbstoffe:* Kocht man etwa 0,1 g zerkleinerte Preiselbeerblätter mit 5 ml Wasser 1 Minute lang, so färbt sich das Filtrat auf Zusatz von 1 Tropfen Eisen-III-chloridlösung (R) sofort blaugrün; nach einiger Zeit tritt ein Niederschlag auf.
2. *Nachweis des Arbutins:* Die mit verdünnter Salzsäure (R) befeuchteten gepulverten Preiselbeerblätter liefern bei der Mikrosublimation (ÖAB.: XII, 1, d) bei etwa 150° nadelförmige Kristalle von Hydrochinon. Schmelzintervall (unter dem Mikroskop): 169 – 171° (ÖAB.: XI, 2, a).

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (Ph. Eur. V.4.2): Höchstens 3%.

Asche (ÖAB.: IX, 2, b, θ): Höchstens 4,0%.

Gehaltsbestimmung

5,00 g fein gepulverte (VI), 1 Stunde lang bei 90° getrocknete Preiselbeerblätter werden in einen Soxhletapparat mit entwässertem Azeton (R) so lange extrahiert, bis die überlaufende Flüssigkeit nicht mehr gefärbt ist (etwa 3 Stunden). Nach beendeter Extraktion dampft man die Azetonlösung in einem 25 ml fassenden Meßkolben auf dem Wasserbad zur Trockene ein und entfernt die letzten Reste Azeton durch Einblasen eines Luftstromes. Hierauf setzt man 20 ml Wasser zu und erhitzt 10 Minuten lang auf dem Wasserbad. Sodann versetzt man mit 5 ml Bleiazetatlösung (R), wobei die Verunreinigungen ausgefällt werden, und erwärmt nochmals kurz. Nach dem Erkalten füllt man mit Wasser bis zur Marke auf, nitriert und bestimmt das optische Drehungsvermögen des klaren Filtrates (Ph. Eur. V.6.6). Die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ des Arbutins beträgt $-64,40^\circ$.

$$\% \text{ Glykoside} = \frac{\alpha \cdot 38,8}{l \cdot g}$$

α = abgelesener Drehungswinkel in Grad (ohne Berücksichtigung des negativen Drehungssinnes in der Formel einzusetzen)

l = Länge des Polarisationsrohres in dm

g = Einwaage an Preiselbeerblättern in g

Preiselbeerblätter müssen einen Gehalt an Glykosiden, berechnet als Arbutin, von mindestens 3,0% aufweisen.

Aufbewahrung

Vor Licht geschützt, in gut schließenden Behältnissen.

Dosierung

Gebräuchliche Einzeldosis als Abkochung: 2 g auf 1 Teetasse.

Abbildung 35: die zu revidierende ÖAB-Originalmonographie von *Vitis-idaeae folium*

3.5 Vorschlag für die neue Monographie von *Vitis-idaeae folium*

Preiselbeerblatt

Vitis-idaeae folium

Folium vitis-idaeae

Definition

Das getrocknete Laubblatt von *Vaccinium vitis-idaea* L.

Gehalt: mindestens 3,0 Prozent Arbutin ($C_{12}H_{16}O_7$; M_r 272.3), bezogen auf die getrocknete Droge

Eigenschaften

Preiselbeerblätter sind geruchlos und schmecken zusammenziehend und etwas bitter

Prüfung auf Identität

A. Die bis 2 cm langen und bis 1 cm breiten Blätter sind kurzgestielt, oval oder verkehrt eiförmig, der Rand ist glatt und etwas umgebogen. Die ziemlich dicke, ledrige Blattspreite ist oberseits dunkelgrün glänzend, unterseits heller grün und deutlich braun punktiert. Die Nerven treten an der Unterseite deutlich hervor, und sind fein netzadrig angeordnet.

B. Die Epidermis der Blattoberseite besteht aus schwach welligen, die der Blattunterseite aus stärker wellig- buchtigen Zellen. Die Kutikula der Oberseite ist sehr stark entwickelt. Sie ist etwa so dick wie die Zellen der oberen Epidermis.

Die Spaltöffnungen kommen nur unterseits vor und sind von zwei dazu parallelen Nebenzellen umgeben. Ebenfalls unterseits sind vielzellige, keulenförmige Drüsenzotten mit zweizellreihigem Stiel und braunem Inhalt zu sehen. Im Mesophyll

finden sich 2–3 Reihen ungleich großer Palisadenzellen, ferner ein lockeres Schwammparenchym. Ebenfalls im Mesophyll sind Ca-Oxalatdrusen zu finden, vor allem in Leitbündelnähe, wo auch Einzelkristalle und selten Kristallzellreihen vorkommen. Über den Nerven sieht man einzelne, stark verdickte, gewarzte Borstenhaare.

C. Die Droge wird pulverisiert (355) (2.9.12). Das Pulver ist graugrün.

Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat-Lösung *R* verwendet wird. Das Pulver zeigt folgende Merkmale:

Blattbruchstücke mit unterer Epidermis in Aufsicht: wellig-buchtige Epidermiszellen, Spaltöffnungen, Drüsenzotten (meistens nur Bruchstücke) und durchscheinendes Schwammparenchym.

Blattbruchstücke mit oberer Epidermis in Aufsicht: geradwandige bis schwach wellige Epidermiszellen mit durchscheinenden Palisadenzellen.

Bruchstücke des Blattes im Querschnitt mit dicker Kutikula der oberen Epidermis und darunter 2-3 Reihen Palisadenzellen.

Weiters sind zu sehen: reichlich Fasern, Fragmente des Schwammparenchyms, einzelne stark verdickte, gewarzte Borstenhaare sowie Ca-Oxalatdrusen und Einzelkristalle.

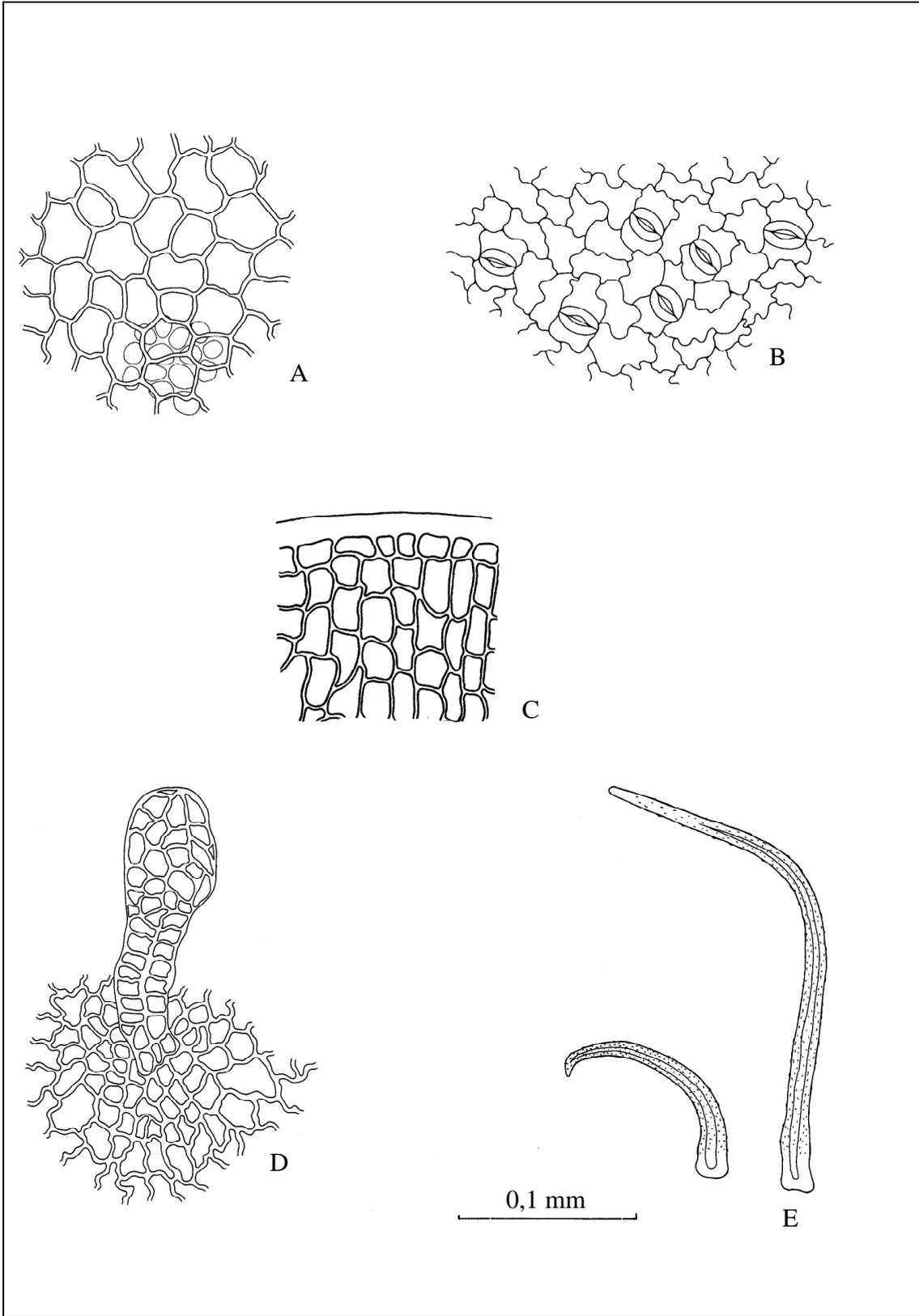


Abbildung 36: mikroskopische Merkmale

Abbildung 36 (Seite 72):

- A: Aufsicht auf Blattoberseite mit durchscheinenden Palisadenzellen
- B: Aufsicht auf Blattunterseite mit Stomata
- C: Fragment eines Querschnitts – Palisadengewebe mit anhaftender dicker Kutikula
- D: Drüsenzotte auf Blattunterseite
- E: Deckhaare

D. Dünnschichtchromatographie (2.2.27)

Untersuchungslösung: 0,5 g pulverisierte Droge (710) (2.9.12) werden 10 min lang mit 5 ml einer Mischung gleicher Volumsteile Methanol *R* und Wasser *R* unter Rückflusskühlung erhitzt. Danach wird die Mischung heiß filtriert und das Filtrat unter Nachwaschen des Kolbens und des Filters mit der Methanol- Wasser-Mischung zu 5,0 ml aufgefüllt.

Referenzlösung: 25 mg Arbutin *R*, 25 mg Gallussäure *R* und 25 mg Hydrochinon *R* werden in Methanol *R* zu 10,0 ml gelöst.

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

Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure *R*, Wasser *R*, Ethylacetat *R* (6:6:88 V/V/V)

Auftragen: jeweils 20 µl bandförmig [jeweils 5 µl bandförmig]

Laufstrecke: 15 cm [oder 8 cm]

Trocknen: bei 105 bis 110 °C, bis das Fließmittel verdampft ist

Detektion: Die Platte wird mit einer Lösung von Dichlorchinonchlorimid *R* ($10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) in Methanol *R* und danach mit Ammoniaklösung, verdünnt *RI* ($41 \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$) besprüht.

Ergebnis: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen von Referenzlösung und Untersuchungslösung ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich. Im Chromatogramm der Untersuchungslösung können zusätzlich 2 oder 3 blaue und einige braune oder bräunlich graue Zonen vorhanden sein.

Oberer Plattenrand	
Hydrochinon : blau - braun Gallussäure : bräunlich <hr style="width: 20%; margin-left: 0;"/> <hr style="width: 20%; margin-left: 0;"/>	eine bräunliche Zone eine hellblaue Zone
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (2.8.2): Höchstens 3%.

Trocknungsverlust (2.2.32): Höchstens 7,0%

Asche (2.4.16): Höchstens 4,0%.

Gehaltsbestimmung

Flüssigchromatographie (2.2.29)

Untersuchungslösung: In einem 100-ml-Rundkolben mit Schliff werden 0,800 g pulverisierte Droge (710) (2.9.12) mit 20 ml Wasser *R* versetzt und 30 min lang im Wasserbad unter Rückflusskühlung erhitzt. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit durch einen Wattebausch aus Baumwolle filtriert. Der Wattebausch wird zum Rückstand in den 100-ml-Rundkolben gegeben und mit 20 ml Wasser *R* zur Extraktion noch einmal 30 min lang im Wasserbad unter Rückflusskühlung erhitzt. Nach dem Erkalten wird die Mischung durch ein Papierfilter filtriert. Die Filtrate werden vereinigt, mit Wasser *R* zu 50,0 ml verdünnt und durch ein Papierfilter filtriert. Die ersten 10 ml des Filtrats werden verworfen.

Referenzlösung: 10,0 mg Arbutin *CRS* werden in der mobilen Phase zu 10,0 ml gelöst.

Säule:

- Größe: $l = 0,25$ m, $\varnothing = 4$ mm
- Stationäre Phase: desaktiviertes, octadecylsilyliertes

Kieselgel zur Chromatographie *R* (5 μm)

Mobile Phase: Methanol *R*, Wasser *R* (10:90 *V/V*)

Durchflussrate: 1,2 ml \cdot min⁻¹

Detektion: Spektrometer bei 280 nm

Der Prozentgehalt an Arbutin wird nach folgender Formel

berechnet:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 100 \cdot p}{A_2 \cdot m_1}$$

A_1 = Fläche des Arbutin-Peaks im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_2 = Fläche des Arbutin-Peaks im Chromatogramm der Referenzlösung

m_1 = Einwaage der Droge in Gramm

m_2 = Einwaage des Arbutins in der Referenzlösung in Gramm

p = Prozentgehalt an Arbutin in Arbutin *CRS*

Lagerung

Vor Licht geschützt, in gut schließenden Behältnissen.

4 Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit wurden die ÖAB-Monographien „Folium Vitis-idaeae“ und „Tinctura Valerianae aetherea“ überarbeitet. Dabei wurden sie hinsichtlich der Aktualisierung der Analysemethoden, der ausschließlichen Verwendung des europäischen Reagenziensatzes und der Harmonisierung in Stil und Inhalt an den Standard des Ph. Eur. angepasst. Der Nomenklatur des Ph. Eur. entsprechend sind diese Monographien jetzt unter dem Namen „Baldriantinktur, etherische / Valeriana tinctura aetherea“ und „Preiselbeerblatt / Vitis-idaeae folium“ zu finden.

Die wichtigsten Neuerungen der Analysemethoden werden im Folgenden kurz geschildert: beiden Monographien wurden Vorschriften zur dünnschichtchromatographischen Identitätsprüfung sowie eine Gehaltsbestimmung spezifischer Hauptinhaltsstoffe mittels HPLC hinzugefügt. Für die zu quantifizierenden Verbindungen wurde ein vorgeschriebener Mindestgehalt festgelegt. DC- und HPLC-Vorschriften konnten dabei weitgehend unverändert von den Monographien „Baldriantinktur / Valerianae tinctura“ und „Bärentraubenblätter / Uvae ursi folium“ des Ph. Eur. 6.0 übernommen werden. Es ergab sich lediglich eine geringfügige Modifikation des zweiten Sprühreagens in der DC-Vorschrift von Vitis-idaeae folium. Anstatt wässriger Na₂CO₃-Lösung wurde zwecks leichter Handhabbarkeit verdünnte Ammoniaklösung umgestellt.

Die Monographie „Vitis-idaeae folium“ enthält von nun an schematische Darstellungen der wichtigsten mikroskopischen Drogenmerkmale sowie eine mikroskopische Charakterisierung der Pulverdroge. Die bereits in der Monographie des ÖAB beschriebenen Charakteristika wurden anhand einiger Stichproben überprüft. Dabei wurden Änderungen der morphologischen Beschreibung des Blattrands und der Nervatur vorgenommen. Ebenfalls wurde die Beschreibung einiger mikroskopischer Merkmale wie Drüsenzotten, Kutikula und Stomatatyp sowie Calciumoxalatkristalle bzw. Drusen geändert. Der Abschnitt PRÜFUNG AUF REINHEIT wurde um die Bestimmung des Trocknungsverlustes erweitert und ein dafür gültiger Grenzwert festgelegt.

In der Monographie „Valerianae tinctura aetherea“ wurden Änderungen betreffend der Grenzwerte der Dichte und des Trockenrückstands vorgenommen. Der zulässige Grenzwertbereich der Dichte wurde von 0,800 – 0,810 g/ml auf 0,785 – 0,800 g/ml korrigiert und der Mindestwert des Trockenrückstands von 1,0 % auf 0,9 % herabgesetzt. Der Gehalt an Sesquiterpensäuren gleicht dem der ethanolschen Baldriantinktur (0,015 %).

Abschließend wurde eine Anpassung des Erscheinungsbildes entsprechend dem Stil des Ph. Eur. durchgeführt, um die Revision dieser Monographien als vollständig betrachten zu können.

5 Summary

In this diploma thesis the ÖAB-monographs „Folium Vitis-idaeae“ and „Tinctura Valerianae aetherea“ were updated. The monographs were adapted to the Ph. Eur. monograph structure concerning the actualisation of the methods of analysis, the exclusive use of the Ph. Eur. reagent set and the harmonisation in style and contents. According to the nomenclature of the Ph. Eur. these monographs can be found under the names „Baldriantinktur, etherische / Valerianae tinctura aetherea“ and "Preiselbeerblatt / Vitis-idaeae folium".

In the following paragraphs the most important modifications of the analysis methods are briefly described: to both monographs thin layer chromatography (TLC) as means of identification as well as HPLC methods for quantification of lead compounds were added. A prescribed minimum content of the main components was determined. For both monographs existing TLC and HPLC systems were adopted from the monographs „Baldriantinktur / Valerianae tinctura“ und „Bärentraubenblätter / Uvae ursi folium“ of the Ph. Eur. 6.0. Regarding the monograph Vitis-idaeae folium there was only a slight modification of the second spraying reagent used for TLC analysis. Instead of aqueous solution of Na₂CO₃, diluted ammonia solution was used, since it's easier to administer.

From now on the monograph Vitis-idaeae folium contains schematic pictures of the most important microscopic drug features as well as a microscopic characterisation of the powdered drug. The characteristic features, already described in the existing monograph, were verified using random samples. Hence changes in the morphologic description of leaf edge and venation were established. Also the description of some microscopic features like gland villi, cuticle and stomata type as well as calcium oxalate crystals respectively druses was changed. "Loss on drying" was added to the TESTS section, including the introduction of a proper limit value.

In the monograph "Valerianae tinctura aetherea" new limits were set for density and dry matter. The allowed range of density was changed from 0,800 – 0,810 g / ml to 0,785 – 0,800 g / ml, and the minimum value of dry matter was decreased from 1.0% to 0.9%. The content of sesquiterpenic acids resembles that of the ethanolic tincture of valerian roots (0,015 %).

Finally the general appearance of both monographs was adapted to the style of the Ph.Eur. to complete the revision.

6 Literatur

Benke D., Barberis A., Kopp S., Altmann K. H., Schubiger M., Vogt K. E., Rudolph U., Möhler H. (2009), GABA A receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerenic acid, a major constituent of valerian root extracts, *Neuropharmacology*, Vol. 56(1), Seite 174-181.

Bensky D., Clavey S., Stöger E. (2004), *Materia Medica - Chinese Herbal Medicine*, eastland press Seattle, 3. Ausgabe, Seite 953-956

Bergsten J., 24. Aug. 2006, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium_vitis-idaea_20060824_003.jpg, *Vaccinium vitis-idaea*, Schweden, kopiert am 26.03.2010 um 11:40.

Bodesheim U., Hölzl J. (1997), Isolierung, Strukturaufklärung und Radiorezeptorassays von Alkaloiden und Lignanen aus *Valeriana officinalis* L., *Pharmazie*, Vol. 5, Seite 386-391.

Büchi G., Popper T. L., Stauffacher D. (1960), Terpenes. XIV. The structure of valerenic acid, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 82, Seite 2962-3.

Cheng H., Lin T., Yang C., Shieh D., Lin C. (2005), In vitro anti-HSV-2 activity and mechanism of action of proanthocyanidin A-1 from *Vaccinium vitis-idaea*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 85 (1), Seite 10-15.

Dietz B. M., Mahady G. B., Pauli G. F., Farnsworth N. R. (2005), Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT_{5a}-receptor *in vitro*, *Molecular Brain Research*, Vol. 138 (2), Seite 191-19.

Donath F., Quispe S., Diefenbach K., Maurer A., Fietze I., Roots I. (2000), Critical evaluation of the effect of valerian extract on sleep structure and sleep quality, *Pharmacopsychiatry*, Vol. 33 (6), Seite 239.

Eickstedt K. W., Rahman S. (1969), Psychopharmacologic effects of valepotriates, *Arzneimittel-Forschung*, Vol. 19 (3), Seite 316-19.

- Europäisches Arzneibuch, 6. Ausgabe (Band 6.0), Grundwerk 2008, Verlag Österreich GmbH.
- Fischer R. W., Hauser W. (1968), Praktikum der Pharmakognosie, 4. Auflage, Springer Verlag (Wien, New York), Seite 67- 68.
- Frohne D. (1969), Urinary disinfectant activity of bearberry leaf extracts, *Planta Medica*, Vol. 18 (1), Seite 1-25.
- Granger R. E., Campbell E. L., Johnston G. A. R. (2005), (+)- and (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA_A-receptors, *Biochemical Pharmacology* Vol. 69, Seite 1101–1111.
- Grusla D., Hoelzl J., Krieglstein J. (1986), Effects of valerian in the rat brain, *Deutsche Apotheker Zeitung*, Vol. 126 (41), Seite 2249-53.
- Moeck S. (1994), *Vitis idaeae folium*, in: Hänsel R., Keller K., Rimpler H., Schneider G. (Hrsg.), *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, Band 6, 5. Auflage, Springer- Verlag, Seite 1062-1065.
- Hohmann B., Reher G., Stahl- Biskup E.(2001), *Mikroskopische Drogenmonographien deutschsprachiger Arzneibücher*, 3. Band, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Seite 615- 616.
- Holopainen M., Jabodar L., Seppanen-Laakso T., Laakso I., Kauppinen V. (1988), Antimicrobial activity of some Finnish ericaceous plants, *Acta Pharmaceutica Fennica*, Vol. 97(4), Seite 197-202.
- Jepson R. G., Craig J. C. (2008), Cranberries for preventing urinary tract infections, *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD001321.
- Khom S., Baburin I., Timin E., Hohaus A., Trauner G., Kopp B., Hering S. (2007), Valerenic acid potentiates and inhibits GABA_A-receptors: Molecular mechanism and subunit specificity, *Neuropharmacology*, Vol. 53 (1), Seite 178-18.
- Kleij T.(2003), Zur Entwicklungs- und Herstellungsgeschichte der "Hoffmannstropfen" und ihrer Darstellung und Interpretation in den medizinischen Werken des 19. und 20. Jahrhunderts. Dresden, 2003. Internetrecherche am 28.03 um 0:45:
<http://de.wikipedia.org/wiki/Hoffmannstropfen>.

- Lacher S. K., Mayer R., Sichert K., Nieber K., Mueller C. E. (2007), Interaction of valerian extracts of different polarity with adenosine receptors: Identification of isovaltrate as an inverse agonist at A1 receptors, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 73(2), Seite 248-258.
- Marder N. M., Medina J. H., Paladini A. C., Viola H. A. M., Wasowski C. L. N. (2003), Valeriana-derived sedative and anxiolytic substances and treatments, *PCT Int. Appl.*, 72 pp..
- Merck E. (1980), *Merck Reagenzien – Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie*, Darmstadt.
- Oxman A. D., Flottorp S., Havelsrud K., Fretheim A., Odgaard-Jensen J., Austvoll-Dahlgren A., Carling C., Pallesen S., Bjorvatn B. (2007) A Televised, Web-Based Randomised Trial of an Herbal Remedy (*Valerian*) for Insomnia. *PLoS ONE*, Vol. 2 (10), Seite e1040.
- Österreichisches Arzneibuch, amtliche Ausgabe 2009, Verlag Österreich GmbH, (Gesamtausgabe).
- Paper D. H., Koehler J., Franz G. (1993), Bioavailability of drug preparations containing a leaf extract of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengl. (*Uvae ursi folium*), *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, Vol. 3 (2), Seite 63-6.
- Houghton P. J. (1998), *Medicinal and Aromatic Plants- Industrial Profiles*, Vol. 1. Valerian- The Genus Valeriana.
- Quinlan J., Firestone L. (1992), Ligand-dependent effects of ethanol and diethylether at brain benzodiazepine receptors, *Pharmacology, biochemistry and behavior*, Vol. 42 (4), Seite 787-90.
- Quintus J., Kovar K.-A., Link P., Hamacher H. (2005), Urinary Excretion of Arbutin Metabolites after Oral Administration of Bearberry Leaf Extracts, *Planta Medica*, Vol. 71 (2), Seite 147-152.
- Reichling J., Horz K., Bodesheim U., Schulz V. (2007), Valeriana. In: Blaschek W, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller K, Reichling J, Schulz V (Hrsg.) *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, Band 16, 6. Ausgabe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 449-490.

- Schönfelder I., Schönfelder P. (2004), Das neue Handbuch der Heilpflanzen, Gemeinsame Ausgabe der Franckh-Kosmos Verlags-GmbH Stuttgart & CoKG und der wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Seite 464.
- Schumacher B., Scholle S., Hölzl J., Khudeir N., Hess S., Müller C. E. (2002), Lignans Isolated from Valerian: Identification and Characterization of a New Olivil Derivative with Partial Agonistic Activity at A1 Adenosine Receptors, J. Nat. Prod., Vol. 65 (10), Seite 1479–1485.
- Siegers C., Bodinet C., Ali S. S., Siegers C.-P. (2003), Bacterial deconjugation of arbutin by *Escherichia coli*, Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology, Vol. 10 (4), Seite 58-60.
- Siegers C. P., Siegers J. P., Pentz R., Bodinet C., Freudenstein J. (1997), Metabolism of arbutin from *Uvae ursi*-extracts in humans, Pharmaceutical and Pharmacological Letters, Vol. 7 (2/3), Seite 90-92.
- Titz W., Jurenitsch J., Fitzbauer-Busch E., Wicho E., Kubelka W. (1982), Valepotriate und ätherisches Öl morphologisch und chromosomal definierter Typen von *Valeriana officinalis* s.l. I. Vergleich von Valepotriatgehalt und -zusammensetzung. Scientia Pharmaceutica 50, Seite 309-324.
- Trauner G. (2009), Untersuchungen zur Wirkung von *Valeriana officinalis* L. s.l. Dissertation, Universität Wien.
- Wagner H., Blatt S., Zgainski E. M. (1983), Drogenanalyse – Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen, Springer- Verlag (Berlin, Heidelberg, New York).
- Wagner H., Jurcic K. (1979), Spasmolytic effect of *Valeriana*, Planta Medica, Vol 37 (1), Seite 84-6.
- Wang X., Fan Y., Yan X. (2002), Extraction, separation and structure identification of chemical constituents from stem and leaves of *Vaccinium vitis-idaea*, Zhongcaoyao, Vol 33 (7), Seite 595-596.
- Wang X., Sun H., Fan Y., Li L., Makino T., Kano Y. (2005), Analysis and bioactive evaluation of the compounds absorbed into blood after oral administration of the

extracts of *Vaccinium vitis-idaea* in rat, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 28 (6), Seite 1106-1108.

Wasowski C., Marder M., Viola H., Medina J. H., Paladini A. C. (2002), Isolation and Identification of 6-Methylapigenin, a Competitive Ligand for the Brain GABA_A-Receptors, from *Valeriana wallichii*, *Planta Med* 2002, Vol. 68(10), Seite 934-936, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.

Wichtl M., Czygan F.C. (2002), *Teedrogen und Phytopharmaka*, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Seite 628 – 629.

Ziegler G., Ploch M., Miettinen-Baumann A., Collet W. (2002), Efficacy and tolerability of valerian extract LI 156 compared with oxazepam in the treatment of non-organic insomnia - a randomized, double-blind, comparative clinical study. *European Journal of Medical Research*, Vol. 7, Seiten 480-486.

Curriculum vitae

Martin Hageneder

Goldschlagstraße 62/3

1150 Wien

Tel: 0699/81517740



Persönliche Angaben:

Geburtsdatum und -ort: 22. Februar 1982, Eberstalzell

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: Österreich

Eltern: Josef Hageneder Konstrukteur
Gertraud Hageneder Physiotherapeutin

Geschwister: Dr. med. univ. Eva Hageneder, 28 Jahre

Felix Hageneder, 21 Jahre, Student

Ausbildung:

1988 – 1992	Volksschule Steinhaus
1992 – 1996	BRG Brucknerstraße in Wels
1996 – 2001	HTL für Maschinenbau in Wels
02/2002 – 01/2003	Zivildienst in der Lebenshilfe Linz, Tagesheimstätte
03/2003 – 10/2003	1 Semester Jus an der Universität Wien
ab 10/2003	Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Bisherige Tätigkeiten:

07/1998	Ferialpraktikum bei Fa. Leitner GmbH, Wels, Maschinenschlosserei
08/1999	Ferialarbeit bei TGW Transportgeräte GmbH & CoKG, Wels; Montagetätigkeiten
08/ 2000	Ferialpraktikum bei Bombardier-Rotax GmbH & CoKG, Gunskirchen; Tätigkeiten in der Abteilung für Werkstoffprüfung
10/2001	Ferialarbeit in der Fa. Kleemaier Regal- u. Stahlbaumontagen, Eberschwang
12/2001 – 02/2002	Fa. Hageneder TB-Maschinenbau, Wels; Tätigkeiten als Detailkonstrukteur
09-10 2004	Ferialarbeit in der Fa. Wolf-Systembau, Scharnstein; Fertigteilhausmontage

08-09 2005	Ferialarbeit in der Fa. Strabag, Wels; Lärmschutzmontage
02/2006 – 06/2007	Geringfügige Beschäftigung im Lena&Laurenz Essgeschäft- Stefan Taffent KEG, Zollergasse 4, 1070 Wien
09/2007	Praktikum in der Sonnen-Apotheke, Gunskirchen
08/2008	Praktikum in der Sonnen-Apotheke, Gunskirchen
11-12/2010	Praktikum in der Apotheke am Reumannplatz, 1100 Wien
12/2010 – 04/2011	Teilzeitstelle in der Auge Gottes Apotheke, 1090 Wien

Besondere Kenntnisse: engagiert, kommunikativ, genau
Führerschein A/B,
Sprachkenntnisse: Englisch
Gitarre

Interessen, Hobbies: Musik, Zeichnen, Snowboarden, Schwimmen