



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Ausarbeitung und Validierung einer  
Analysemethoden zur Qualitätsprüfung von  
Mistelpräparaten

verfasst von

Nadine Grosinger

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek



## **Danksagung**

Zu allererst möchte ich mich bei meinem persönlichen Betreuer Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Gottfried Reznicek für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Er hat sich stets die Zeit genommen, sich meinen Fragen und Anliegen mit den größten Bemühungen zu widmen.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Departments für Pharmakognosie und meinen Diplomanden-Kollegen/-innen, die mich von Beginn an mit offenen Armen begrüßt haben und mit denen jeder Tag angenehm gestaltet wurde.

Ich bedanke mich auch bei Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch, Leiterin des Departments für Pharmakognosie, für die Bereitstellung meines Diplomarbeitsplatzes.

Ich bedanke mich bei meinen lieben Freunden, die zahlreiche Stunden des Lernens in der Bibliothek und im Labor mit mir verbrachten und sich dadurch der Weg durch das Studium erheblich angenehmer gestaltete.

Großer Dank gilt meiner Familie, die mich während meiner gesamten Studienzzeit stets unterstützt, motiviert und mir vor allem zu keiner Zeit Druck zur schnellen Vollendung meines Studiums gemacht hat.



## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	1
1.1	<i>Viscum album</i> L. ....	1
1.1.1	Inhaltsstoffgruppen von <i>Viscum album</i> L. ....	2
1.1.2	Wirkung und Anwendung in der Phytotherapie .....	4
1.1.2.1	Isorel® – Krebstherapeutikum aus <i>Viscum album</i> .....	5
1.2	Problemstellung und Zielsetzung .....	7
2.	Material .....	8
2.1	Probenmaterial .....	8
2.2	Reagenzien und Lösungsmittel .....	9
2.3	Geräte .....	9
3.	Methoden.....	12
3.1	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) .....	12
3.2	Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie (LC-MS) .....	15
3.3	Dünnschichtchromatographie (DC) .....	16
4.	Ergebnisse.....	17
4.1	HPLC-Methodenentwicklung zur Erstellung eines „fingerprint“- Chromatogramms .....	17
4.2	Versuche zur Identifizierung der Inhaltsstoffe in.....	27
	Isorel®-Produkten .....	27
4.2.1	LC-MS Analyse von Isorel® .....	27
4.3	Interner Standard und Referenzsubstanz .....	34
4.3.1	Interner Standard .....	34
4.3.2	Referenzsubstanz .....	38
4.3.3	Berechnung des Standardkorrekturfaktors .....	40
4.4	Validierung der Methode .....	44
4.5	Validierung der Methode .....	46
4.5.1	Validierungsprotokoll .....	46
5.	Diskussion .....	59

6.	Zusammenfassung .....	60
7.	Abstract .....	61
8.	Anhang .....	62
9.	Abbildungsverzeichnis .....	106
10.	Tabellenverzeichnis.....	108
11.	Abkürzungsverzeichnis .....	109
12.	Literaturverzeichnis.....	111
13.	Curriculum vitae.....	112

## 1. Einleitung

Bereits seit Jahrhunderten wird die Mistel und Zubereitungen daraus in der Pflanzenheilkunde als Mittel gegen vielerlei Erkrankungen angewendet. Auch wenn diese Pflanze von manchen als „anthroposophisches Heilmittel“ angesehen wird, hat die Therapie auf Grund von Qualitätsprüfungen und Produktkontrollen einen hohen Stellenwert in der Phytomedizin erlangt und es befinden sich nun zahlreiche Präparate der Mistel am Markt.

### 1.1 *Viscum album* L.

Als Stamm-pflanze der Gattung *Viscum* aus der Familie der *Viscaceae* bzw. *Loranthaceae*, wird in der Literatur *Viscum album* L. angeführt und in die Unterarten der Laubholz-Mistel (ssp. *platyspermum* KELL.), Tannen-Mistel (ssp. *abietis* BECK), Kiefern-Mistel (ssp. *laxum* FIEK) und Japanische Mistel (ssp. *coloratum* KOM.) eingeteilt. In der pharmazeutischen Industrie wird nach den Wirtsbäumen (z.B.



Abb.1. *Viscum album* L.

Apfelbaum-Mistel, Kiefern-Mistel, Pappel-Mistel) unterschieden. Der Halbschmarotzer wächst als kugeliger Halbstrauch auf Holz-pflanzen, mit seinen Wurzeln die Rinde des Wirts durchdringend. Die immergrünen, ganzrandigen Laubblätter sind ledrig und haben eine lanzettliche Form. Die Mistel hat ihre Blütezeit von Februar bis Mai und trägt erbsengroße, weiße bis gelblich-grüne, selten auch orangefarbene, fleischige Scheinbeeren.

In alten Überlieferungen wurde der „Goldene Zweig“ bereits als Zauber- und Hexenpflanze für religiöse Riten der Druiden bezeichnet, die als Mittel gegen alle Gifte galt.

Auch der alte norwegische Brauch, dass sich ein junges Pärchen unter einem Mistelzweig küssen sollte, ist allgemein bekannt [1,2,3]. Der Legende nach bleiben diese Paare ein Leben lang zusammen [5].

### 1.1.1 Inhaltsstoffgruppen von *Viscum album* L.

*Viscum album* L. weist einige für die Mistel kennzeichnende Inhaltsstoffe wie Mistellektine und Viscotoxine auf, ebenso aber auch Sekundärstoffe, die dem Wirtsbaum entzogen werden. Das Vorkommen folgender Inhaltsstoffe kann außer für *Viscum album* L. auch für andere Arten der Gattung *Viscum* angenommen werden [1].

- Lektine

Dabei handelt es sich um Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 60.000 und einem Kohlenhydratanteil von rund 11%, die je nach Zucker-Spezifität in die Mistellektine ML I, ML II und ML III eingeteilt werden. ML I gilt als das am besten untersuchte Hauptlektin. Bei allen Typen handelt es sich um eine Mischung aus Isolektinen, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden können. Sie bestehen aus Monomeren bzw. Dimeren aus einer A- und B-Kette, wobei die A-Kette, auch als Toxomer bezeichnet, enzymatische Eigenschaften besitzt. Die B-Kette (Haptomer) hingegen weist die für Zuckerverknüpfungen nötigen Bindungsstellen auf.

Der Gehalt an Lektinen in der Pflanze beträgt circa 0,03 – 0,1% und unterliegt unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, jahreszeitlichen Schwankungen und dem Einfluss des Wirtsbaumes [1,4].

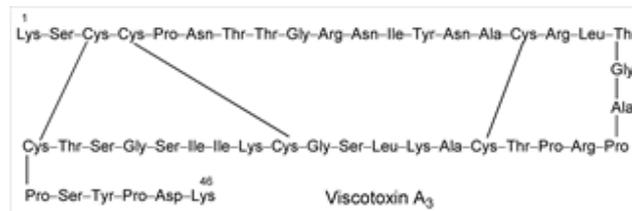
- Viscotoxine

Diese Polypeptide sind aus 46 Aminosäuren aufgebaut, gekennzeichnet durch eine hohe Anzahl an Arginin- und Lysinresten, wodurch ihr isoelektrischer Punkt im basischen Bereich bei pH 10,7 liegt und Wechselwirkungen mit DNS ermöglicht werden. Strukturell

aufgeklärt wurden bereits Viscotoxin A<sub>2</sub>, Viscotoxin A<sub>3</sub> (Abb. 2), Viscotoxin B und Viscotoxin Ps<sub>1</sub>.

Durch das Vorhandensein von drei Disulfidbrücken sind die Polypeptide dicht gepackt und dadurch relativ robust gegen Proteasen und Hitzeeinwirkung. Sie weisen zudem einen amphiphilen Charakter auf, was ihre schädliche Wirkung auf Zellmembranen und damit vermutlich ihre Zytotoxizität erklärt.

In *Viscum*-Arten kommen sie in einer Konzentration von etwa 0,01 bis 0,5 % vor [1,2].



**Abb.2.** Viscotoxin A<sub>3</sub>

- Phenylpropanderivate

Neben einigen pflanzentypischen Phenylacrylsäuren wie der Kaffeesäure, Sinapinsäure oder der Ferulasäure enthalten die Misteln die Inhaltsstoffe Syringin (= Syringosid, Syringenin-4'-O-glucosid) und Syringenin-4'-apiosyl-glucosid.

Zu den weiteren Inhaltsstoffen zählen Polysaccharide, die in Spross und Stängel einen Gehalt zwischen 0,4 und 4,7 % aufweisen und vor allem in den Scheinbeeren als Heteroglykane vertreten sind.

Ebenso zählen Lignane, Cyclitole, besonders Viscumitol, Flavonoide und Triterpene, aber auch freie Aminosäuren, Eiweißstoffe und biogene Amine zu den *Viscum*-Inhaltsstoffen [1].

### **1.1.2 Wirkung und Anwendung in der Phytotherapie**

Die Wirksamkeit der Zubereitungen aus Misteldrogen zur peroralen Einnahme oder zu Injektionszwecken ist umstritten und konnte in pharmakologischen Untersuchungen nur teilweise belegt werden. Zudem unterliegt der mit der Wirkung korrelierende Gehalt an Wirkstoffen den genetischen Variabilitäten der Pflanze und äußeren Einflüssen. Dadurch stellt sich ein Vergleich der Präparate als sehr schwierig heraus [1,4].

Eine der beschriebenen Wirkungen liegt in der Zytotoxizität. Anhand von Mistelauszügen wurde an isolierten Zellen, darunter auch Tumorzelllinien, ein wachstumshemmender Effekt beobachtet, und unter sehr hohen Konzentrationen sogar eine zytotoxische Wirkung. Dafür werden vor allem die Lektine verantwortlich gemacht. Mit Hilfe der B-Kette, die mit Zuckerresten von Glykoproteinen an der Zelloberfläche von Tumorzellen interagiert, kommt es zur Agglutination der Zellen und die zytostatische Wirkung entfaltet sich. In höherer Konzentration der Wirkstoffe kommt es zur Endozytose der Mistellektine und im Zellinneren zu einer Spaltung der A- und B-Kette, wobei die nun aktivierte A-Kette durch Blockade der Proteinsynthese direkt zytotoxisch wirkt.

Auch den Viscotoxinen wird ein zytotoxischer Effekt nachgesagt, der vermutlich einerseits in deren Störung von Membranfunktionen aufgrund ihrer Amphiphilie liegt, andererseits in ihrer Fähigkeit, histonartig mit DNA in Wechselwirkung zu treten. Nach peroraler Anwendung sind sie hochtoxisch und führen je nach Dosierung von Quaddelbildung bis hin zu Nekrosen. Auch von kardiotoxischen Nebenwirkungen wurde berichtet [1,4].

In geringerer, nichttoxischer Konzentration weist der Gesamtextrakt immunmodulatorische Eigenschaften auf. Diese liegen in der Proliferationsförderung von Lymphozyten und Aktivierung von NK-Zellen (engl. natural killer cells) und T-Helferzellen, sowie in der Freisetzung von Interleukinen und Tumornekrosefaktoren. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung der Antikörperbildung nach Antigengabe.

Hier spielen die Mistellektine eine ebenso wichtige Rolle, durch ihre Bindung an Lymphozyten stimulieren sie die Immunantwort.

Die Viscotoxine aktivieren durch Auslösung reizender Entzündungen das zelluläre Abwehrsystem, vor allem durch Anregung von Makrophagen.

Polysaccharide wirken durch Vermittlung einer Brückenbildung zwischen NK-Zellen und Tumorzellen, wodurch es zur Zytolyse kommt, als immunogener Verstärker [1,4,6].

Zur Langzeitbehandlung gegen Bluthochdruck ist der Misteltee als perorale Zubereitung in Anwendung, der zusätzlich bei Schwindelgefühl, Epilepsie, Keuchhusten und Asthma eingesetzt wird. Die Aufnahme von Mistellektinen und Viscotoxinen in peroralen Verabreichungen ist aufgrund mangelnder Resorption auszuschließen [4].

Als Anwendungsgebiete werden vor allem die Segmenttherapie bei degenerativ entzündlichen Gelenkserkrankungen (intrakutane Injektion) und die Palliativtherapie im Sinne einer unspezifischen Reiztherapie bei bösartigen Tumoren genannt. Es soll hier zur Steigerung der Lebensqualität der Tumorpatienten kommen, einer Erhöhung von Leistungsfähigkeit und einer Zunahme von Appetit und Körpergewicht. Schlafstörungen werden verringert und das Schmerzniveau wird herabgesetzt.

In der anthroposophischen Medizin spricht man von bösartigen und gutartigen Geschwulstkrankheiten, bei denen die Misteltherapie ansprechen soll und auch für die Anregung der Knochenmarkaktivität genützt wird [1].

Die Anwendung von Mistelzubereitungen sollte in jedem Fall in Absprache mit einem Arzt erfolgen und Selbstmedikation vermieden werden [2].

### **1.1.2.1 Isorel® – Krebstherapeutikum aus *Viscum album***

Isorel® enthält den wässrigen, NaCl-hältigen (isotonische Kochsalzlösung) Frischpflanzenauszug von *Viscum album* planta tota und wird zur subkutanen und intramuskulären Injektion in der ergänzenden und unterstützenden Malignomtherapie eingesetzt.

Die Wirkung liegt in einer Steigerung der körperlichen und seelischen Befindlichkeit und Erhöhung der Lebensqualität von Tumorpatienten. Beobachtet wurden die Linderung der unerwünschten Nebenwirkungen von Chemotherapie oder Bestrahlung, Aktivierung der Immunabwehr, Reduktion des Schmerzempfindens sowie psychische Entlastung durch angstlindernde und stimmungsaufhellende Auswirkungen.

Die Anwendungsgebiete umfassen die ergänzende und unterstützende Tumortherapie in allen Krankheitsstadien von Karzinomen und Sarkomen, die Rezidivprophylaxe nach konventionellen Therapien und definierte Präkanzerosen.

Im Sortiment stehen die Präparate Isorel® A (*V. album abietis* – Tannennestel), Isorel® M (*V. album mali* – Apfelbaumnestel) und Isorel® P (*V. album pini* – Kiefernneestel) in unterschiedlichen Stärken zur Verfügung. Dabei handelt es sich, wie aus den jeweiligen Namen hervorgeht, um Nestelsubspezies, die von drei verschiedenen Wirtsbäumen stammen. Das hat zur Folge, dass sich die Arten in ihrer Inhaltsstoffzusammensetzung unterscheiden, wodurch sich eine Spezifität der Wahl des Präparates je nach Tumorart und -lokalisation ergibt.

Das Therapieschema beinhaltet eine Einleitungs- und eine Therapiephase, wobei je nach Ansprechen des Patienten und dem Krankheitsverlauf ein ausführlicher Plan der Dosisaufnahme vorgegeben wird. Die Dauer der Therapie sollte bei manifesten Karzinomen mindestens fünf Jahre betragen, bei solchen mit Neigung zu späteren Rezidiven kann sie sogar lebenslang erfolgen.

Eine Lokalreaktion an der Einstichstelle, die oft fälschlicherweise als Unverträglichkeitsreaktion gedeutet wird, tritt häufig auf und ist grundsätzlich erwünscht, da sie Zeichen von Reaktionsfähigkeit des Patienten auf das Mittel ist. Bei stark ausgeprägten Reaktionen wie großflächige Rötung oder Urticaria sollte eine Dosisreduktion oder sogar ein Präparatswechsel innerhalb von Isorel® erfolgen [7].

## 1.2 Problemstellung und Zielsetzung

Im Rahmen der Wiedertzulassung des Produktes Isorel® – eines Krebstherapeutikums aus *Viscum album*, stellte sich die Aufgabe, eine entsprechende Analysenmethode auszuarbeiten, mit deren Hilfe die Qualitätskontrolle von Ausgangsmaterial und Endprodukten sowie die Prüfung der Stabilität möglich ist. Dazu sollte ein sogenannter „fingerprint“ des Mistelextraktes erstellt werden und anhand dessen eine ausführliche Analyse des Präparates durchgeführt werden. Der Begriff „fingerprint“ bezeichnet ein für die Pflanze charakteristisches Inhaltsstoffmuster. Dieses soll mit einer möglichst einfachen und gut reproduzierbaren Methode dargestellt werden. Nachdem in Pflanzenextrakten eine sehr komplexe Mischung verschiedenster Inhaltsstoffe zu erwarten ist, musste die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gewählt werden, weil damit eine ausreichende Trennleistung im Vergleich zur Dünnschichtchromatographie (DC) erzielt werden kann.

Ziel dieser Diplomarbeit war es dementsprechend nun, eine geeignete HPLC-Methode auszuarbeiten und alle nötigen Schritte der Methodvalidierung zu prüfen, um eine geeignete Analysenmethode zur Qualitätssicherung von Isorel® zur Verfügung stellen zu können.

## 2. Material

### 2.1 Probenmaterial

– ISOREL® A (*V. album abietis*)

ISOREL® A Stärke 1: Ch.-B.: IA112a1 bis:01.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® A Stärke 6: Ch.-B.: IIA112a1 bis:01.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® A Stärke 12: Ch.-B.: IIIA112a2 bis:01.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® A Stärke 24: Ch.-B.: IVA112a1 bis:01.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® A Stärke 36: Ch.-B.: VA112a2 bis:01.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® A Stärke 60: Ch.-B.: VIA1110a1 bis:09.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria

– ISOREL® M (*V. album mali*)

ISOREL® M Stärke 1: Ch.-B.: IM1110a1 bis:09.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® M Stärke 6: Ch.-B.: IIM1110a1 bis:09.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® M Stärke 12: Ch.-B.: IIIM1110a1 bis:09.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® M Stärke 24: Ch.-B.: IVM1110a1 bis:09.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® M Stärke 36: Ch.-B.: VM1110a1 bis:09.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® M Stärke 60: Ch.-B.: VIM113a2 bis:02.2013 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria

– ISOREL® P (*V. album pini*)

ISOREL® P Stärke 1: Ch.-B.: IP107a2 bis:06.2012 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® P Stärke 6: Ch.-B.: IIP107a2 bis:06.2012 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® P Stärke 12: Ch.-B.: IIIP107a2 bis:06.2012 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® P Stärke 24: Ch.-B.: IVP107a2 bis:06.2012 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® P Stärke 36: Ch.-B.: VP107a2 bis:06.2012 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria  
ISOREL® P Stärke 60: Ch.-B.: VIP109a2 bis:08.2012 NOVIPHARM Ges.m.b.H., Austria

## 2.2 Reagenzien und Lösungsmittel

### Reagenzien

Aceton, p.a.

Ameisensäure (Rotipuran® ≥98%, p.a., ACS for HPLC)

Acetonitril (HiPerSolv CHROMANORM for HPLC – Super Gradient)

Aqua bidest.

Essigsäure, p.a.

Methanol, p.a.

n-Butanol, p.a.

Ninhydrin, p.a.

### Referenzsubstanzen

*Aminosäuren:* Asparaginsäure, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin,  
Serin, Threonin, Tyrosin, Valin

(Bestand des Departments für Pharmakognosie)

Arbutin (Bestand des Departments für Pharmakognosie)

Coffeinum purum (Bestand des Departments für Pharmakognosie)

Eleutheroside B (Fluka® analytical Standard Lot no. BCBK6303V)

*Phenylacrylsäuren:* Anissäure, Chlorogensäure, Ferulasäure,  
Kaffeesäure, Sinapinsäure, Syringasäure

(Bestand des Departments für Pharmakognosie)

Theophyllinum purum (Bestand des Departments für Pharmakognosie)

## 2.3 Geräte

Analysenwaage (Sartorius MC 210S)

Lösungsmittel Evaporator (Genevac EZ-2 Series Personal Evaporator)

Pipette (Eppendorf Research, PhysioCare concept)

Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 100)

• **Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)**

Software	Shimadzu LCsolution Version 1.25
System	Shimadzu LC-20
Degasser	DGU-20A <sub>5</sub>
Pumpe	LC-20AD
Autosampler	SIL-20AC HT
Säulenofen	CTO-20AC
Diodenarraydetektor	SPD-M20A, 190-400nm
Stationäre Phasen (inkl. Vorsäulen)	Thermo Fischer Acclaim™ 120 C18 2,1x150mm 3µm 120A Ser.no. 002697 Thermo Fischer Acclaim™ 120 C18 2x10mm 5µm 120A Prod.No. 069689  Thermo Fischer Acclaim™ 120 C8 2,1x150mm 3µm 120A Prod.no. 059124 Ser.no: 001382 Thermo Fischer Acclaim™ 120 C8 2x10mm 5µm 120A Prod.No. 069688  Thermo Fischer Acclaim™ Polar Advantage II C18 2,1x150mm 3µm 120A Prod.no. 063187 Ser.no: 001346 Thermo Fischer Acclaim™ Polar Advantage II C18 2x10mm 5µm 120A Prod.No. 069692  Dionex Acclaim™ 120 C18 2,1x120mm 3µm 120A Prod.no: 059130 Ser.no: 002655

- **Kopplung HPLC und Massenspektrometrie (LC-MS)**

DIONEX UltiMate 3000 Serie (HPLC)

Bruker HCT Iontrap (MS)

- **Dünnschichtchromatographie (DC)**

HPTLC Fertigplatte Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 10x10 cm

Camag Entwicklungs-Kammer

Mikropipetten

### 3. Methoden

#### 3.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) oder auch Hochleistungs-Flüssigchromatographie ist ein Verfahren zur Trennung von Substanzgemischen. Es handelt sich um eine Form der Säulenchromatographie, bei der das Fließmittel durch Druckeinwirkung mit Hilfe von Pumpen durch Probeneinlasssystem und Trennsäule befördert wird. Die Trennung des Stoffgemisches beruht auf der unterschiedlichen Affinität der Stoffe in einer mobilen und einer stationären Phase (Abb. 4).

Die mobile Phase stellt das Elutionsmittel dar, dessen Auswahl anhand von Polarität und Wechselwirkungseigenschaft (Protonendonator oder -akzeptor) erfolgt. Anforderungen von möglichst großer Reinheit und Gasfreiheit sind gestellt. Es besteht die Möglichkeit der Kombination mehrerer Lösungsmittel, wodurch sich die Optionen ergeben, während der Trennung die stets gleiche Konzentration beizubehalten (isokratische Elution) oder die Fließmittelzusammensetzung kontinuierlich zu verändern (Gradientenelution) [8,9].

Die stationäre Phase befindet sich in der Trennsäule, deren Füllung meist aus porösen Materialien mit großer spezifischer Oberfläche wie zum Beispiel Kieselgel oder Aluminiumoxid besteht. Eine wichtige Rolle für eine gute Trennleistung spielen neben dem Partikelmaterial die Korn- und Porengröße und Korngrößenverteilung. Der Teilchendurchmesser liegt meist zwischen 2 und 15  $\mu\text{m}$ .

Des Weiteren können die Trägermaterialien chemisch modifiziert sein, wie es bei der Umkehrphasen-Chromatographie (RP; reversed phase) der Fall ist. Hier wird die ursprünglich polare Trägeroberfläche von Kieselgel (Normalphase) mit beispielsweise lipophilen Alkylgruppen, häufig Octylgruppen (RP-8, Abb. 3) oder Octadecylgruppen (RP-18), bedeckt. Die Wahl der mobile Phase fällt dementsprechend auf ein polares Fließmittel.



**Abb. 3.** Vereinfachte Darstellung der Modifizierung zu RP-8

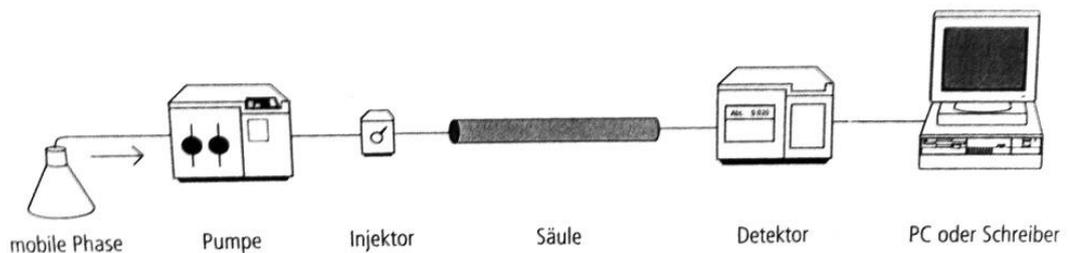
In Abhängigkeit von den Eigenschaften der Probenmoleküle wie Polarität, Löslichkeit oder Molekülmasse können die unterschiedlichsten Mechanismen zur Trennung der Substanzen angewendet werden. Die Adsorptions- und Verteilungschromatographie hat in der pharmazeutischen Analytik besonders große Bedeutung. Hier beruht die Trennung hauptsächlich auf Unterschieden in der Polarität und Löslichkeit der zu untersuchenden Stoffe.

Als weitere häufig angewendete Verfahren zur Trennung sind die Ionenpaar-, Ausschluss- und Affinitätschromatographie zu nennen.

Bei der chromatographischen Trennung gelangen die Substanzen mit unterschiedlicher Retentionszeit aus der Säule, werden von einem Detektor erfasst und als elektrisches Signal in einem äußeren Chromatogramm registriert.

Es stehen eine Reihe von Detektoren für die HPLC zur Verfügung, die Auswahl richtet sich nach den Eigenschaften der Analyten. Der Detektor sollte eine möglichst hohe Selektivität und Empfindlichkeit für die zu untersuchenden Substanzen aufweisen [8,9].

Die HPLC dient vor präparativen besonders analytischen Zwecken. Qualitative und quantitative Bestimmungen können gemacht, sowie Aussagen über Identität und Reinheit getroffen werden.



**Abb.4.** Schematische Darstellung des HPLC-Aufbaus [9]

Die meistverwendete Detektorquelle ist der UV/Vis-Detektor, der die Lichtabsorption des Eluats misst und das Signal im Chromatogramm als Peak registriert. Voraussetzung ist, dass die Substanz ein chromophores (lichtabsorbierendes) System besitzt.

Es gibt verschiedene Ausführungen von UV/Vis-Detektoren. Bei manchen sind die Wellenlängen frei wählbar, andere Geräte hingegen haben fixe Messwellenlängen eingestellt. Eine Sonderform stellt der Photodiodenarray-Detektor dar, der die Absorption bei mehreren Wellenlängen gleichzeitig misst und so zu jeder Zeit des Chromatogramms ein vollständiges UV/Vis-Spektrum aufzeichnet. Die Empfindlichkeit der Detektion verringert sich jedoch im Vergleich zur Messung bei nur einer Wellenlänge, dafür erhält man für die einzelnen Substanzen UV/Vis-Absorptionsspektren, die zur Identifizierung sehr nützlich sein können.

### 3.2 Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie (LC-MS)

Die Kopplung zwischen Flüssigchromatographie (engl. liquid chromatography) und Massenspektrometrie (engl. mass spectrometry) ist eines der empfindlichsten und selektivsten, jedoch auch aufwändigsten Detektionsverfahren, bei der die mittels HPLC aufgetrennten Substanzen über ein Interface ins Massenspektrometer gelangen und dort qualitativ und quantitativ analysiert werden können.

Die Probleme liegen in den großen Flüssigkeitsvolumina der Lösungsmittel, die aus dem HPLC-System kommen und bei direktem Eintritt in das Massenspektrometer das dort herrschende Hochvakuum zerstören würden. Zusätzlich erweist sich die häufig geringe Flüchtigkeit der zu analysierenden Substanzen als problematisch. Eine Lösung stellt die Anwendung von Spray-Verfahren dar [8,9], wo das HPLC-Eluat bei Atmosphärendruck zerstäubt und ionisiert wird.

Der generelle Aufbau eines Massenspektrometers besteht aus der *Probenzuführungseinheit*, von der aus die Analyten in die *Ionenquelle* gelangen, in der es auf verschiedene Arten zur Ionisation kommt. Die am meisten eingesetzte Ionisationsmethode ist die ESI-Methode (Elektrospray-Ionisation), bei der die Probe im Lösungsmittel durch eine Kapillare in die Ionenquelle geleitet wird und mittels eines angelegten elektrischen Feldes fein zerstäubt wird. Das Lösungsmittel wird so lange abgedampft, bis positive oder negative Analyt-Ionen zurückbleiben. Für die Probe wurde einerseits der Modus der Erhaltung von Molekülionen als auch Fragmentierungsschritte angewendet. Die Fragmentierung geschah in der als Massenanalysator gewählten Ionenfalle (ion trap), in der die Ionen für kurze Zeit auf elektrischen oder magnetischen Kreisbahnen gehalten werden und bei Bedarf durch Kollision mit inerten Edelgasmolekülen fragmentiert werden können.

Die gebildeten Ionen gelangen durch ein elektrisches Potential in den *Massenanalysator*, der die Aufgabe hat, die Ionen im Gemisch entsprechend ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) aufzutrennen. Demnach gelangen nur ausgewählte Substanzen zum *Massendetektor* mit anschließender Datenverarbeitung [10].

### 3.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie (engl. thin layer chromatography, TLC) ist eine Methode zur Auftrennung von Substanzen im Gemisch und deren qualitative und quantitative Analyse. Die stationäre Phase bildet ein Sorbens wie zum Beispiel Kieselgel, das als dünne Schicht an einen Träger angebracht ist. Als Träger werden häufig Glasplatten oder Aluminium-Folien verwendet. Verschiedene Fließmittel bieten sich als mobile Phase an, die in einer Entwicklungskammer enthalten sind. Die Analysesubstanzen werden in der Regel band- oder strichförmig auf einer Startfront aufgetragen und mittels der mobilen Phase bis zur Fließmittelfront entwickelt, wobei vor allem Verteilungs- bzw. Adsorptionsvorgänge für die Trennung verantwortlich sind. Nach der Entwicklung erhält man ein inneres Chromatogramm, die Substanzen werden also nicht wie bei der HPLC eluiert, sondern können direkt auf der DC-Platte detektiert und analysiert werden. Eine wichtige Kenngröße in der DC ist der  $R_f$ -Wert, der die Wanderung der Substanzonen charakterisiert und somit zur Analyse herangezogen werden kann [8,9].

Die im Vergleich zu anderen chromatographischen Verfahren eher schlechte Trennleistung konnte durch die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC, engl. high performance thin layer chromatography) verbessert werden, die sich durch einen kleineren Teilchendurchmesser des Sorbens und engere Korngrößenverteilung auszeichnet [9].

## 4. Ergebnisse

### 4.1 HPLC-Methodenentwicklung zur Erstellung eines „fingerprint“-Chromatogramms

Zunächst sollte versucht werden, ein „fingerprint“-Chromatogramm für Isorel® zu erhalten, wo eine möglichst gute Auftrennung aller Komponenten in möglichst kurzer Zeit erzielt werden kann. Diese Analysen erfolgten anhand des Präparates Isorel®M60 und die Parameter der ersten Methode wurden willkürlich gewählt, um vorerst einen groben Überblick über die Komponenten des Mistelauszuges zu erhalten. Dafür wurden 200 µl der Probelösung mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und unverdünnt zur Injektion bereitgestellt.

#### **Methode\_1:**

Eluent A: Aqua dest. (0,1% Ameisensäure)

Eluent B: Acetonitril (0,1% Ameisensäure)

Flussrate: 0,4 ml/min

Injektionsvolumen: 5 µl

Säulenofentemp.: 25°C

Detektion: 254 nm

Gradientenelution:

min	Eluent B	
0,1	3%	
60,0	95%	
60,1	95%	(Spülung)
70,0	95%	
70,1	1%	(Äquilibrierung)
80,0	1%	

Vorsäule: Acclaim™ 120 C18, 5µm, 120A, 2x10mm

Säule: Acclaim™ 120 C18, 3µm, 120A, 2,1x150mm

Da es sich bei allen Isorel®-Präparaten um einen wässrigen Extrakt handelt, war anzunehmen, dass dieser vor allem polare Inhaltsstoffe enthält und diese durch die anfänglich hohe Konzentration des

polaren Wassers im Fließmittelgemisch bereits zu Beginn eluiert würden. Tatsächlich sah man im Chromatogramm, dass die meisten Substanzen bereits bei etwa 50% Eluent B registriert wurden.

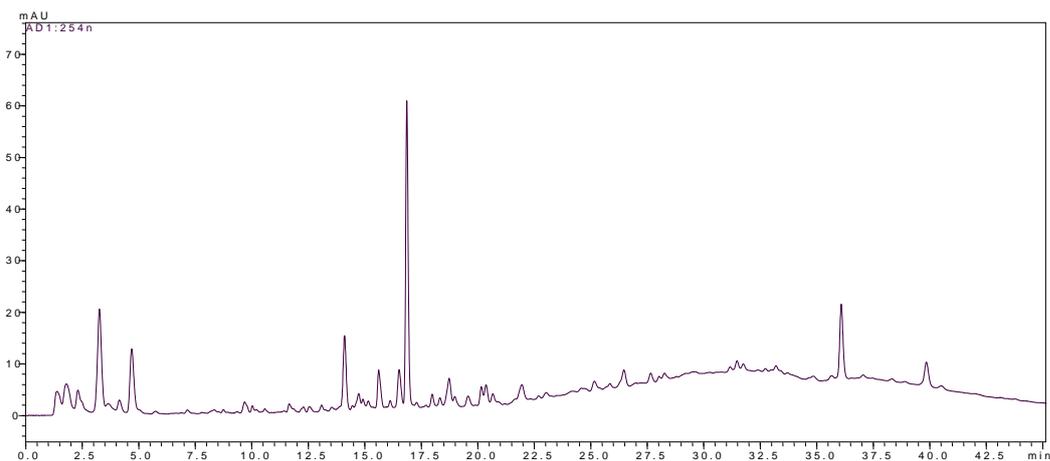
Um die Auftrennung zu verbessern, wurde die Methode demnach so verändert, dass die Endkonzentration des Eluenten B als auch die Steigung des Gradienten in etwa halbiert wurde (*Methode\_2*).

**Methode\_2<sup>1</sup>:**

Gradientenelution:

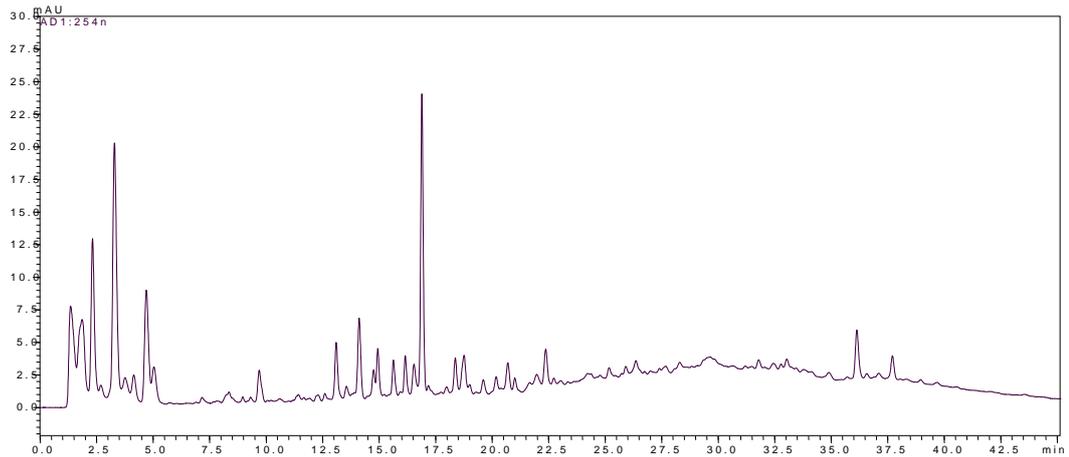
min	Eluent B
0,1	1%
60,0	50%
60,1	95% (Spülung)
70,0	95%
70,1	1% (Äquilibration)
80,0	1%

Die Probelösungen von Isorel®A60, Isorel®M60 und Isorel®P60 wurden injiziert und mit den Parametern von *Methode\_2* analysiert (s. Abb. 5-7).

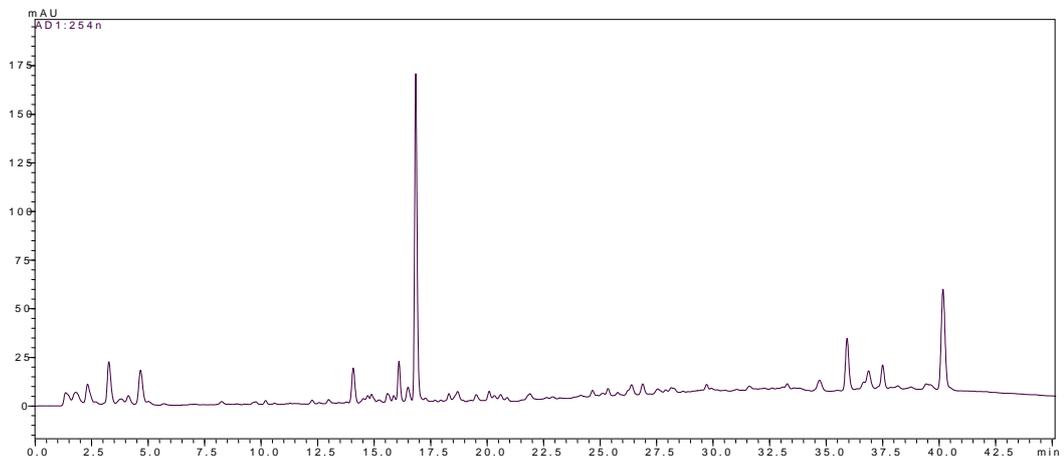


**Abb.5.** Chromatogramm von Isorel®A60 (*Methode\_2*)

<sup>1</sup> Die übrigen Parameter sind aus **Methode\_1** zu entnehmen.



**Abb.6.** Chromatogramm von Isorel®M60 (*Methode\_2*)



**Abb.7.** Chromatogramm von Isorel® P60 (*Methode\_2*)

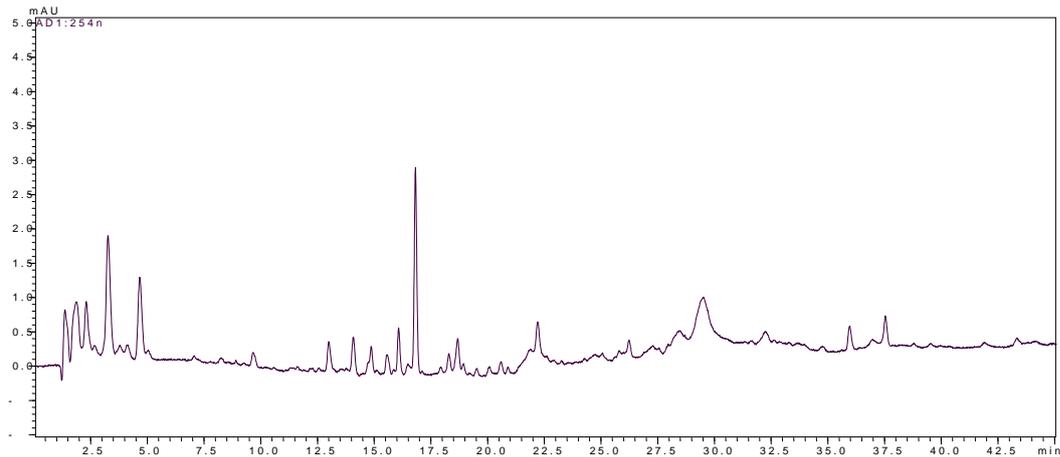
Beim Vergleich der drei Präparate konnte festgestellt werden, dass eine markante Peakgruppe bei allen drei Chromatogrammen zwischen Minute 1 und 6 detektiert wurde und der deutlich größte Peak ebenfalls überall um Minute 16 zu erkennen war. Er zeigte bei Isorel®P60 die stärkste Intensität im Vergleich zu Isorel®A60 und Isorel®M60, die annähernd vergleichbar waren.

Im Weiteren sollte unter Verwendung dieser Methode untersucht werden, ob die Größe der Peakflächen zu den unterschiedlichen Konzentrationen beziehungsweise Stärken der gleichen Präparate proportional ist. Der Vergleich erfolgte anhand von Isorel®M6, M24 und M60 (Abb. 8-10) und zeigt, dass zwischen der Stärke 6 und 60

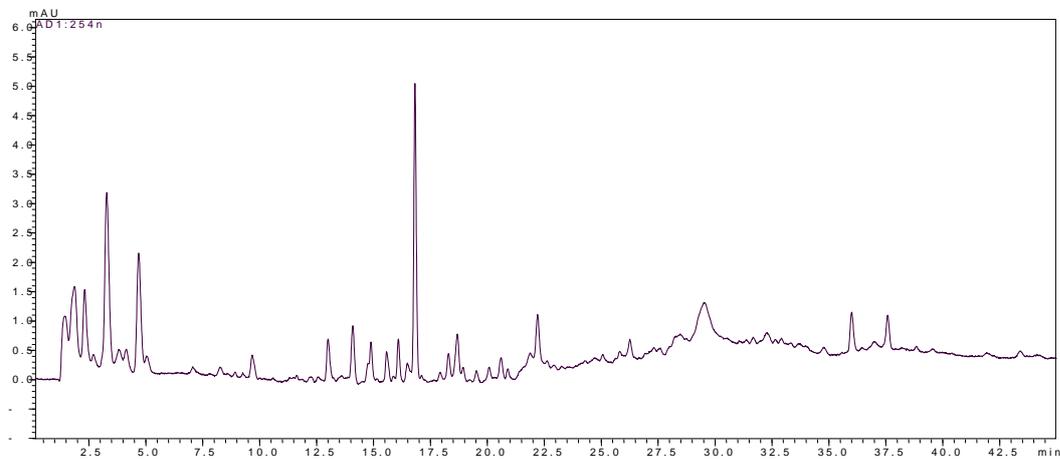
## Ergebnisse

eine gute Korrelation zwischen Konzentration und Peakflächen besteht. Bei der Stärke 24 ist das Signal zwar nicht um genau das 4-fache intensiver als bei Stärke 6, jedoch sind die Peakflächen im Vergleich doch deutlich größer.

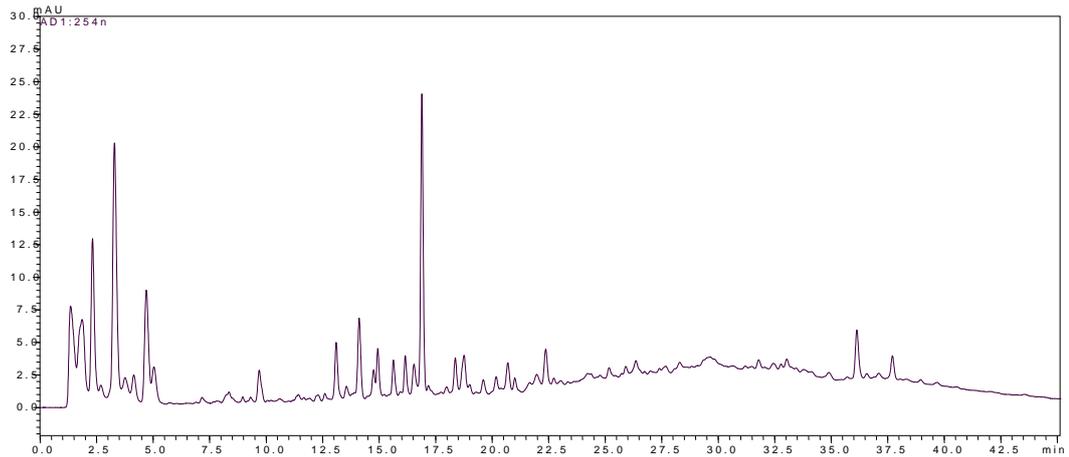
Die Chromatogramme zeigten eine ausgezeichnete Übereinstimmung der Komponenten und Retentionszeiten.



**Abb.8.** Chromatogramm von Isorel®M6 (*Methode\_2*)



**Abb.9.** Chromatogramm von Isorel®M24 (*Methode\_2*)



**Abb.10.** Chromatogramm von Isorel®M60 (*Methode\_2*)

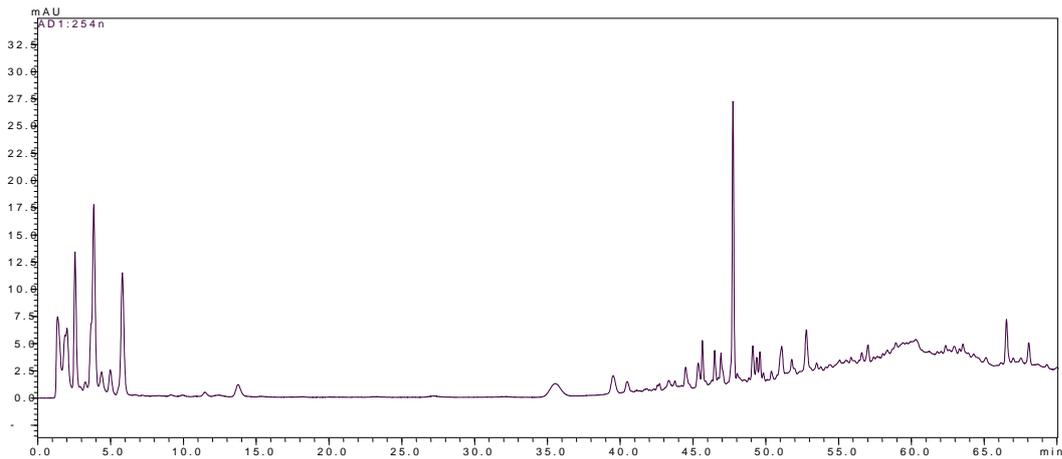
Zur besseren Auftrennung der polaren Substanzen in den ersten fünf Minuten im Chromatogramm wurde versucht, einen isokratischen Schritt mit 100% Eluent A einzuführen (*Methode\_3*).

***Methode\_3:***

Isokratische Elution/Gradientenelution:

min	Eluent B
0,1	0%
30,0	0%
30,1	1%
90,0	50%
90,1	95% (Spülung)
100,0	95%
100,1	1% (Äquilibrierung)
110,0	1%

Diese Methode stellte sich jedoch als wenig zielführend heraus, da die markante Peakgruppe unverändert zur gleichen Zeit eluiert wurde (Abb. 11) wie bei *Methode\_2*, weshalb *Methode\_3* verworfen wurde.



**Abb.11.** Chromatogramm von Isorel® M60 (*Methode\_3*)

Es folgte ein weiterer Schritt im Versuch zur Optimierung der Methode, um die früh eluierten Inhaltsstoffe besser aufzutrennen (*Methode\_4*).

***Methode\_4:***

Isokratische Elution/Gradientenelution:

min	Eluent B
0,1	1%
10,0	1%
10,1	1%
60,0	25%
60,1	95% (Spülung)
75,0	95%
75,1	1% (Äquilibration)
90,0	1%

Das erhaltene Chromatogramm der für diesen Versuch gewählten Probe Isorel®M60 zeigte in Bezug auf die Auftrennung der ersten großen Peakgruppe keine signifikante Verbesserung, und auch die zweite interessante Peakgruppe um Minute 16 erschien unverändert.

Mit den bisherigen Erkenntnissen sollte versucht werden, die Methode so kurz wie möglich zu halten. Die Konzentration des Fließmittels und die Gradientenzeit wurden so gewählt, dass alle markanten

Inhaltsstoffe eluiert wurden und auch die Zeiten für Spülung und Äquilibration wurden der verwendeten Säule angepasst (*Methode\_5*).

**Methode\_5:**

Gradientenelution:

min	Eluent B	
0,1	1%	
25,0	20%	
25,1	95%	(Spülung)
35,0	95%	
35,1	1%	(Äquilibration)
50,0	1%	

Neben der Veränderung des Fließmittelgradienten wurden auch weitere Möglichkeiten zur Verbesserung der Trennleistung in Betracht gezogen und so erfolgte eine Veränderung der Flussrate auf 0,35, 0,45 und 0,5 ml/min, die ebenfalls mit dieser Säule kompatibel sind. Jedoch erwies sich die bisherige Verwendung von einer Flussrate von 0,4 ml/min als optimale Fließgeschwindigkeit und wurde folglich beibehalten.

Es wurden auch andere stationäre Phasen getestet, die möglicherweise weitere Wechselwirkungen vor allem mit polaren Komponenten zeigen könnten. Folgende andere Säulenvariationen wurden dafür verwendet:

Säule\_II: Acclaim™ 120 C8 3µm 120A 2,1x150mm

Vorsäule\_II: Acclaim™ 120 C8 5µm 120A 2x10mm

Säule\_III: Acclaim™ Polar Advantage II C18 3µm 120A 2,1x150mm

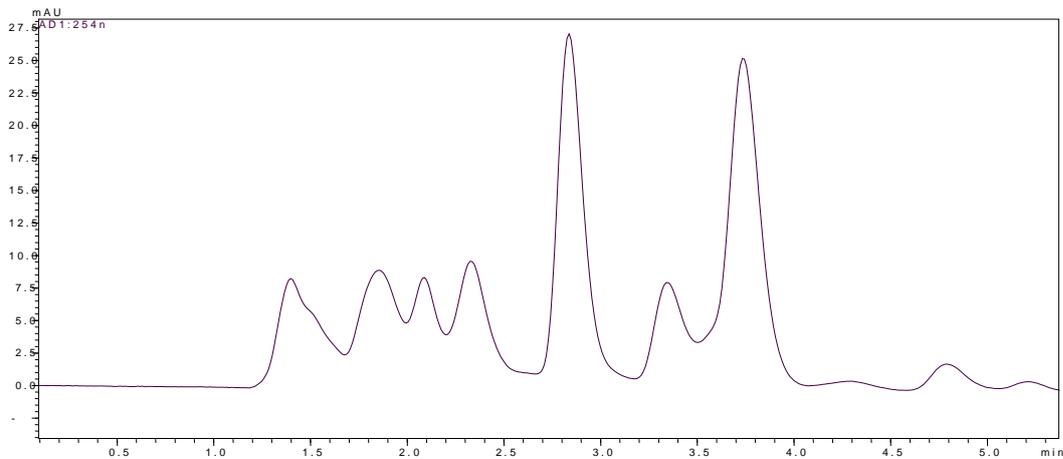
Vorsäule\_III: Acclaim™ Polar Advantage II C18 3µm 120A 2,1x150mm

Die Säule\_II mit der C8-Umkehrphase sollte den Vergleich bringen, ob die Modifizierung des Materials der stationären Phase zu C18 oder zu C8 einen besseren Einfluss auf die Trennleistung hat.

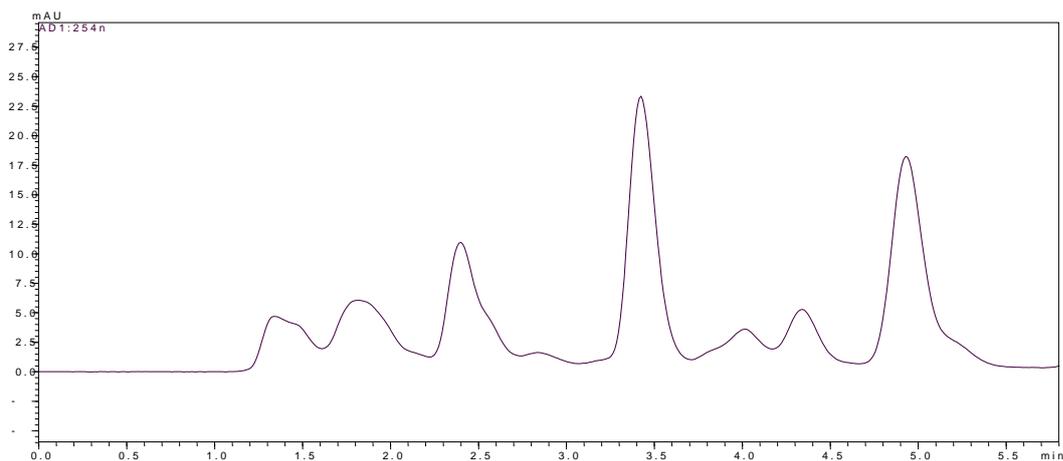
## Ergebnisse

Von Säule\_III wurde erhofft, dass aufgrund der Einbringung zusätzlicher polarer Gruppen in der stationären Phase bessere Wechselwirkungen vor allem mit den früh eluierten Analyten stattfinden würden.

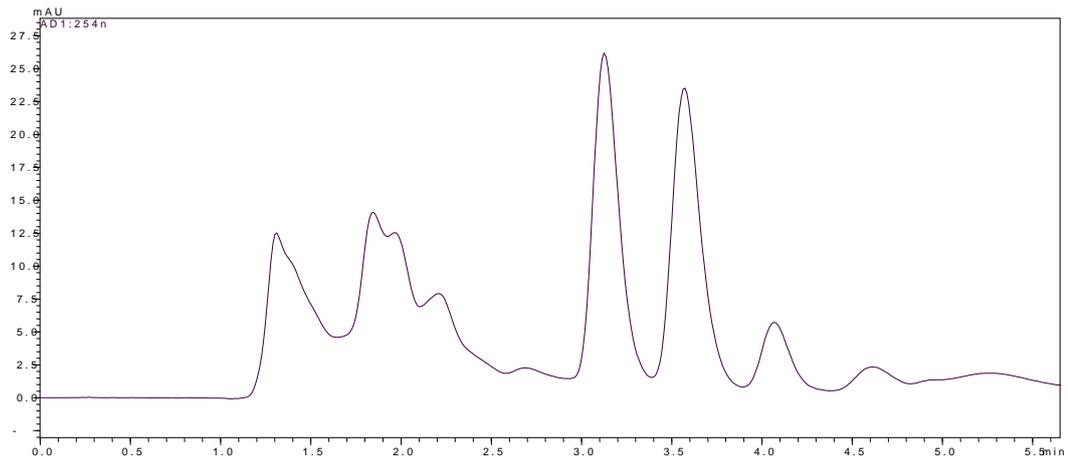
Die Säulen wurden untereinander verglichen, wobei verschiedene Gradienten angewendet wurden. Besonders wichtig erschien der Vergleich der Methode mit der Kombination isokratische Elution/Gradientenelution, da sich hier die spezielle Modifizierung der „Polar Advantage“-Säule beweisen sollte.



**Abb.12.** Chromatogramm von Isorel@P60 mit C8-Säule



**Abb.13.** Chromatogramm von Isorel@P60 mit C18-Säule



**Abb.14.** Chromatogramm von Isorel®P60 mit C18-Säule Polar Advantage

Aus den Abbildungen 12-14 geht hervor, dass die verschiedenen stationären Phasen keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf die Trennleistung haben. Im Bereich von 0-5 Minuten war keine wesentliche Veränderung (zusätzliche Peaks) zu sehen, das übrige Chromatogramm zeigte kaum Veränderungen im Vergleich zur bisher verwendeten C18-Säule. Deshalb wurde weiterhin dieses Material verwendet, wobei ein wichtiges Auswahlkriterium war, dass die bisher verwendete „normale“ C18 Säule als sehr häufig verwendete stationäre Phase am ehesten in Labors zur Qualitätssicherung zu finden ist.

Die finale Methode wurde schlussendlich nach vielen weiteren kleinen Änderungen der Parameter und Versuchen der Optimierung erstellt und konnte somit für die Analyse der Isorel®-Proben eingesetzt werden (Abb. 15).

### ***Methode\_final:***

Vorsäule: Acclaim™ RSLC 120 C18 5µm 120A 2x10mm  
(Thermo Scientific)

Säule: RP-C18, 3µm, 120A, 2,1x150mm

Eluent A: Aqua bidest. (0,1% Ameisensäure)

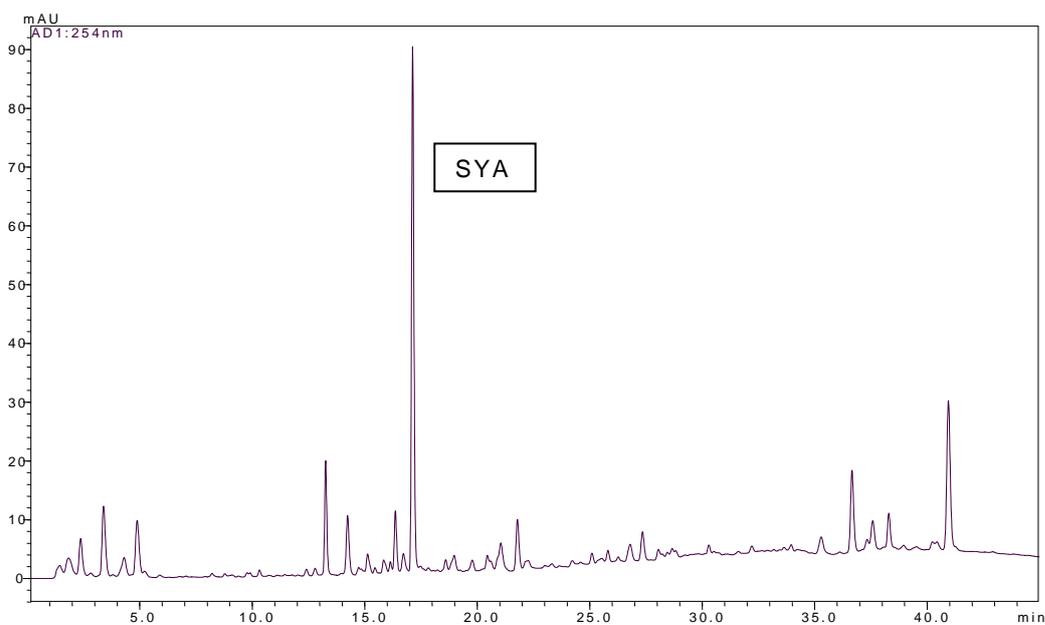
Eluent B: Acetonitril, HPLC-Qualität  
(0,1% Ameisensäure)

Flussrate: 0,40 ml/min

## Ergebnisse

Injektionsvolumen: 5 µl  
Säulenofentemperatur: 25°C  
Detektion: 254 nm  
Gradientenelution:

min	Eluent B
0,1	1%
45,0	37%
45,1	95% (Spülung)
55,0	95%
55,1	1% (Äquilibrierung)
70,0	1%



**Abb.15.** Chromatogramm von Isorel®P60 (*Methode\_final*)

Für die Analyse von allen Isorel®-Produkten galt es ebenso zu testen, ob auch für die kleinste Konzentration, Stärke 1, ein gut analysierbares Chromatogramm mit reproduzierbaren Peakflächen erhalten werden konnte. Dies wurde für alle drei Arten untersucht, mit dem Ergebnis, dass teilweise zu kleine Peaks, die nicht

reproduzierbar integriert werden konnten, erhalten wurden. Diese Proben mussten dementsprechend aufkonzentriert werden.

*Probenaufbereitung von Isorel® Stärke 1:*

Zur Aufkonzentrierung der Stärke 1 von Isorel® A, Isorel® M und Isorel® P wurde 1 ml aus der Stammlösung entnommen und im Lösungsmittel Evaporator bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 µl destilliertem Wasser aufgenommen und im Ultraschallbad vollständig gelöst. Der Gehalt in der Lösung wurde somit um den Faktor 10 erhöht. Damit konnten gut auswertbare Peakflächen erhalten werden.

## **4.2 Versuche zur Identifizierung der Inhaltsstoffe in**

### **Isorel®-Produkten**

Nach der Entwicklung einer geeigneten HPLC-Methode galt es, Inhaltsstoffe zu identifizieren, die als Leitsubstanzen für die Analyse und zur Qualitätskontrolle der Isorel®-Präparate dienen konnten.

#### **4.2.1 LC-MS Analyse von Isorel®**

Zur Analyse der Isorel®-Lösung wurde die finale HPLC-Methode angewendet. Gewählt wurde Isorel®M60, wobei angenommen wurde, dass aufgrund des sehr ähnlichen Spektrums im HPLC-fingerprint-Chromatogramm die Inhaltsstoffe in den verschiedenen Isorel®-Produkten ähnlich sind.

#### Auswertung des Massenspektrums:

Als Hauptpeak (bei 17 Minuten) im HPLC-Chromatogramm konnte das Phenylpropanderivat Syringenin-4'-O-[apiosyl(1→2)]glucosid (SYA, Abb.17) identifiziert werden. Es zeigte im ESI neg. MS einen Quasimolekülionenpeak  $[M-H]^-$  von m/z 503,1. Im MS 2 war infolge der Fragmentierung die Abspaltung der Zucker erkennbar (-162 amu

Glucose, -132 amu Apiose), wobei Syringenin (m/z 209,1) gebildet wurde. Im MS 3 wurde auf eine Methylgruppenabspaltung (209,1→194,1) geschlossen (Abb. 18).

Als weiterer Inhaltsstoff konnte im HPLC-Chromatogramm bei 16 Minuten Syringenin-4'-O-glucosid (syn. Syringin, Syringosid, Eleutherosid B, Abb. 16) bestätigt werden. Syringin ist als Referenzsubstanz erhältlich, die natürlich im Chromatogramm ebenfalls bei 16 Minuten eluierte. Syringin (SY) und Syringenin-apiosyl-glucosid (SYA) sind aus der Literatur als typische Phenylpropanderivate in der Mistel bekannt. Da SYA auch die Hauptkomponente im Chromatogramm von Isorel® darstellte, wurde diese Verbindung als Leitsubstanz für die Qualitätskontrolle ausgewählt.

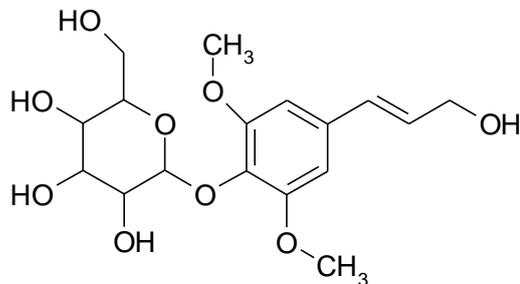


Abb.16. Syringenin-4'-O-glucosid

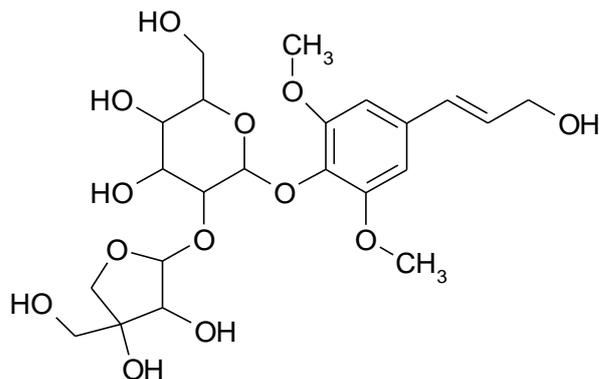
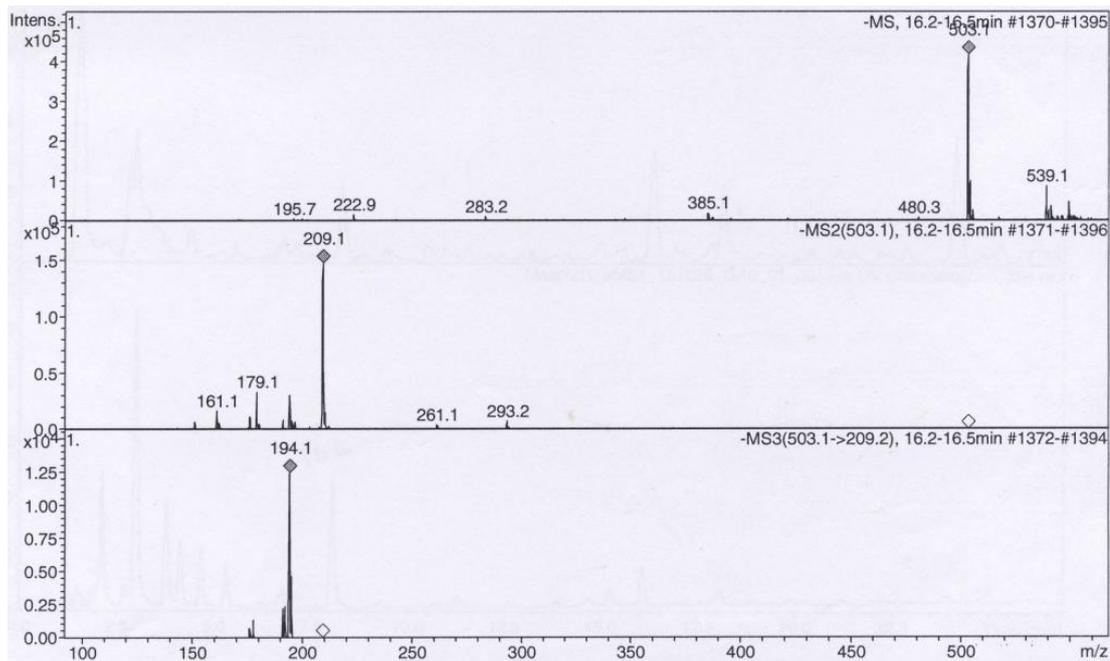


Abb.17. Syringenin-4'-O-[apiosyl(1→2)]glucosid



**Abb.18.** Massenspektren von Syringenin-4'-O-[apiosyl(1→2)]glucosid

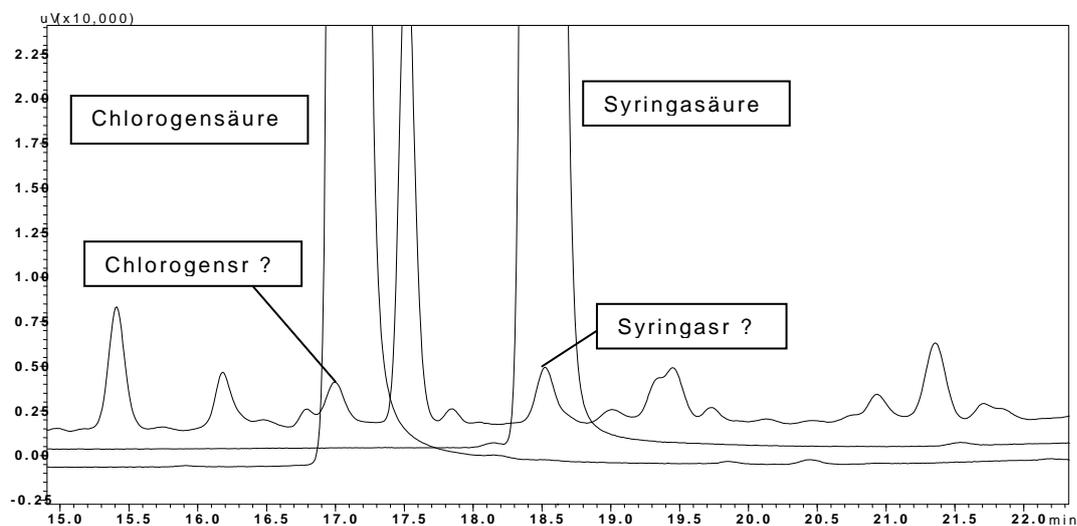
Im Bereich zwischen 35 und 45 Minuten wurden an Hand der Massenspektren Flavonoide mit Molekulargewichten im Bereich von 300-400 festgestellt, die ebenfalls bereits als Inhaltsstoffe in der Mistel bekannt sind. Die Peakflächen waren jedoch klein und entsprechende Reinsubstanzen als Referenz nicht erhältlich, weshalb diese Inhaltsstoffe als Leitsubstanzen für die Qualitätskontrolle der Präparate ausgeschlossen wurden.

Bei der LC-MS wurden im Bereich von 17 bis 20 Minuten Hinweise auf das Vorliegen von Phenylacrylsäuren gefunden. Quellen aus der Literatur gaben an, welche für die Mistel typisch sind: Anissäure, Chlorogensäure, Ferulasäure, Kaffeesäure, Sinapinsäure, Syringasäure [1].

Zur Identifizierung wurde von diesen Substanzen je 1 mg in 1 ml 0,1% Ameisensäure gelöst und als Referenzlösungen mit der finalen Methode analysiert.

Zum Vergleich der Referenzsubstanzen mit der Probe Isorel®M60 wurden die Chromatogramme übereinandergelegt und es konnte festgestellt werden, dass sich sowohl der Chlorogensäure-Peak als auch der Peak der Syringasäure überlappten und es sich daher wahrscheinlich um diese Substanzen in Isorel® handelte. Da diese

beiden Peaks im Chromatogramm von Isorel® nur sehr klein waren, eigneten sich diese Verbindungen allerdings nicht als Leitsubstanzen (s. Abb. 19).



**Abb. 19.** Chromatogramm von Phenylpropanderivaten in Isorel®M60

Aus der Literatur ist ja auch das Vorliegen von Aminosäuren und biogenen Aminen in der Mistel bekannt, die aufgrund ihrer Polarität am Beginn des Chromatogramms eluiert würden. Zunächst wurde versucht, Aminosäuren mittels DC zu identifizieren, bzw. das Vorkommen bestimmter Aminosäuren in Isorel® auszuschließen.

Welche Aminosäuren in *V. album* in ihrem Vorkommen bereits bestätigt wurden und die Möglichkeiten zur Analyse und der dazu gehörigen Detektion mittels DC konnte aus der Literatur entnommen werden [11].

### Parameter der HPTLC:

Platte:	10x10cm
Stationäre Phase:	KG 60
Mobile Phase:	n-Butanol-Aceton-Eisessig-Wasser (35:35:10:20)
Startfront:	1cm
Fließmittelfront:	1cm
Laufzeit:	70 min

Standard: Threonin, Lysin, Serin, Tyrosin (DC 1)  
Asparaginsäure, Leucin, Prolin, Valin (DC 2)  
Probe: Isorel®A60, Isorel®M60, Isorel®P60 (DC 1 und 2)  
Auftragevolumina: 5 µl Standard  
20 µl Probe  
Sprühreagenz: Ninhydrin-Reagenz

*Herstellung des Standards:*

Etwa 1 mg der jeweiligen Aminosäure wurde in circa 1 ml eines Gemisches aus 0,1%igem Ameisensäurem Wasser und Methanol dest. (50+50) gelöst.

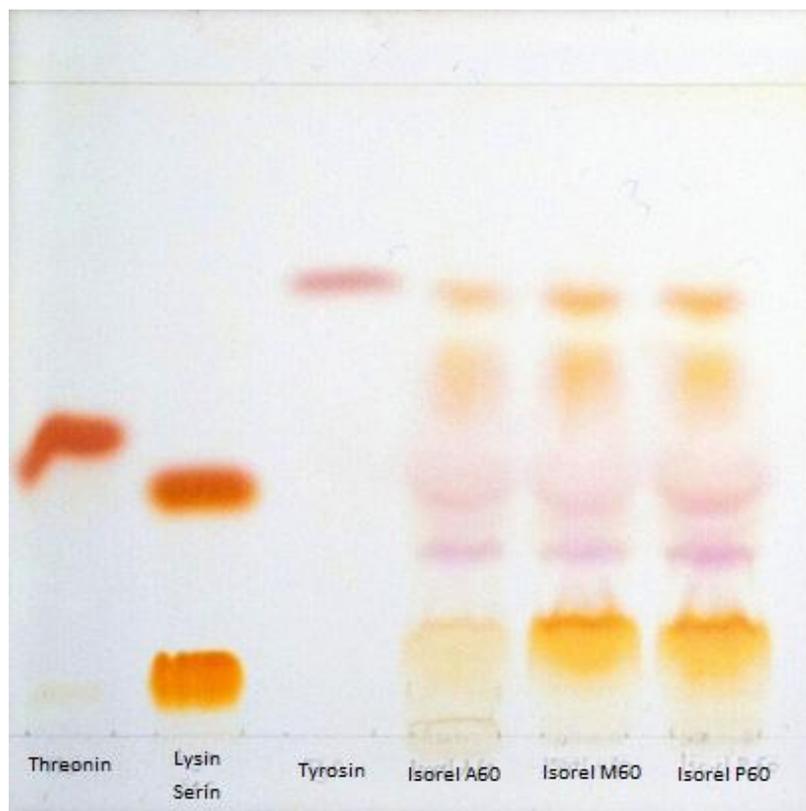
*Herstellung des Sprühreagenzes:*

30 mg Ninhydrin wurden in 10 ml n-Butanol gelöst und mit 0,3 ml 98%iger Essigsäure versetzt.

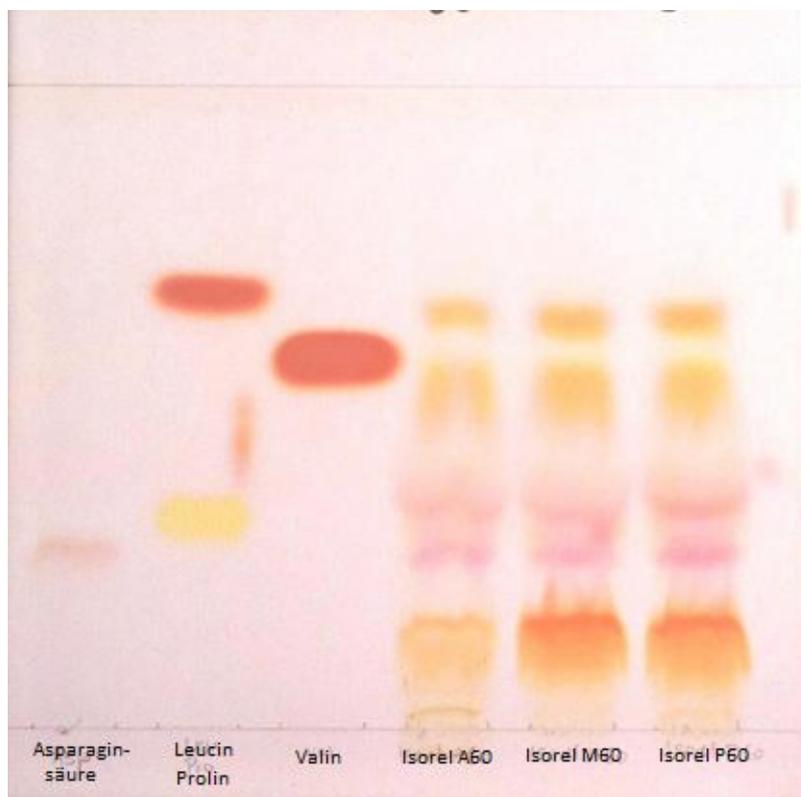
Durchführung:

Die direkt aus den Ampullen entnommenen Isorel®-Proben und die Standards wurden bandförmig mit Hilfe von Mikropipetten aufgetragen. Nach der Entwicklung des Dünnschichtchromatogramms wurde das vollständige Verdampfen des Lösungsmittels abgewartet. Anschließend wurde die Platte mit 5 ml des Ninhydrin-Reagenzes besprüht und 5 Minuten bei 100°C erhitzt. Die nun gefärbten Banden konnten somit ausgewertet werden.

Anhand der ähnlichen Lage und Färbung der Banden wurde das Vorliegen von Serin und Tyrosin vermutet, eine eindeutige Identifizierung konnte jedoch bei keiner Aminosäure erfolgen (s. Abb. 20 und 21). Es mussten spezifischere Methoden herangezogen werden.



**Abb. 20.** Dünnschichtchromatogramm 1 von Aminosäuren und Isorel®



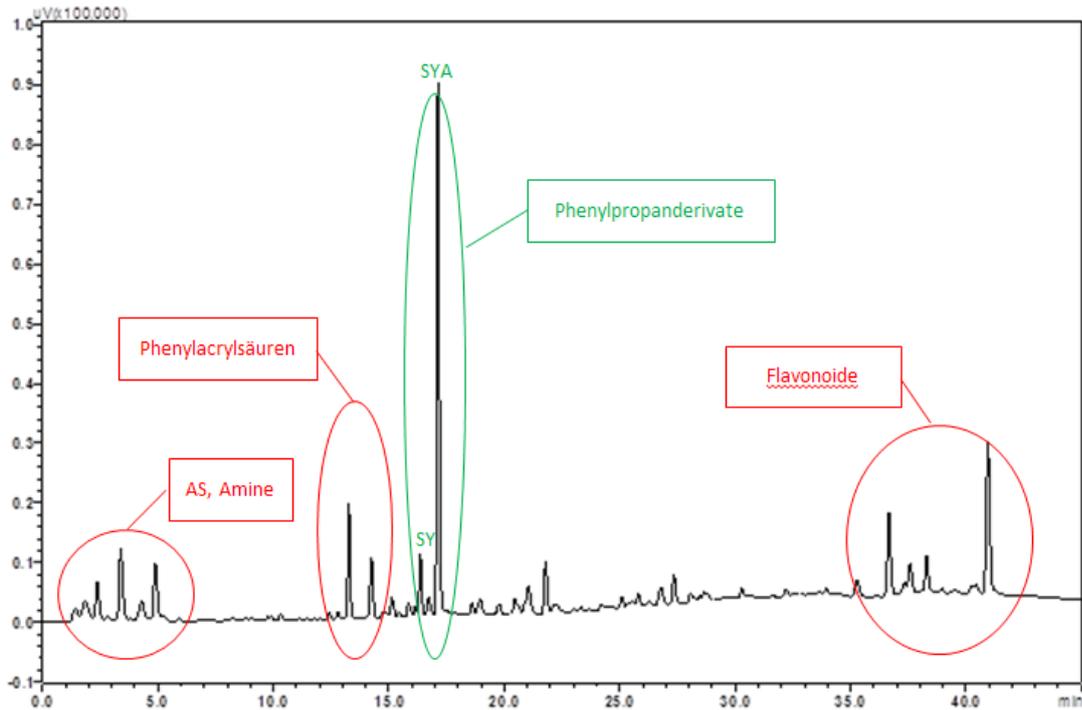
**Abb. 21.** Dünnschichtchromatogramm 2 von Aminosäuren und Isorel®

Eine geeignetere Methode für den Nachweis von Aminosäuren bot die HPLC. Dafür wurde die Probe Isorel®M60 und folgende Aminosäuren als Referenzen analysiert: Asparaginsäure, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin und Valin.

Das Chromatogramm wurde mit der *Methode\_final* erstellt. Die Analyse erfolgte bei 190nm bzw. 220nm, da die Aminosäuren bei dieser Wellenlänge die beste Absorption zeigten. Es gab jedoch nur Hinweise auf das Vorkommen von Aminosäuren in Isorel®, eine eindeutige Identifizierung konnte nicht erfolgen. Eine Überlagerung von anderen Isorel®-Inhaltsstoffen, vermutlich biogene Amine, die ebenfalls bekannte Inhaltsstoffe in der Mistel sind, störten die Trennung, wodurch eine eindeutige Bestätigung nicht möglich war.

Durch diese Untersuchungen konnten im fingerprint-Chromatogramm von Isorel® einzelne Substanzen bzw. Substanzgruppen eindeutig zugeordnet werden: Aminosäuren und biogene Amine, Phenylacrylsäuren, Phenylpropanderivate mit Syringin und Syringin-apiosyl-glucosid und Flavonoide (Abb. 22).

Der Vergleich der einzelnen Isorel®-Arten (Isorel®A, Isorel®M, Isorel®P) hat ja bereits gezeigt, dass diese Peakgruppen in allen drei Arten vorhanden sind, allerdings mit unterschiedlichen Konzentrationen. Die Zuordnung der Substanzen zeigte, dass es sinnvoll ist, die typischen Phenylpropanderivate SYA (Hauptpeak in allen Chromatogrammen) bzw. SY als Leitsubstanz für die Qualitätskontrolle heranzuziehen.



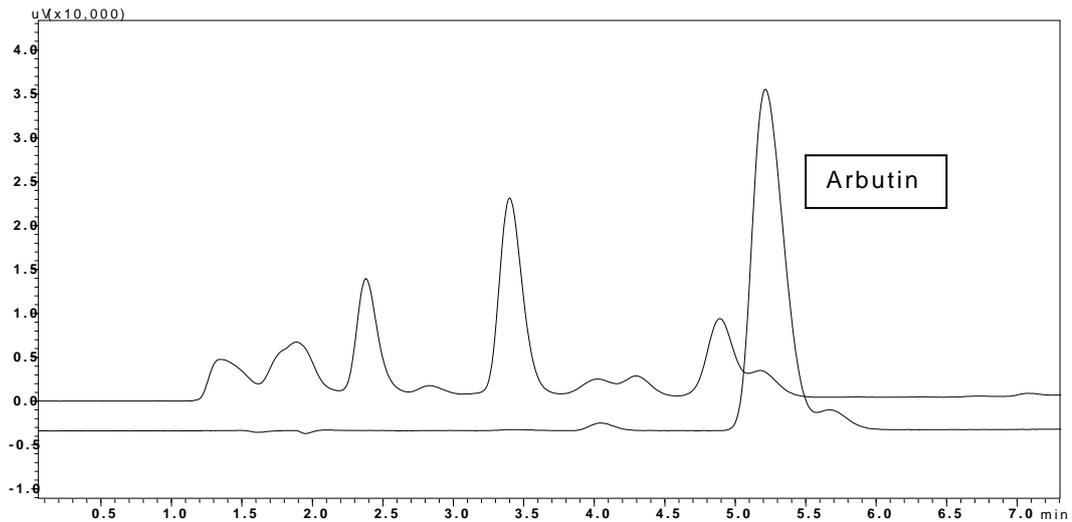
**Abb.22.** Zuordnung der Substanzklassen am Beispiel von Isorel® P60

## 4.3 Interner Standard und Referenzsubstanz

### 4.3.1 Interner Standard

Zur exakten Quantifizierung der Leitsubstanzen SYA und SY musste ein geeigneter interner Standard gefunden werden, der an einer Stelle im Chromatogramm eluiert, wo keine anderen Substanzen zu sehen sind. Zuerst wurde eine wässrige 0,1%ige Arbutin-Lösung verwendet und mit der finalen HPLC-Methode analysiert.

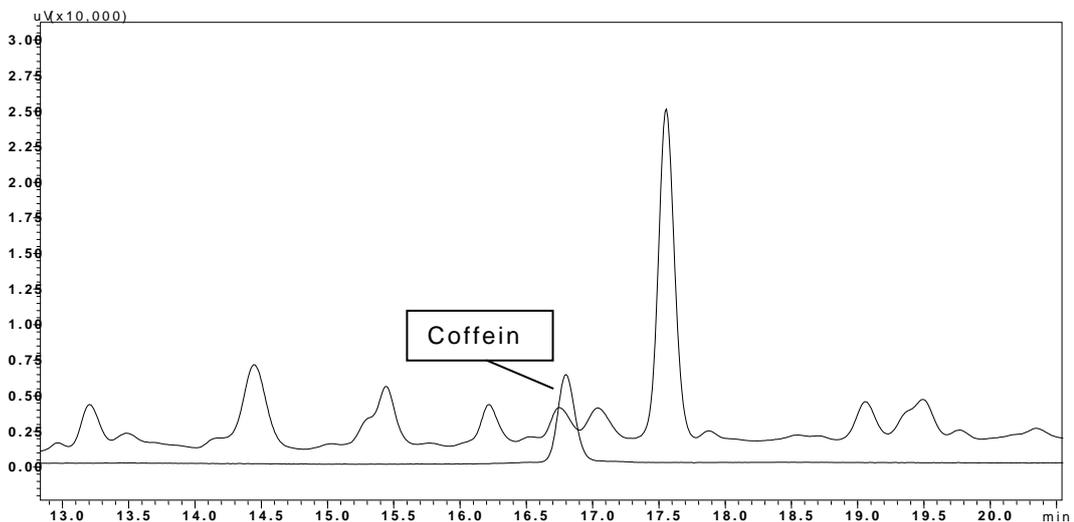
## Ergebnisse



**Abb.23.** Chromatogramm von Arbutin (untere Spur) und Isorel®M60 (obere Spur)

Abbildung 23 zeigt, dass sich Arbutin für den Einsatz als Interner Standard nicht eignet, da sich der Peak bei Minute 5 mit der ersten großen Peakgruppe in Isorel®M60 überschneidet.

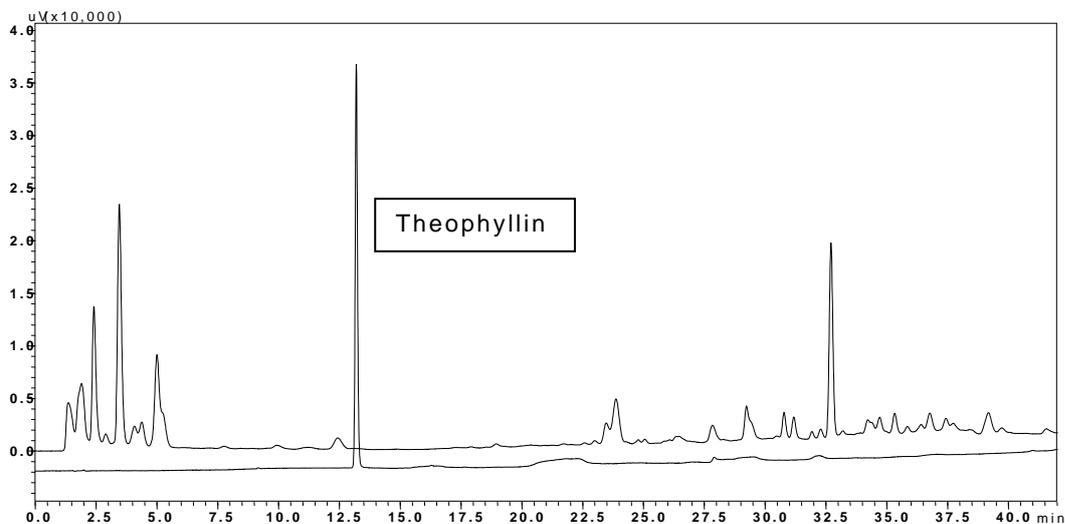
Als nächstes wurde Coffein getestet. Dafür wurde eine 0,003%ige wässrige Lösung von Coffein verwendet und mit Isorel®M60 verglichen.



**Abb.24.** Chromatogramm von Coffein (untere Spur) und Isorel®M60 (obere Spur)

In Abb. 24 kann man erkennen, dass der Peak von Coffein inmitten der zweiten interessanten Peakgruppe von Isorel® auftritt und somit auch nicht verwendet werden konnte.

Der nächste Versuch fand mit Theophyllin statt, da diese Substanz im Vergleich zu Coffein eine Methylgruppe weniger enthält und somit stärker polar ist. Es wurde daher erwartet, dass Theophyllin früher eluiert und der Peak im Chromatogramm in keine der zu bestimmenden Peakgruppen fallen würde.



**Abb.25.** Chromatogramm von Theophyllin (untere Spur) und Isorel®M60 (obere Spur)

Zur Überprüfung wurde das Theophyllin-Chromatogramm mit dem von Isorel®A60, Isorel®M60 und Isorel®P60 verglichen. Der Peak lag zwischen den ersten beiden interessanten Peakgruppen und war als Interner Standard daher gut geeignet, was das Beispiel von Isorel®M60 in Abb. 25 zeigt.

### *Herstellung der Lösung des Internen Standards:*

Die Konzentration des Internen Standards sollte so gewählt werden, dass die Peakgröße zwischen dem kleinsten Peak der Leitsubstanz SYA (Syringenin-apiosyl-glucosid) in den schwächsten Stärken und dem größten Peak von SYA in Stärke 60 liegt.

Dazu wurde auf der Analysenwaage eine willkürliche Einwaage von 1,15 mg der Theophyllin-Reinsubstanz gemacht und in 10 ml

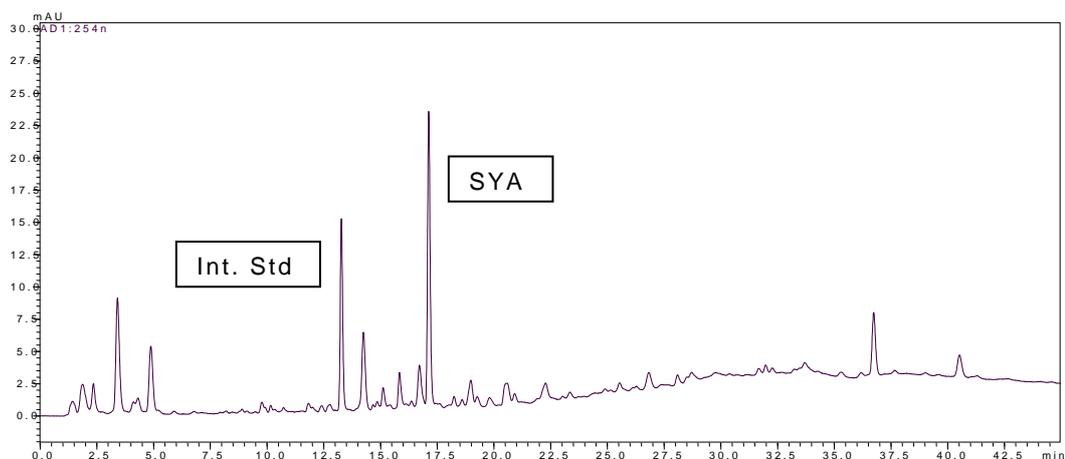
0,1%igem Ameisensäurem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde eingespritzt und die Intensität des Peaks mit der des Leitpeaks im Chromatogramm von Isorel®M60 verglichen. Da die Peakfläche jedoch zu groß war, musste die Theophyllin-Lösung 1:10 verdünnt werden.

Diese Lösung wurde eingespritzt und der Peak von Theophyllin mit dem Leitpeak im Chromatogramm von Isorel®M60 und Isorel®M6<sup>2</sup> verglichen.

Diese Konzentration (1:10) stellte sich als geeignet heraus und dementsprechend wurde nun diese Lösung von Theophyllin den Probelösungen zugesetzt und analysiert. Dazu wurden 100 µl der Theophyllin-Lösung mit 100 µl des Isorel®P1-Extraktes vermischt und der Analyse unterzogen. Derselbe Vorgang wurde mit Isorel®P60 wiederholt. Damit sollte überprüft werden, ob die Konzentration sowohl für die niedrigste als auch für die höchste Stärke verwendet werden kann.

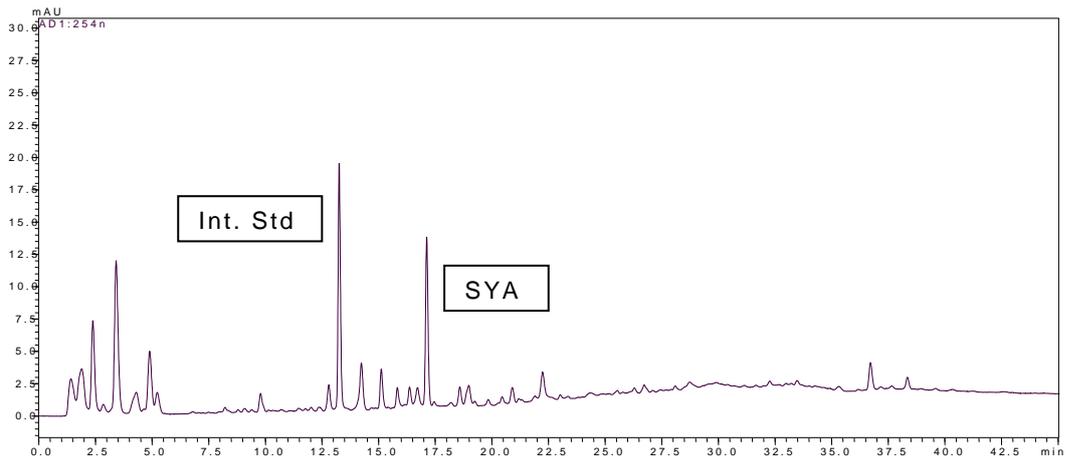
Die Anforderungen zur Wahl des Internen Standards und seiner Konzentration wurden erfüllt und Theophyllin erwies sich mit der Konzentration von etwa 10 µg/ml (0,001%) zur Analyse und Gehaltsbestimmung der Leitsubstanzen als geeignet.

Die Abbildungen 26-28 zeigen Chromatogramme von Lösungen des Internen Standards in Isorel®A60, M60 oder P60 im gleichen Verhältnis.

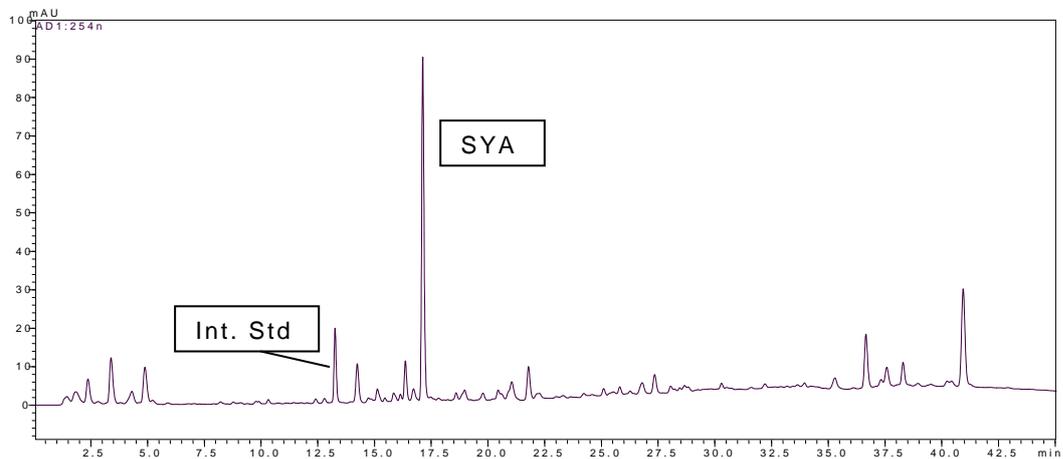


**Abb.26.** Chromatogramm von Isorel®A60 mit Internem Standard (Theophyllin)

<sup>2</sup> Stärke 6 wurde hier als schwächste Stärke herangezogen, da Stärke 1 nur 10-fach aufkonzentriert erfassbar war.



**Abb.27.** Chromatogramm von Isorel®M60 mit Internem Standard (Theophyllin)



**Abb.28.** Chromatogramm von Isorel®P60 mit Internem Standard (Theophyllin)

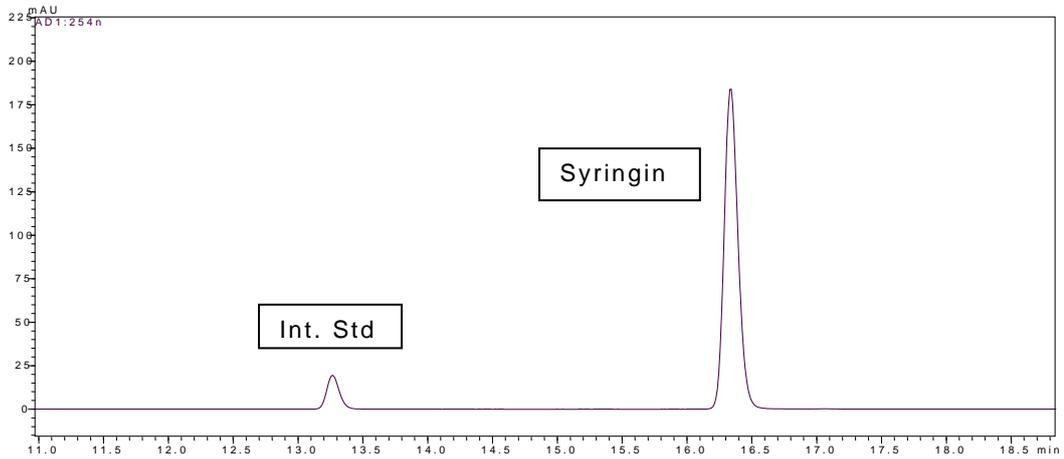
### 4.3.2 Referenzsubstanz

Die identifizierten Leitsubstanzen des Mistelextraktes von Isorel® stellten Syringenin-apiosyl-glucosid als Hauptpeak und Syringin dar.

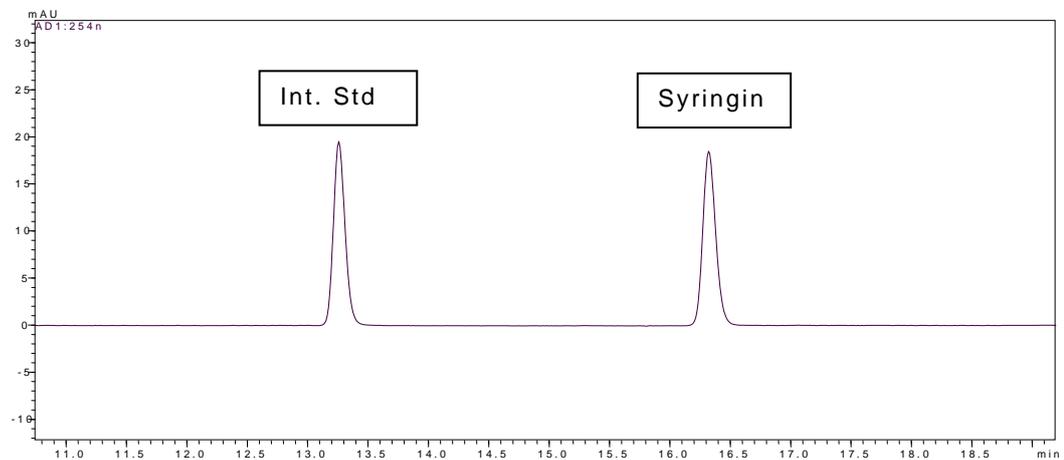
Leider ist Syringenin-apiosyl-glucosid (SYA) nicht als Referenzsubstanz erwerbbar, Syringin ist als Reinsubstanz erhältlich.

Mit Hilfe des Internen Standards und der Referenzsubstanz Syringin konnte der Standardkorrekturfaktor berechnet werden, um im Weiteren Gehaltsbestimmungen der leitenden Inhaltsstoffe in Isorel® zu ermöglichen.

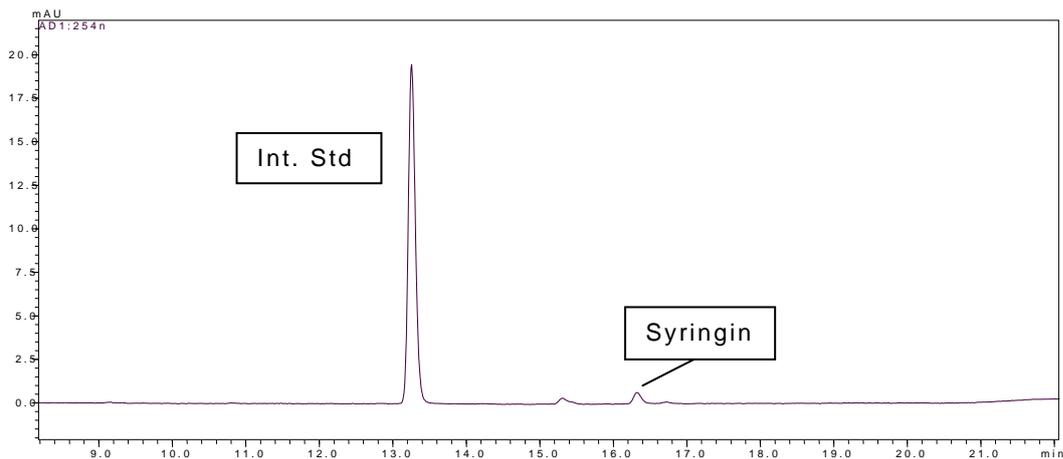
Dazu wurde eine Stammlösung von Syringin hergestellt und Verdünnungen von dieser gemacht, deren Peakgröße in dem Bereich war, der bei den Probelösungen zu erwarten war (s. Abb. 29-31). Somit wurde die Überprüfung der Linearität ermöglicht sowie die Berechnung des Standardkorrekturfaktors.



**Abb.29.** Chromatogramm des Internen Standards (Theophyllin) und Syringin (Stammlösung)



**Abb.30.** Chromatogramm des Internen Standards (Theophyllin) und Syringin (1:10)



**Abb.31.** Chromatogramm des Interner Standard (Theophyllin) und Syringin (1:300)

### 4.3.3 Berechnung des Standardkorrekturfaktors

#### Standardkorrekturfaktor für Syringin

##### *Herstellung der Stammlösung:*

Die Einwaage von Syringin betrug 1,02 mg und wurde in 10 ml 0,1%iger Ameisensäure unter Verwendung des Ultraschallbads vollständig gelöst. Es handelte sich somit um eine 0,0102%ige Lösung.

##### *Herstellung der Verdünnungen:*

- 1:2 → 1ml Stammlösung + 1ml 0,1% Ameisensäure
- 1:5 → 1ml Stammlösung + 4ml 0,1% Ameisensäure
- 1:10 → 1ml Stammlösung + 9ml 0,1% Ameisensäure
- 1:50 → 1ml 1:10-Lösung + 4ml 0,1% Ameisensäure
- 1:100 → 1ml 1:10-Lösung + 9ml 0,1% Ameisensäure
- 1:300 → 1ml 1:100-Lösung + 2ml 0,1% Ameisensäure

Nun wurden jeweils 100 µl des Internen Standards (0,001%) mit 100 µl der Syringin-Lösung vermischt. Dieser Schritt erfolgte für alle Konzentrationen. Jede der sieben Lösungen wurde vier Mal injiziert und mit *Methode\_final* analysiert.

Mit der folgenden Formel wurde der Standardkorrekturfaktor aus jeder Analyse berechnet und der Mittelwert über alle Berechnungen bestimmt (siehe Tab. 1).

$$f_{st} = \frac{g(\text{Analyt}) \times \text{Peakfläche (Int. Std)}}{g(\text{Int.Std}) \times \text{Peakfläche (Analyt)}}$$

## Ergebnisse

**Tab.1.** Berechnung des Standardkorrekturfaktors für SY

Probe	Fläche	Gehalt (µg/ml)	Fläche	Gehalt (µg/ml)	f <sub>St</sub>
	<u>Int. Std</u>	<u>Int. Std</u>	<u>Syringin</u>	<u>Syringin</u>	
Int. Std + SY 1:300 a	128595	11,5	4698	0,340	0,80927
Int. Std + SY 1:100 a	129163	11,5	14034	1,020	0,81632
Int. Std + SY 1:50 a	129094	11,5	28174	2,040	0,81281
Int. Std + SY 1:10 a	129796	11,5	135760	10,200	0,84799
Int. Std + SY 1:5 a	128912	11,5	277803	20,400	0,82317
Int. Std + SY 1:2 a	128937	11,5	680482	51,000	0,84030
Int. Std + SY SL a	128946	11,5	1356489	102,000	0,84313
x =					0,82757
Int. Std + SY 1:300 b	130551	11,5	4789	0,340	0,80597
Int. Std + SY 1:100 b	130345	11,5	14113	1,020	0,81918
Int. Std + SY 1:50 b	129259	11,5	27756	2,040	0,82611
Int. Std + SY 1:10 b	130278	11,5	136515	10,200	0,84643
Int. Std + SY 1:5 b	130696	11,5	281614	20,400	0,82327
Int. Std + SY 1:2 b	130826	11,5	689072	51,000	0,84198
Int. Std + SY SL b	130888	11,5	1370751	102,000	0,84692
x =					0,82998
Int. Std + SY 1:300 c	130687	11,5	4714	0,340	0,81964
Int. Std + SY 1:100 c	130709	11,5	14300	1,020	0,81072
Int. Std + SY 1:50 c	129417	11,5	28134	2,040	0,81600
Int. Std + SY 1:10 c	130458	11,5	136597	10,200	0,84709
Int. Std + SY 1:5 c	129846	11,5	279146	20,400	0,82514
Int. Std + SY 1:2 c	130789	11,5	687301	51,000	0,84391
Int. Std + SY SL c	130134	11,5	1363607	102,000	0,84646
x =					0,82985
Int. Std + SY 1:300 d	130714	11,5	4910	0,340	0,78709
Int. Std + SY 1:100 d	131147	11,5	14392	1,020	0,80824
Int. Std + SY 1:50 d	129812	11,5	28003	2,040	0,82232
Int. Std + SY 1:10 d	130566	11,5	137400	10,200	0,84284
Int. Std + SY 1:5 d	130742	11,5	281658	20,400	0,82343
Int. Std + SY 1:2 d	130474	11,5	689591	51,000	0,83908
Int. Std + SY SL d	130331	11,5	1370145	102,000	0,84369
x =					0,82381
<b>x (über alle Werte) =</b>					<b>0,82780</b>

Die einzelnen Ergebnisse zeigten eine sehr gute Übereinstimmung, es konnte somit der Standardkorrekturfaktor für Syringin mit 0,82780 festgelegt werden.

Standardkorrekturfaktor für Syringenin-apiosyl-glucosid

Syringenin-apiosyl-glucosid ist ja als Referenzsubstanz nicht erhältlich. Die Struktur von Syringin und Syringenin-apiosyl-glucosid unterscheidet sich nur in einem zusätzlichen Zucker bei SYA, wobei das chromophore System, das für die Absorption verantwortlich ist, bei beiden Substanzen ident ist. Diese Tatsache ermöglichte, unter Berücksichtigung der Molekulargewichte der beiden Substanzen, ebenso die Berechnung des Standardkorrekturfaktors für Syringenin-apiosyl-glucosid.

$$\frac{f_{st}(SY)}{MG(SY)} = \text{const.} \rightarrow f_{st}(SYA) = \text{const.} \times MG(SYA)$$

$$MG(SY) = 372$$

$$MG(SYA) = 504$$

$$f_{st}(SY) = 0,82780$$

$$f_{st}(SYA) = 1,12154$$

Der Gehalt von Syringin bzw. Syringenin-apiosyl-glucosid in Isorel® konnte somit durch folgende Formel berechnet werden:

$$g(SY) = \frac{g(\text{Int. Std}) \times \text{Peakfläche}(SY) \times f_{st}(SY)}{\text{Peakfläche}(\text{Int. Std})} \quad \text{bzw.}$$

$$g(SYA) = \frac{g(\text{Int. Std}) \times \text{Peakfläche}(SYA) \times f_{st}(SYA)}{\text{Peakfläche}(\text{Int. Std})}$$

Wenn man dieses Ergebnis auf 100 ml Isorel® bezieht erhält man die entsprechenden % (G/V) Gehalte gemäß den Formeln:

$$\% (SY) = \frac{g(\text{Int. Std}) \times \text{Peakfläche}(SY) \times f_{st}(SY) \times 100}{\text{Peakfläche}(\text{Int. Std}) \times \text{ml}(\text{Präparat})} \quad \text{bzw.}$$

$$\% (SYA) = \frac{g(\text{Int. Std}) \times \text{Peakfläche}(SYA) \times f_{st}(SYA) \times 100}{\text{Peakfläche}(\text{Int. Std}) \times \text{ml}(\text{Präparat})}$$

#### **4.4 Validierung der Methode**

Die vorgestellte HPLC-Methode wurde von Oktober 2013 bis Juni 2014 gemäß der ICH-Guidelines, International Conference on Harmonization of technical requirement for registration of pharmaceuticals for human use, quality guidelines Q2 (analytical validations) unter Zuhilfenahme der EDQM (european directorate for the quality of medicines and health) PA/PH/OMCL (11) 04-OMCL (official medicines control laboratory) guideline on quantification of HPLC equipment (Annex 1) sowie Ph.Eur. 7 Grundwerk 2011 validiert. Zur Validierung wurden folgende Parameter geprüft:

##### **I. Systemeignung**

Bei dieser Prüfung wird anhand verschiedener Punkte, wie zum Beispiel Symmetriefaktor von Analysenpeaks, untersucht, ob das System geeignet ist, reproduzierbare Quantifizierungen zu erlauben.

##### **II. Spezifität**

Eine Methode wird dann als spezifisch bewertet, wenn sie die zu untersuchenden Komponenten ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorkommenden Substanzen erfasst.

##### **III. Methodenpräzision**

Die Methodenpräzision ist ein Maß für die Schwankungen der Ergebnisse, die durch verschiedene Schritte in der Analyse entstehen. Es wird die zufällige Streuung der Analysenergebnisse bestimmt, wofür eine mehrmalige (meist 6-fache) Durchführung der gesamten Proben-Analyse notwendig ist.

##### **IV. Linearität**

Bei diesem Parameter wird die Proportionalität zwischen dem Messsignal einer Substanz und ihrer Konzentration untersucht. Veranschaulicht wird das Ergebnis meist in einer graphischen Darstellung.

#### **V. *Richtigkeit***

Hier wird untersucht, wie sehr das Messergebnis vom richtigen bzw. „wahren“ Wert abweicht. Ein Maß hierfür stellt die „Wiederfindungsrate“ dar, bei der mittels Zugabe einer Referenzsubstanz gezeigt wird, ob ein gewisser Teil der Probe bei der Probenaufarbeitung oder Analyse verloren geht.

#### **VI. *Wiederholbarkeit***

Bei diesem Punkt wird ein Analysenvorgang mehrfach durchgeführt und dieser komplett wiederholt, wobei die Ergebnisse der beiden Durchgänge verglichen werden und in bestimmten Grenzwerten liegen sollen.

#### **VII. *Tag-zu-Tag-Präzision***

Bei dieser Prüfung werden die Messergebnisse eines Tages mit jenen am darauffolgenden Tag, also 24 Stunden später, verglichen und ausgewertet. Bestimmte Kriterien müssen dabei erreicht werden.

#### **VIII. *Robustheit***

Eine Methode ist robust, wenn das Ergebnis auch nach kleinen Änderung verschiedener Testparameter wie Temperatur, pH-Wert oder Flussrate den Anforderungen entspricht.

## 4.5 Validierung der Methode

Nach Erarbeitung aller Parameter eines vorgegebenen Validierungsplanes wurde ein Validierungsprotokoll erstellt, das alle Bestimmungen und Ergebnisse der Analyse enthält.

### 4.5.1 Validierungsprotokoll

#### I. Systemeignung

Zur Prüfung der Systemeignung wurden drei verschiedene Konzentrationen der Syringin-Referenzsubstanz 6-fach injiziert:

- Syringinlösung (0,3 µg/ml)
- Syringinlösung (3,0 µg/ml)
- Syringinlösung (15,0 µg/ml)

Im Ph. Eur. 7. Ausgabe, Grundwerk 2011, wird für diese Prüfung je nach gefordertem Gehalt der Substanzen eine maximale relative Standardabweichung (RSD) von 0,85% bis 1,27% gefordert. Akzeptiert werden jedoch normalerweise auch noch 2% RSD. Bezüglich der Retentionszeiten wird eine RSD von maximal 5% verlangt (EDQM, PA/OMLC (11) 04-OMCL Guideline on qualification of HPLC equipment, Annex 1).

#### Ergebnis:

(s. auch Tabelle I: Systemeignung im Anhang)

	<u>Peakfläche</u>	<u>Retentionszeit</u>
Syringinlösung (0,3 µg/ml):	1,34 % RSD	0,18 % RSD
Syringinlösung (3 µg/ml):	0,8 % RSD	0,07 % RSD
Syringinlösung (15 µg/ml):	0,65 % RSD	0,22 % RSD

➤ **Entspricht**

Ebenso schreibt Ph. Eur. 7. Ausgabe, Grundwerk 2011, für die Hauptpeaks einen Symmetriefaktor zwischen 0,8 und 1,5 vor. Hier wurde ebenfalls der Symmetriefaktor des Peaks des Internen Standards (Theophyllin) bestimmt, da dieser bei der gesamten Analyse herangezogen wurde.

Ergebnis:

**Symmetriefaktor:**

Syringin:	1,05 – 1,24 (Isorel®-Proben) 0,93 – 1,19 (Syringin-Lösung)
Syringenin-apiosyl-glucosid:	1,12 – 1,19 (Isorel®-Proben)
Theophyllin:	1,15 – 1,24 (in allen Lösungen)

➤ **Entspricht**

**II. Spezifität**

Zur Prüfung der Spezifität der Methode wurden folgende Lösungen injiziert:

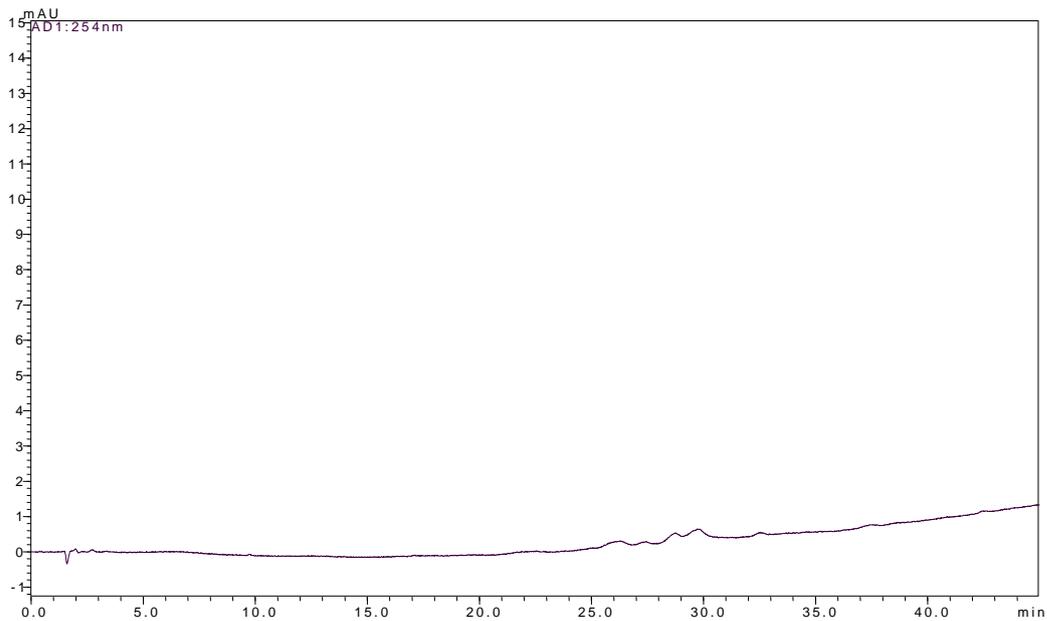
- Aqua bidest.
- Isorel®A60
- Isorel®M60
- Isorel®P60

Bei der Analyse von Wasser darf bei den Retentionszeiten von Theophyllin (Int. Std. bei 13-14 min.), Syringin (16-17 min.) und Syringenin-apiosyl-glucosid (17-18 min.) kein Signal auftreten.

Ergebnis:

(s. Tabelle II: Spezifität im Anhang)

Bei den Retentionszeiten der oben genannten Substanzen wurden keine Signale bei der Analyse von Wasser nachgewiesen (s. Abb. 32).



**Abb.32.** Chromatogramm von blank Wasser<sub>dest.</sub>

➤ **Entspricht**

EDQM, PA/OMCL (11) 04-OMCL Guideline on qualification of HPLC equipment prüft ebenso auf Carry-Over. Nach aufeinanderfolgenden Läufen der Referenzsubstanz (Syringin) und anschließender blank-Wasser-Injektion soll die Peakfläche der blank-Lösung bei der Retentionszeit der Syringinlösung  $\leq 0,2\%$  der Syringin-Peakfläche sein.

Ergebnis:

Es war kein Peak bei der Retentionszeit von Syringin zu detektieren  
→ Carry-Over: 0 %.

➤ **Entspricht**

### III. Methodenpräzision

Zur Prüfung der Methodenpräzision wurden die Referenzsubstanz (Syringin) sowie alle Probelösungen 6-fach injiziert und analysiert:

- Syringinlösung (3 µg/ml)
- Isorel®**A** in den Stärken **1, 6, 12, 24, 36** und **60**
- Isorel®**M** in den Stärken **1, 6, 12, 24, 36** und **60**
- Isorel®**P** in den Stärken **1, 6, 12, 24, 36** und **60**

Die EDQM, PA/PH/OMCL (11) 04-OMCL Guideline schlägt eine RSD ≤ 1,5% des Gehaltes vor, üblicherweise werden jedoch noch 2% RSD toleriert.

Ergebnis:

(s. auch Tabelle III: Methodenpräzision im Anhang)

Folgende relative Standardabweichungen (RSD) wurden ermittelt:

	<b>1</b> (SY/SYA)	<b>6</b> (SY/SYA)	<b>12</b> (SY/SYA)
Isorel® <b>A</b> :	0,59%/0,32%	1,11%/0,32%	0,70%/0,20%
Isorel® <b>M</b> :	3,30%/2,93%	n.d./1,76%	1,28%/0,73%
Isorel® <b>P</b> :	1,67%/0,96%	2,36%/0,69%	1,19%/0,49%
	<b>24</b> (SY/SYA)	<b>36</b> (SY/SYA)	<b>60</b> (SY/SYA)
Isorel® <b>A</b> :	1,92%/0,18%	1,91%/0,64%	2,02%/0,64%
Isorel® <b>M</b> :	1,23%/0,64%	1,13%/0,31%	0,28%/0,53%
Isorel® <b>P</b> :	0,57%/0,65%	1,80%/1,10%	0,28%/0,53%

Syringinlösung (3 µg/ml):    0,80 % RSD (Peakfläche)

Einige wenige Werte der RSD des Gehaltes von Syringin (SY) und Syringenin-apiosyl-glucosid (SYA) waren > 2% und lagen somit außerhalb der erlaubten Grenzen.

➤ **Entspricht nicht**

#### IV. Linearität

Um die Prüfung auf Linearität darzustellen, wurden drei verschiedene Konzentrationen der Syringin-Reinsubstanz 6-fach injiziert:

- Syringinlösung (0,3 µg/ml)
- Syringinlösung (3 µg/ml)
- Syringinlösung (15 µg/ml)

→ entspricht rund 10%-600% des zu erwartenden Gehaltes an Syringin in den Probelösungen.

Die ICH Guideline schlägt einen Bereich von 80%-120% für Arzneisubstanzen und Fertigprodukte bzw. 70%-130% für die Prüfung auf Gleichförmigkeit des Gehalts vor.

Die EDQM, PA/PH/OMCL (11) 04-OMCL Guideline fordert für die Eichgerade (UV(DAD-Detektor) ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 \geq 0,999$ .

#### Ergebnis:

(s. auch Tabelle IV: Linearität im Anhang)

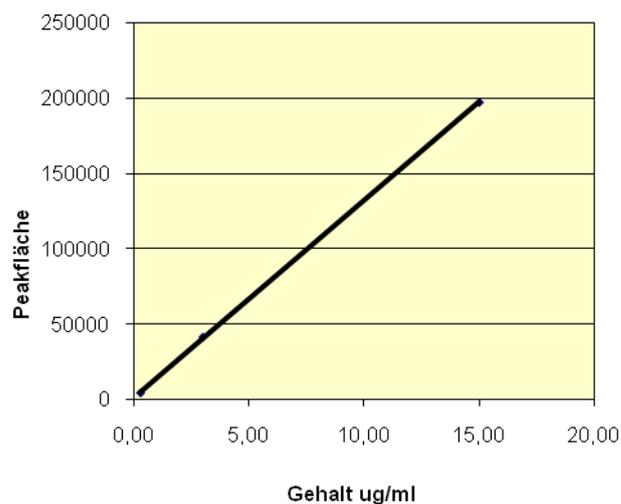
#### **Geradengleichung:**

$$y = 13064x + 1185,6$$

#### **Bestimmtheitsmaß:**

$$R^2 = 0,9999$$

➤ **Entspricht**



## V. Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde anhand von Isorel®P60 gezeigt. Dazu wurde die Probelösung 6-fach injiziert und jeweils der Gehalt an Syringin bestimmt. Anschließend wurden drei verschiedene Konzentrationen der Syringin-Referenzsubstanz hergestellt, 6-fach analysiert und jeweils der Gehalt an Syringin mittels des Internen Standards bestimmt. Danach wurde die Probelösung mit den drei unterschiedlichen Syringin-Konzentrationen dotiert und die Wiederfindung des zugesetzten Syringins in % berechnet.

Dazu wurden für jede der drei Syringin-Konzentration jeweils 200 µl der Syringin-Lösung mit 200 µl Theophyllin-Lösung vermischt, 200 µl der Probelösung mit 200 µl Theophyllin-Lösung vereinigt und eine Mischung aus 100 µl Syringin-Lösung, 100µl Probelösung und 200µl Theophyllin-Lösung hergestellt. Der Verdünnungsschritt von Syringin wurde bei der Berechnung des Gehalts (Tabelle V, s. Anhang) bereits miteinbezogen.

Die Wiederfindung soll zwischen 95% und 105% liegen und die RSD bei einer Bestimmung muss kleiner als 2% sein.

### Ergebnis:

(s. auch Tabelle V: Richtigkeit im Anhang)

	<u>Wiederfindung</u>	<u>RSD</u>
Isorel® P60 I:	95,86 %	0,86%
Isorel® P60 II:	100,06%	0,83%
Isorel® P60 III:	100,18%	1,25%

➤ **Entspricht**

## VI. Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit der Methode wurde anhand von Isorel®P24 veranschaulicht. Dazu wurden sechs unabhängige Probenahmen getätigt und pro Entnahme drei Bestimmungen durchgeführt. Der

Gehalt an Syringin und Syringenin-apiosyl-glucosid wurde mittels des Internen Standards bestimmt.

Die relative Standardabweichung des Gehalts von Syringin und Syringenin-apiosyl-glucosid über alle erhaltenen Bestimmungen soll maximal 5% betragen.

Ergebnis:

(s. auch Tabelle VI: Wiederholbarkeit im Anhang)

Aus den drei Bestimmungen der sechs Proben wurden folgende relative Standardabweichungen des Gehalts an Syringin und Syringenin-apiosyl-glucosid ermittelt:

	<b>SY</b>	<b>SYA</b>
Probe 1:	0,37 % RSD	0,16 % RSD
Probe 2:	0,37 % RSD	0,34 % RSD
Probe 3:	0,12 % RSD	0,21 % RSD
Probe 4:	0,40 % RSD	0,14 % RSD
Probe 5:	0,77 % RSD	0,22 % RSD
Probe 6:	0,56 % RSD	0,07 % RSD
über alle 18 Bestimmungen:	<b>2,64 % RSD</b>	<b>2,17 % RSD</b>

Der RSD über alle Bestimmungen liegt deutlich unter 5%.

➤ **Entspricht**

### VII. Tag-zu-Tag-Präzision

Die Tag-zu-Tag-Präzision wurde anhand folgender Proben gezeigt:

- Isorel® A24
- Isorel® A60
- Isorel® M24

- Isorel® M60
- Isorel® P24
- Isorel® P60

Es wurden jeweils sechs Injektionen einer Probe an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (im Abstand von 24 Stunden) durchgeführt und daraus Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung des Gehaltes an SY und SYA errechnet.

Der F-Test wurde zur Prüfung der Varianzen  $s_1^2$  und  $s_2^2$  herangezogen um zu prüfen, ob diese aus einer Grundgesamtheit entstammen. Die obere Signifikanzschranke der F-Verteilung bei fünf Freiheitsgraden (95%, 5,5) wurde einer F-Test-Tabelle entnommen und beträgt 5,05.

Ebenso wurde mit dem Mittelwert-t-Test geprüft, ob die zwei Mittelwerte von Tag 1 und Tag 2 einer Grundgesamtheit entstammen. Die Signifikanzschranke der t-Verteilung (95%, 10) wurde aus einer t-Wert-Tabelle entnommen und beträgt 2,228.

Ergebnis:

(s. auch Tabelle VII. Tag zu Tag Präzision im Anhang)

	<b>F-Test</b> (SY/SYA)	<b>t-Test</b> (SY/SYA)
Isorel® A24	1,22 / 9,23	2,49 / 2,45
Isorel® A60	1,56 / 3,48	3,66 / 5,08
Isorel® M24	1,99 / 1,02	3,95 / 1,21
Isorel® M60	1,15 / 4,20	3,73 / 8,16
Isorel® P24	2,98 / 37,41	2,12 / 0,37
Isorel® P60	2,07 / 0,25	6,68 / 0,48

➤ **Entspricht nicht**

### VIII. Robustheit

Die Robustheit der Methode wurde anhand von Isorel®P60 gezeigt, wobei folgende Parameter der Methode verändert wurden:

- **Flussrate:** von 0,40 ml/min → 0,35 ml/min bzw. 0,45 ml/min
- **Säulenofen-Temperatur:** von 25 °C → 20 °C bzw. 30 °C
- **pH-Wert der mobilen Phase:** von rund 2,62 → 2,22 bzw. 2,92
- **Säule:** von bisher verwendeter Säule → andere, gleichartige Säule (Dionex Acclaim™ 120, C18, 3 µm, 120 A, 2,1 x 120 mm, Prod.no.: 059130, Ser.no.: 002655 Lot No. 018-01-139)

Die nach Veränderung der Parameter erfolgten Analysen wurden hinsichtlich Peaksymmetrie, Trennleistung und Gehalt von Syringin und Syringenin-apiosyl-glucosid verglichen und ausgewertet.

#### Ergebnis:

(s. auch Abb. 34-40 und Tabelle VIII: Robustheit im Anhang)

Der Symmetriefaktor des Syringin-Peaks lag bei 0,9-1,25 und bei Syringenin-apiosyl-glucosid zwischen 1,15 und 1,26.

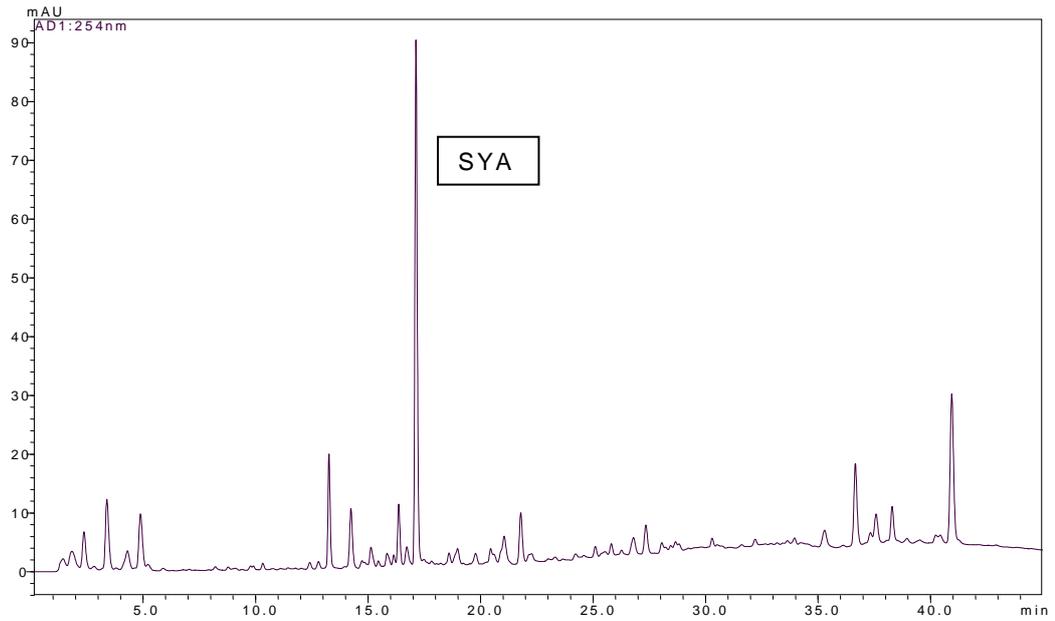
Die Trennleistung wurde durch die veränderten Parameter nicht wesentlich beeinflusst. Lediglich bei der Säulenofen-Temperaturänderung von 25 °C auf 30 °C zeigte sich eine Verschlechterung bezüglich der Trennung.

Die relative Standardabweichung des Gehalts an Syringenin-apiosyl-glucosid lag zwischen 1,95% und 2,84%.

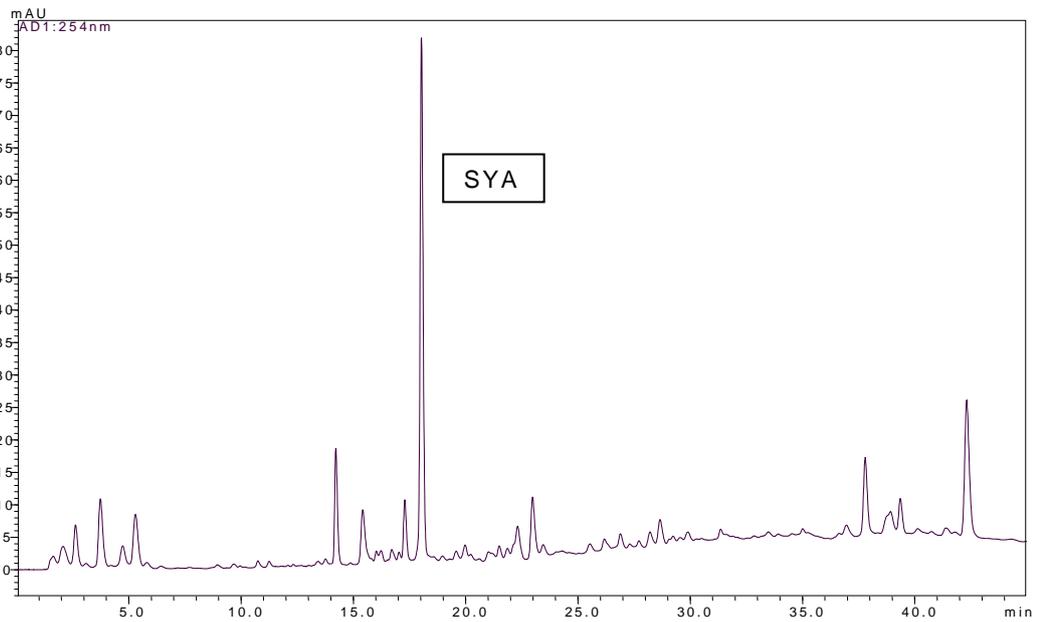
Die RSD über alle erhaltenen Werte betrug bei SYA 3,17%.

➤ **Entspricht**

## Ergebnisse

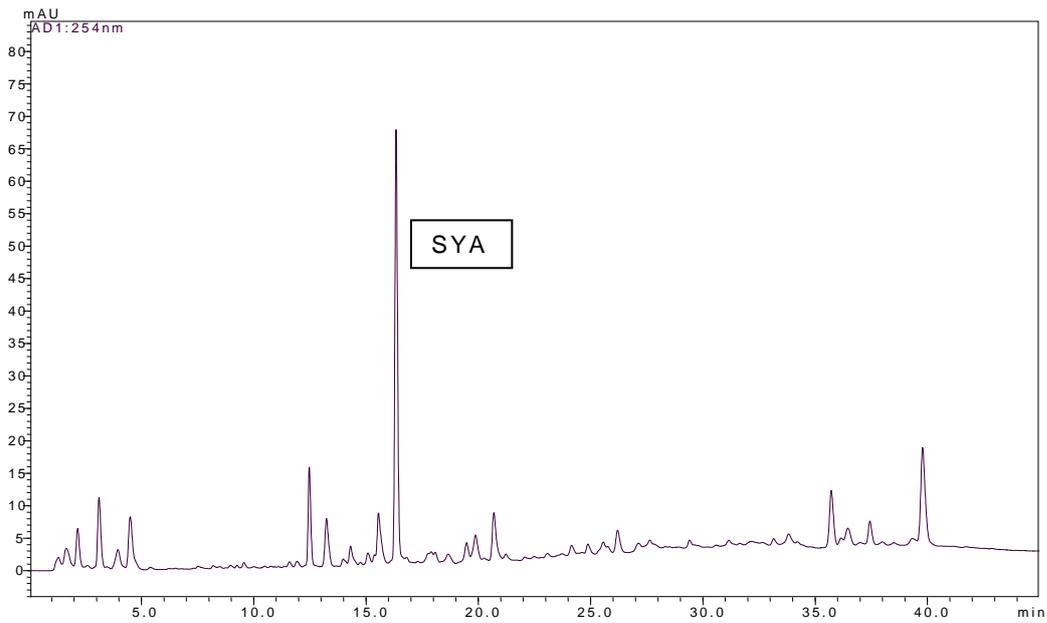


**Abb.33.** Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std mit den Standardparametern aus *Methode\_final* (Flussrate: 0,40 ml/min, Temperatur 25°C, pH 2,62, Säule 1)

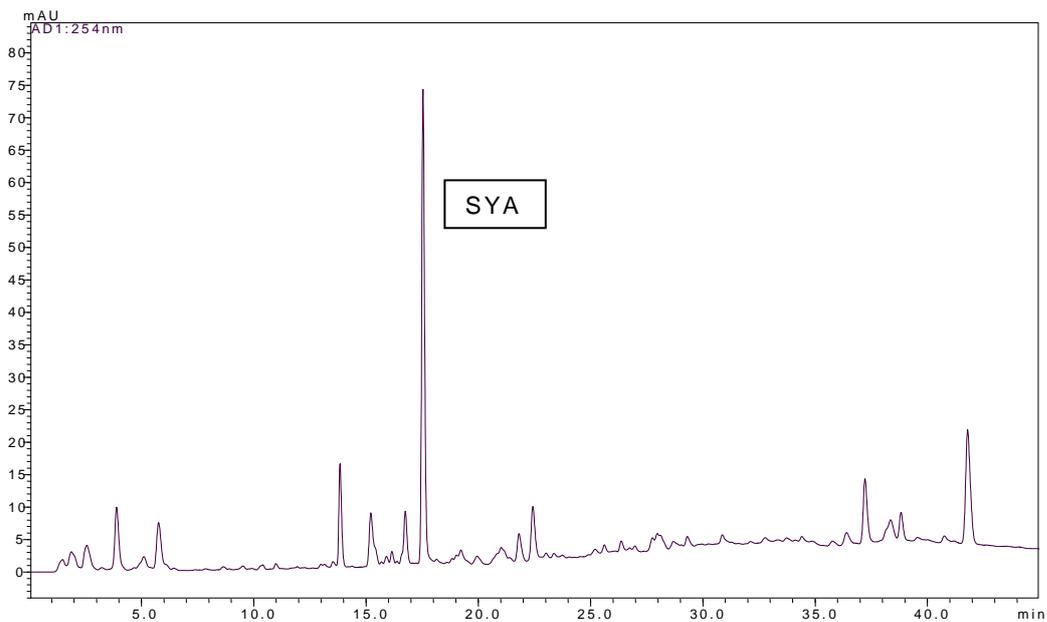


**Abb.34.** Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einer Flussrate von 0,35 ml/min

## Ergebnisse

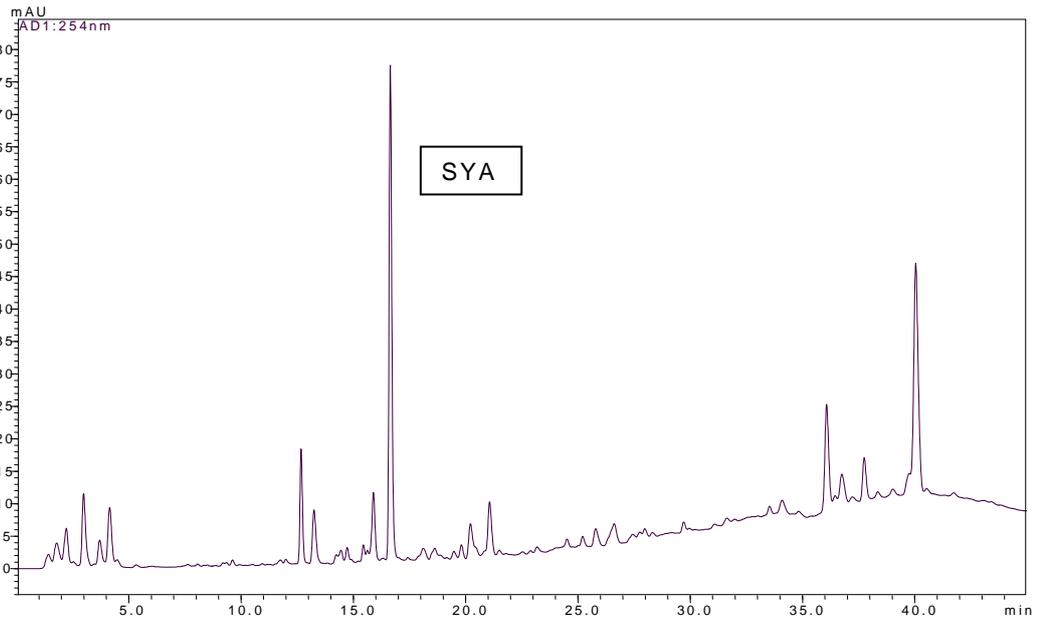


**Abb.35.** Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einer Flussrate von 0,45 ml/min

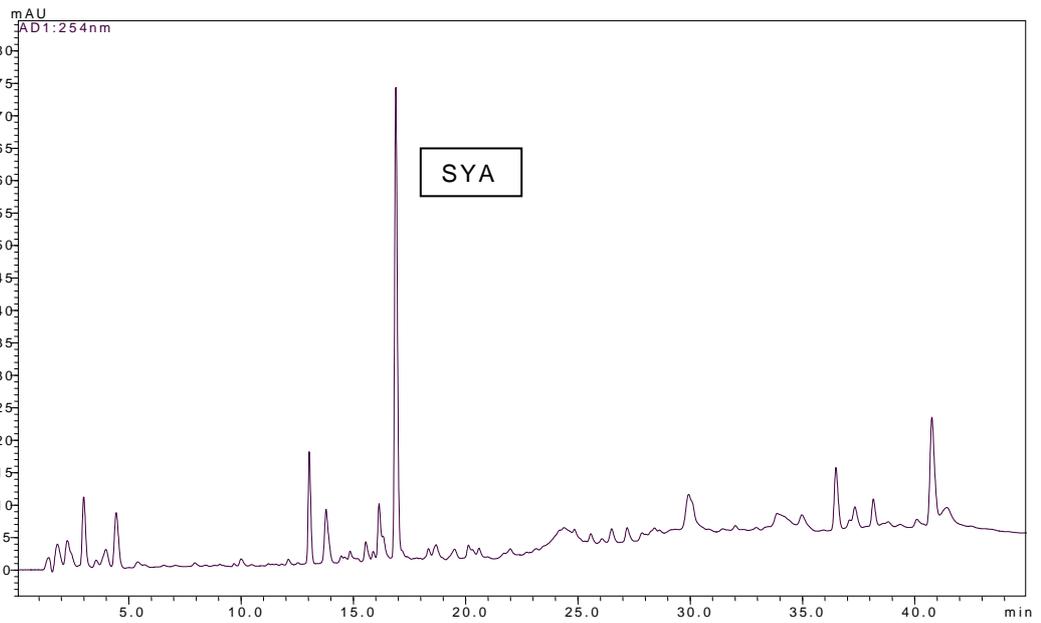


**Abb.36.** Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einer Säulenofentemperatur von 20°C

## Ergebnisse

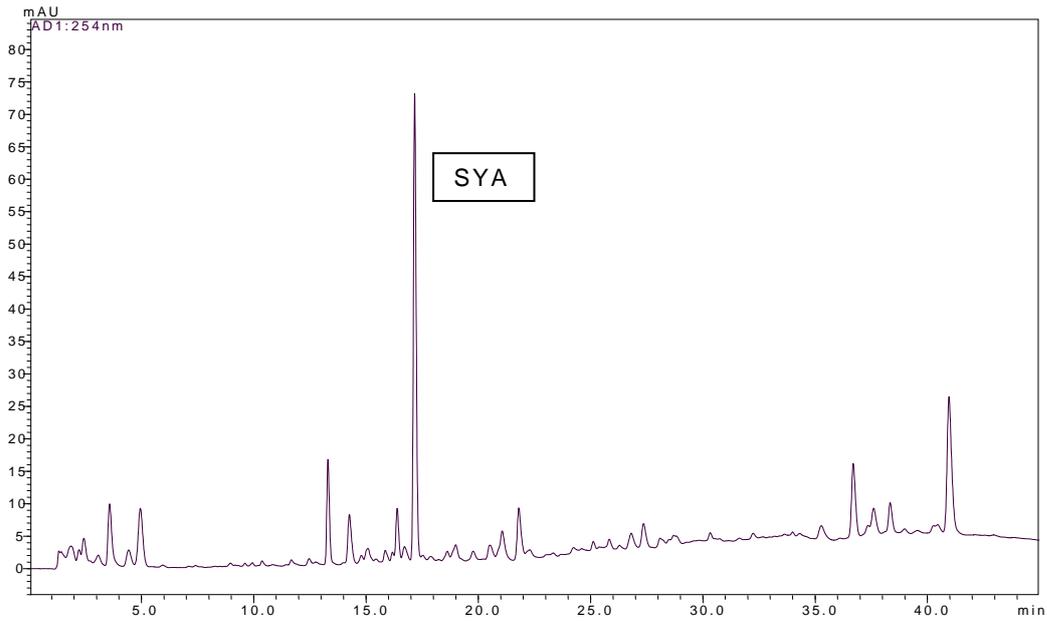


**Abb.37.** Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einer Säulenofentemperatur von 30°C

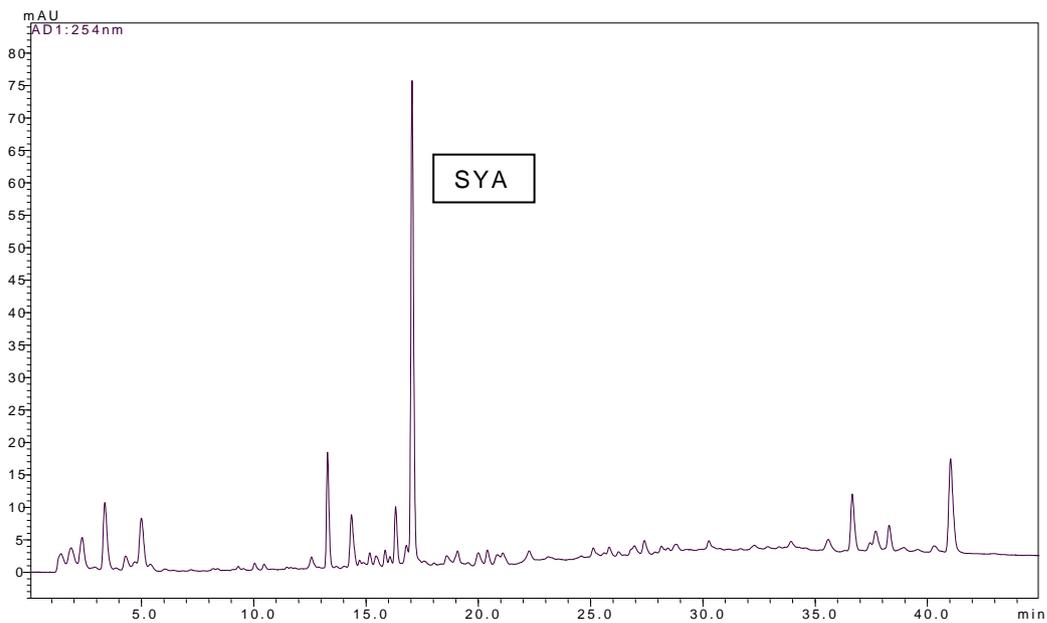


**Abb.38.** Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einem pH-Wert von 2,22 (Elutionsmittel)

## Ergebnisse



**Abb.39.** Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einem pH-Wert von 2,92 (Elutionsmittel)



**Abb.40.** Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std mit Säule 2 (Dionex)

## 5. Diskussion

Ziel dieser Diplomarbeit war es, eine Methode zur Qualitätskontrolle von Mistelextrakten (Isorel®) mittels HPLC auszuarbeiten und eine entsprechende Methodvalidierung durchzuführen, um die Eignung der Methode aufzuzeigen.

Ein Problem stellte die Tatsache dar, dass in pflanzlichen Zubereitungen, wie es auch Isorel® ist, immer ein Vielkomponentengemisch zu finden ist. Nach vielen Versuchen und Optimierungsschritten konnte eine zufriedenstellende Auftrennung diverser Komponenten mittels HPLC erreicht werden. Die Zuordnung von Substanzklassen bzw. Identifizierung von einzelnen Komponenten gelang vor allem durch den Einsatz von LC-MS bzw. Co-Chromatographie mit Referenzsubstanzen.

Der Verwendung von Komponenten aus wirksamkeitsbestimmenden Substanzklassen in Misteln (Viscotoxine und Mistellektine) als Leitsubstanzen stellte sich aufgrund von zu geringen Konzentrationen in allen Produkten und infolge dessen erforderlichen Aufarbeitungs- und Isolierungsschritten als ungeeignet heraus. Demnach wurden als Leitsubstanzen für die Qualitätskontrolle SYA (Syringenin- $\alpha$ -apiosylglucosid) bzw. SY (Syringin) festgelegt. Diese beiden Substanzen sind typisch für Misteln und SYA ist die Hauptkomponente im Chromatogramm der Mistelextrakte. Zur Quantifizierung konnte ein geeigneter interner Standard gefunden werden (Theophyllin). Damit stand eine entsprechende Methode zur Prüfung der Qualität und Stabilität bzw. Vergleich von Extrakten aus unterschiedlichen Mistelarten zur Verfügung.

Die Validierung der Methode wurde gemäß ICH-Richtlinien (s. Kap. 4.4) durchgeführt und die Parameter Systemeignung, Spezifität, Methodenpräzision, Linearität, Richtigkeit, Wiederholbarkeit, Tag-zu-Tag-Präzision, Robustheit erhoben. Bis auf wenige Ausnahmen konnte die Eignung dieser Methode für die Qualitätsprüfung gezeigt werden. Einzelne Parameter müssen noch einmal validiert werden, was aber im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht mehr möglich war.

Somit konnten also wesentliche Beiträge für eine Methode zur Qualitätsprüfung von wässrigen Mistelzubereitungen geleistet werden.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die für eine Qualitätsprüfung von wässrigen Mistelextrakten aus Isorel® angewendet werden sollte. Dafür wurden mittels LC-MS die Komponenten und Syringin in Isorel® identifiziert, die als Leitsubstanzen für die Qualitätskontrolle herangezogen wurden. Syringenin-apiosyl-glucosid stellt die Hauptkomponente in allen Isorel®-Präparaten dar. Syringin konnte als Referenzsubstanz erworben werden und als geeigneter interner Standard stand Theophyllin zur Verfügung, wodurch eine Quantifizierung ermöglicht wurde. Die Durchführung einer Validierung der HPLC-Methode umfasste die Prüfung der Parameter Systemeignung, Spezifität, Methodenpräzision, Linearität, Richtigkeit, Wiederholbarkeit, Tag-zu-Tag-Präzision und Robustheit, die bis auf sehr wenige Ausnahmen entsprach.

## **7. Abstract**

In this diploma thesis a HPLC-method was worked out to be applied for the quality control of aqueous mistletoe extracts of Isorel®. The components and syringine were identified by LC-MS and could be used as lead compounds for the quality control. syringenin-apiosylglucoside was the main component in all Isorel® products. Syringine could be acquired and the internal standard Theophyllin was used to enable a quantification. A validation of the HPLC-method was realized to certify the parameters system suitability, specificity, precision, linearity, accuracy, repeatability, day-to-day precision and robustness. With a few exceptions all parameters complied with the requirements.

## 8. Anhang

Tabelle I: Systemeignung

Syringin (0,3 µg/ml)				
----------------------	--	--	--	--

Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche
1	Syringinlsg_1a	14.01.2014 13:56	16,37	4176
2	Syringinlsg_1b	14.01.2014 18:38	16,29	4262
3	Syringinlsg_1c	14.01.2014 23:20	16,32	4329
4	Syringinlsg_1d	15.01.2014 04:03	16,31	4280
5	Syringinlsg_1e	15.01.2014 08:45	16,30	4270
6	Syringinlsg_1f	15.01.2014 13:27	16,34	4334
Mittelwert			16,32	4275
SD			0,03	57,30
% RSD			<b>0,18</b>	<b>1,34</b>

Syringin (3 µg/ml)				
--------------------	--	--	--	--

Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche
1	Syringinlsg_2a	14.01.2014 15:07	16,33	41596
2	Syringinlsg_2b	14.01.2014 19:49	16,32	40767
3	Syringinlsg_2c	15.01.2014 00:31	16,34	41652
4	Syringinlsg_2d	15.01.2014 05:13	16,32	41441
5	Syringinlsg_2e	15.01.2014 09:55	16,32	41319
6	Syringinlsg_2f	15.01.2014 14:37	16,35	41583
Mittelwert			16,33	41393
SD			0,01	329,86
% RSD			<b>0,07</b>	<b>0,80</b>

Syringin (15 µg/ml)				
---------------------	--	--	--	--

Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche
1	Syringinlsg_3a	14.01.2014 16:17	16,37	199123
2	Syringinlsg_3b	14.01.2014 20:59	16,30	197505
3	Syringinlsg_3c	15.01.2014 01:41	16,28	196258
4	Syringinlsg_3d	15.01.2014 06:24	16,30	195716
5	Syringinlsg_3e	15.01.2014 11:06	16,33	197258
6	Syringinlsg_3f	15.01.2014 15:48	16,36	195870
Mittelwert			16,32	196955
SD			0,04	1287,84
% RSD			<b>0,22</b>	<b>0,65</b>

Tabelle II: Spezifität

<b>Theophyllin</b>					
Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Wasser	15.01.2014 16:58	13,00 - 14,00	0,00	0,00
2	Isorel(A) 60	09.12.2013 04:49	13,27	111696	11,50
3	Isorel(M) 60	04.12.2013 03:54	13,26	135399	11,50
4	Isorel(P) 60	30.11.2013 09:05	13,26	135037	11,50

<b>Syringin</b>					
Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Wasser	15.01.2014 16:58	16,00 - 17,00	0,00	0,00
2	Isorel(A) 60	09.12.2013 04:49	16,36	2630	0,22
3	Isorel(M) 60	04.12.2013 03:54	16,37	10318	0,73
4	Isorel(P) 60	30.11.2013 09:05	16,36	72059	5,08

<b>Syringenin-apiosyl-glucosid</b>					
Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Wasser	15.01.2014 16:58	17,00 - 18,00	0,00	0,00
2	Isorel(A) 60	09.12.2013 04:49	17,12	178678	20,63
3	Isorel(M) 60	04.12.2013 03:54	17,12	97543	9,29
4	Isorel(P) 60	30.11.2013 09:05	17,13	644782	61,58

**Bei Lösungsmittelanalyse kein Signal bei R.T. 13,00-14,00 (Int. Std),  
16,00 - 17,00 (SY) und 17,00 - 18,00 (SYA)**

<b>Syringin (15µg/ml)</b>					
Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Syringinlsg_3a	14.01.2014 16:17	16,37	199123	15,0
2	Syringinlsg_3b	14.01.2014 20:59	16,30	197505	15,0
3	Syringinlsg_3c	15.01.2014 01:41	16,28	196258	15,0
4	Syringinlsg_3d	15.01.2014 06:24	16,30	195716	15,0
5	Syringinlsg_3e	15.01.2014 11:06	16,33	197258	15,0
6	Syringinlsg_3f	15.01.2014 15:48	16,36	195870	15,0
Mittelwert			16,32	196955	
SD			0,04	1287,84	
% RSD			0,22	<b>0,65</b>	
7	0	15.01.2014 16:58	16,00 - 17,00	0,00	

**Bei Lösungsmittelanalyse kein Carry-Over**

Tabelle III: Methodenpräzision

<b>Syringin (3 µg/ml)</b>				
---------------------------	--	--	--	--

Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche
1	Syringinlsg_2a	14.01.2014 15:07	16,33	41596
2	Syringinlsg_2b	14.01.2014 19:49	16,32	40767
3	Syringinlsg_2c	15.01.2014 00:31	16,34	41652
4	Syringinlsg_2d	15.01.2014 05:13	16,32	41441
5	Syringinlsg_2e	15.01.2014 09:55	16,32	41319
6	Syringinlsg_2f	15.01.2014 14:37	16,35	41583
Mittelwert			16,33	41393
SD			0,01	329,86
RSD %			0,07	<b>0,80</b>

<b>Isorel (A) 01</b>					
----------------------	--	--	--	--	--

<b>Theophyllin</b>					
--------------------	--	--	--	--	--

Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)01_a	04.12.2013 15:55	13,26	127375	11,50
2	Isorel(A)01_b	04.12.2013 17:06	13,27	127536	11,50
3	Isorel(A)01_c	04.12.2013 18:17	13,28	127064	11,50
4	Isorel(A)01_d	04.12.2013 19:27	13,27	127454	11,50
5	Isorel(A)01_e	04.12.2013 20:38	13,29	127434	11,50
6	Isorel(A)01_f	04.12.2013 21:48	13,26	127298	11,50
Mittelwert			13,27	127360,17	11,50
SD			0,01	165,51	
% RSD			0,09	0,13	

<b>Syringin</b>					
-----------------	--	--	--	--	--

Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)01_a	04.12.2013 15:55	16,35	17498	0,13
2	Isorel(A)01_b	04.12.2013 17:06	16,37	17737	0,13
3	Isorel(A)01_c	04.12.2013 18:17	16,35	17427	0,13
4	Isorel(A)01_d	04.12.2013 19:27	16,36	17651	0,13
5	Isorel(A)01_e	04.12.2013 20:38	16,37	17698	0,13
6	Isorel(A)01_f	04.12.2013 21:48	16,34	17528	0,13
Mittelwert			16,36	17589,83	0,13
SD			0,01	123,18	0,00
% RSD			0,06	0,70	<b>0,59</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)01_a	04.12.2013 15:55	17,12	47541	0,48
2	Isorel(A)01_b	04.12.2013 17:06	17,14	47525	0,48
3	Isorel(A)01_c	04.12.2013 18:17	17,12	47265	0,48
4	Isorel(A)01_d	04.12.2013 19:27	17,13	47143	0,48
5	Isorel(A)01_e	04.12.2013 20:38	17,13	47301	0,48
6	Isorel(A)01_f	04.12.2013 21:48	17,11	47394	0,48
Mittelwert			17,12	47361,50	0,48
SD			0,01	155,39	0,00
<b>% RSD</b>			0,06	0,33	<b>0,32</b>

### Isorel (A) 06

### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)06_a	04.12.2013 22:59	13,26	129264	11,50
2	Isorel(A)06_b	05.12.2013 00:09	13,30	129374	11,50
3	Isorel(A)06_c	05.12.2013 01:20	13,28	129770	11,50
4	Isorel(A)06_d	05.12.2013 02:30	13,26	129113	11,50
5	Isorel(A)06_e	05.12.2013 03:41	13,29	128936	11,50
6	Isorel(A)06_f	05.12.2013 04:51	13,26	128741	11,50
Mittelwert			13,28	129199,67	11,50
SD			0,02	359,78	
<b>% RSD</b>			0,11	0,28	

### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)06_a	04.12.2013 22:59	16,36	4557	0,34
2	Isorel(A)06_b	05.12.2013 00:09	16,39	4609	0,34
3	Isorel(A)06_c	05.12.2013 01:20	16,35	4597	0,34
4	Isorel(A)06_d	05.12.2013 02:30	16,35	4552	0,34
5	Isorel(A)06_e	05.12.2013 03:41	16,39	4602	0,34
6	Isorel(A)06_f	05.12.2013 04:51	16,34	4675	0,35
Mittelwert			16,36	4598,67	0,34
SD			0,02	44,41	0,00
<b>% RSD</b>			0,13	0,97	<b>1,11</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)06_a	04.12.2013 22:59	17,13	26875	2,68
2	Isorel(A)06_b	05.12.2013 00:09	17,15	26906	2,68
3	Isorel(A)06_c	05.12.2013 01:20	17,12	26971	2,68
4	Isorel(A)06_d	05.12.2013 02:30	17,12	26850	2,68
5	Isorel(A)06_e	05.12.2013 03:41	17,16	27019	2,70
6	Isorel(A)06_f	05.12.2013 04:51	17,11	26825	2,69
Mittelwert			17,13	26907,67	2,69
SD			0,02	74,34	0,01
<b>% RSD</b>			0,12	0,28	<b>0,32</b>

### Isorel (A) 12

#### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)12_a	05.12.2013 08:23	13,28	131000	11,50
2	Isorel(A)12_b	05.12.2013 09:34	13,26	130458	11,50
3	Isorel(A)12_c	05.12.2013 10:44	13,27	131140	11,50
4	Isorel(A)12_d	05.12.2013 11:55	13,28	130699	11,50
5	Isorel(A)12_e	05.12.2013 13:05	13,26	131017	11,50
6	Isorel(A)12_f	05.12.2013 14:16	13,29	130533	11,50
Mittelwert			13,27	130807,83	11,50
SD			0,01	283,12	
<b>% RSD</b>			0,08	0,22	

#### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)12_a	05.12.2013 08:23	16,37	5929	0,43
2	Isorel(A)12_b	05.12.2013 09:34	16,35	5911	0,43
3	Isorel(A)12_c	05.12.2013 10:44	16,36	5884	0,43
4	Isorel(A)12_d	05.12.2013 11:55	16,36	5984	0,44
5	Isorel(A)12_e	05.12.2013 13:05	16,34	5927	0,43
6	Isorel(A)12_f	05.12.2013 14:16	16,38	5951	0,43
Mittelwert			16,36	5931,00	0,43
SD			0,01	34,17	0,00
<b>% RSD</b>			0,08	0,58	<b>0,70</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläcbe	Gehalt ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	Isorel(A)12_a	05.12.2013 08:23	17,13	52269	5,15
2	Isorel(A)12_b	05.12.2013 09:34	17,12	52079	5,15
3	Isorel(A)12_c	05.12.2013 10:44	17,14	52504	5,16
4	Isorel(A)12_d	05.12.2013 11:55	17,13	52104	5,14
5	Isorel(A)12_e	05.12.2013 13:05	17,11	52454	5,16
6	Isorel(A)12_f	05.12.2013 14:16	17,16	52041	5,14
Mittelwert			17,13	52241,83	5,15
SD			0,01	200,17	0,01
<b>% RSD</b>			0,08	0,38	<b>0,20</b>

### Isorel (A) 24

### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläcbe	Gehalt ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	Isorel(A)24_a	05.12.2013 15:26	13,31	130403	11,50
2	Isorel(A)24_b	05.12.2013 16:37	13,26	130219	11,50
3	Isorel(A)24_c	05.12.2013 17:47	13,31	130617	11,50
4	Isorel(A)24_d	05.12.2013 18:58	13,27	130361	11,50
5	Isorel(A)24_e	05.12.2013 21:19	13,29	129876	11,50
6	Isorel(A)24_f	05.12.2013 22:29	13,28	130246	11,50
Mittelwert			13,29	130287,00	11,50
SD			0,02	246,19	
<b>% RSD</b>			0,15	0,19	

### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläcbe	Gehalt ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	Isorel(A)24_a	05.12.2013 15:26	16,38	3281	0,24
2	Isorel(A)24_b	05.12.2013 16:37	16,35	3170	0,23
3	Isorel(A)24_c	05.12.2013 17:47	16,39	3288	0,24
4	Isorel(A)24_d	05.12.2013 18:58	16,35	3130	0,23
5	Isorel(A)24_e	05.12.2013 21:19	16,36	3245	0,24
6	Isorel(A)24_f	05.12.2013 22:29	16,36	3239	0,24
Mittelwert			16,36	3225,50	0,24
SD			0,02	62,85	0,00
<b>% RSD</b>			0,10	1,95	<b>1,92</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)24_a	05.12.2013 15:26	17,15	108922	10,77
2	Isorel(A)24_b	05.12.2013 16:37	17,12	108965	10,79
3	Isorel(A)24_c	05.12.2013 17:47	17,15	108881	10,75
4	Isorel(A)24_d	05.12.2013 18:58	17,12	108976	10,78
5	Isorel(A)24_e	05.12.2013 21:19	17,13	108400	10,76
6	Isorel(A)24_f	05.12.2013 22:29	17,12	108477	10,74
Mittelwert			17,13	108770,17	10,77
SD			0,02	260,24	0,02
<b>% RSD</b>			0,10	0,24	<b>0,18</b>

### Isorel (A) 36

#### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)36_a	05.12.2013 23:40	13,27	116703	11,50
2	Isorel(A)36_b	06.12.2013 02:01	13,27	106952	11,50
3	Isorel(A)36_c	06.12.2013 03:12	13,30	108424	11,50
4	Isorel(A)36_d	06.12.2013 04:22	13,27	112630	11,50
5	Isorel(A)36_e	06.12.2013 05:33	13,28	113053	11,50
6	Isorel(A)36_f	06.12.2013 06:43	13,30	112249	11,50
Mittelwert			13,28	111668,50	11,50
SD			0,01	3501,33	
<b>% RSD</b>			0,11	3,14	

#### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)36_a	05.12.2013 23:40	16,37	4552	0,37
2	Isorel(A)36_b	06.12.2013 02:01	16,34	4076	0,36
3	Isorel(A)36_c	06.12.2013 03:12	16,38	4173	0,37
4	Isorel(A)36_d	06.12.2013 04:22	16,35	4285	0,36
5	Isorel(A)36_e	06.12.2013 05:33	16,38	4269	0,36
6	Isorel(A)36_f	06.12.2013 06:43	16,38	4461	0,38
Mittelwert			16,37	4302,67	0,37
SD			0,02	177,13	0,01
<b>% RSD</b>			0,11	4,12	<b>1,91</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)36_a	05.12.2013 23:40	17,14	136717	15,11
2	Isorel(A)36_b	06.12.2013 02:01	17,11	123051	14,84
3	Isorel(A)36_c	06.12.2013 03:12	17,15	124999	14,87
4	Isorel(A)36_d	06.12.2013 04:22	17,11	130329	14,92
5	Isorel(A)36_e	06.12.2013 05:33	17,15	130631	14,90
6	Isorel(A)36_f	06.12.2013 06:43	17,15	130070	14,95
Mittelwert			17,14	129299,50	14,93
SD			0,02	4816,30	0,10
<b>% RSD</b>			0,11	3,72	<b>0,64</b>

### Isorel (A) 60

#### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)60_a	09.12.2013 02:28	13,28	112661	11,50
2	Isorel(A)60_b	09.12.2013 03:38	13,29	112808	11,50
3	Isorel(A)60_c	09.12.2013 04:49	13,27	111696	11,50
4	Isorel(A)60_d	09.12.2013 05:59	13,26	112931	11,50
5	Isorel(A)60_e	09.12.2013 07:10	13,28	107733	11,50
6	Isorel(A)60_f	09.12.2013 09:31	13,26	104576	11,50
Mittelwert			13,27	110400,83	11,50
SD			0,01	3464,91	0,00
<b>% RSD</b>			0,11	3,14	0,00

#### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)60_a	09.12.2013 02:28	16,39	2659	0,22
2	Isorel(A)60_b	09.12.2013 03:38	16,38	2749	0,23
3	Isorel(A)60_c	09.12.2013 04:49	16,36	2630	0,22
4	Isorel(A)60_d	09.12.2013 05:59	16,35	2650	0,22
5	Isorel(A)60_e	09.12.2013 07:10	16,39	2518	0,22
6	Isorel(A)60_f	09.12.2013 09:31	16,35	2558	0,23
Mittelwert			16,37	2627,33	0,23
SD			0,02	81,35	0,00
<b>% RSD</b>			0,10	3,10	<b>2,02</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)60_a	09.12.2013 02:28	17,15	177434	20,31
2	Isorel(A)60_b	09.12.2013 03:38	17,14	179464	20,52
3	Isorel(A)60_c	09.12.2013 04:49	17,12	178678	20,63
4	Isorel(A)60_d	09.12.2013 05:59	17,12	179500	20,50
5	Isorel(A)60_e	09.12.2013 07:10	17,15	170220	20,38
6	Isorel(A)60_f	09.12.2013 09:31	17,12	167298	20,63
Mittelwert			17,13	175432,33	20,50
SD			0,02	5304,28	0,13
<b>% RSD</b>			0,10	3,02	<b>0,64</b>

### Isorel (M) 01

#### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)01_a	09.12.2013 12:04	13,29	84608,00	11,50
2	Isorel(M)01_b	09.12.2013 13:14	13,28	88706,00	11,50
3	Isorel(M)01_c	09.12.2013 14:25	13,27	94330,00	11,50
4	Isorel(M)01_d	09.12.2013 16:46	13,28	90112,00	11,50
5	Isorel(M)01_e	09.12.2013 17:56	13,28	87688,00	11,50
6	Isorel(M)01_f	09.12.2013 19:07	13,28	88556,00	11,50
Mittelwert			13,28	89000,00	11,50
SD			0,01	3191,87	
<b>% RSD</b>			0,07	3,59	

#### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)01_a	09.12.2013 12:04	16,37	3762,00	0,04
2	Isorel(M)01_b	09.12.2013 13:14	16,35	3982,00	0,04
3	Isorel(M)01_c	09.12.2013 14:25	16,34	4005,00	0,04
4	Isorel(M)01_d	09.12.2013 16:46	16,35	3900,00	0,04
5	Isorel(M)01_e	09.12.2013 17:56	16,36	4083,00	0,04
6	Isorel(M)01_f	09.12.2013 19:07	16,37	3845,00	0,04
Mittelwert			16,36	3929,50	0,04
SD			0,01	116,69	0,00
<b>% RSD</b>			0,07	2,97	<b>3,30</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	Isorel(M)01_a	09.12.2013 12:04	17,13	14266,00	0,22
2	Isorel(M)01_b	09.12.2013 13:14	17,11	13897,00	0,20
3	Isorel(M)01_c	09.12.2013 14:25	17,11	14673,00	0,20
4	Isorel(M)01_d	09.12.2013 16:46	17,12	14448,00	0,21
5	Isorel(M)01_e	09.12.2013 17:56	17,13	13835,00	0,20
6	Isorel(M)01_f	09.12.2013 19:07	17,14	14161,00	0,21
Mittelwert			17,12	14213,33	0,21
SD			0,01	320,96	0,01
<b>% RSD</b>			0,08	2,26	<b>2,93</b>

### Isorel (M) 06

### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	Isorel(M)06_a	02.12.2013 17:48	13,32	127176	11,50
2	Isorel(M)06_b	02.12.2013 18:59	13,30	127551	11,50
3	Isorel(M)06_c	02.12.2013 20:09	13,30	127881	11,50
4	Isorel(M)06_d	02.12.2013 21:20	13,30	127274	11,50
5	Isorel(M)06_e	02.12.2013 22:30	13,27	128362	11,50
6	Isorel(M)06_f	02.12.2013 23:41	13,30	128043	11,50
Mittelwert			13,30	127714,50	11,50
SD			0,02	461,659	
<b>% RSD</b>			0,11	0,36	

### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	Isorel(M)06_a	02.12.2013 17:48	n,d,	n.d.	n.d.
2	Isorel(M)06_b	02.12.2013 18:59	n,d,	n.d.	n.d.
3	Isorel(M)06_c	02.12.2013 20:09	n,d,	n.d.	n.d.
4	Isorel(M)06_d	02.12.2013 21:20	n,d,	n.d.	n.d.
5	Isorel(M)06_e	02.12.2013 22:30	n,d,	n.d.	n.d.
6	Isorel(M)06_f	02.12.2013 23:41	n,d,	n.d.	n.d.

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)06_a	02.12.2013 17:48	17,17	6643	0,67
2	Isorel(M)06_b	02.12.2013 18:59	17,13	6690	0,68
3	Isorel(M)06_c	02.12.2013 20:09	17,15	6663	0,67
4	Isorel(M)06_d	02.12.2013 21:20	17,12	6489	0,66
5	Isorel(M)06_e	02.12.2013 22:30	17,11	6464	0,65
6	Isorel(M)06_f	02.12.2013 23:41	17,15	6485	0,65
Mittelwert			17,14	6572,33	0,66
SD			0,02	103,312	0,01
% RSD			0,12	1,57	<b>1,76</b>

### Isorel (M) 12

#### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)12_a	03.12.2013 00:51	13,29	128538	11,50
2	Isorel(M)12_b	03.12.2013 02:02	13,28	129039	11,50
3	Isorel(M)12_c	03.12.2013 03:12	13,27	128100	11,50
4	Isorel(M)12_d	03.12.2013 04:23	13,27	127922	11,50
5	Isorel(M)12_e	03.12.2013 05:33	13,28	128727	11,50
6	Isorel(M)12_f	03.12.2013 07:54	13,27	129376	11,50
Mittelwert			13,28	128617,00	11,50
SD			0,01	551,87	
% RSD			0,06	0,43	

#### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)12_a	03.12.2013 00:51	16,36	2801	0,21
2	Isorel(M)12_b	03.12.2013 02:02	16,40	2841	0,21
3	Isorel(M)12_c	03.12.2013 03:12	16,35	2857	0,21
4	Isorel(M)12_d	03.12.2013 04:23	16,36	2783	0,21
5	Isorel(M)12_e	03.12.2013 05:33	16,39	2766	0,20
6	Isorel(M)12_f	03.12.2013 07:54	16,38	2850	0,21
Mittelwert			16,37	2816,33	0,21
SD			0,02	38,15	0,00
% RSD			0,12	1,35	<b>1,28</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)12_a	03.12.2013 00:51	17,11	24026	2,41
2	Isorel(M)12_b	03.12.2013 02:02	17,14	23902	2,39
3	Isorel(M)12_c	03.12.2013 03:12	17,10	23689	2,39
4	Isorel(M)12_d	03.12.2013 04:23	17,11	23815	2,40
5	Isorel(M)12_e	03.12.2013 05:33	17,14	23758	2,38
6	Isorel(M)12_f	03.12.2013 07:54	17,14	23678	2,36
Mittelwert			17,12	23811,33	2,39
SD			0,02	134,09	0,02
<b>% RSD</b>			0,09	0,56	<b>0,73</b>

### Isorel (M) 24

### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)24_a	03.12.2013 09:05	13,26	131515	11,50
2	Isorel(M)24_b	03.12.2013 10:15	13,24	131019	11,50
3	Isorel(M)24_c	03.12.2013 11:26	13,27	130250	11,50
4	Isorel(M)24_d	03.12.2013 12:37	13,30	130706	11,50
5	Isorel(M)24_e	03.12.2013 14:58	13,30	129607	11,50
6	Isorel(M)24_f	03.12.2013 16:08	13,28	130051	11,50
Mittelwert			13,28	130524,67	11,50
SD			0,02	692,81	
<b>% RSD</b>			0,18	0,53	

### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)24_a	03.12.2013 09:05	16,36	7473	0,54
2	Isorel(M)24_b	03.12.2013 10:15	16,35	7516	0,55
3	Isorel(M)24_c	03.12.2013 11:26	16,39	7508	0,55
4	Isorel(M)24_d	03.12.2013 12:37	16,43	7301	0,53
5	Isorel(M)24_e	03.12.2013 14:58	16,42	7448	0,55
6	Isorel(M)24_f	03.12.2013 16:08	16,38	7502	0,55
Mittelwert			16,39	7458,00	0,54
SD			0,03	80,96	0,01
<b>% RSD</b>			0,20	1,09	<b>1,23</b>

Anhang

Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)24_a	03.12.2013 09:05	17,10	73263	7,18
2	Isorel(M)24_b	03.12.2013 10:15	17,10	73251	7,21
3	Isorel(M)24_c	03.12.2013 11:26	17,14	73721	7,30
4	Isorel(M)24_d	03.12.2013 12:37	17,19	73384	7,24
5	Isorel(M)24_e	03.12.2013 14:58	17,17	73286	7,29
6	Isorel(M)24_f	03.12.2013 16:08	17,13	72756	7,22
Mittelwert			17,14	73276,83	7,24
SD			0,04	310,15	0,05
% RSD			0,21	0,42	<b>0,64</b>

Isorel (M) 36

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)36_a	03.12.2013 17:19	13,27	134410	11,50
2	Isorel(M)36_b	03.12.2013 18:29	13,29	133297	11,50
3	Isorel(M)36_c	03.12.2013 20:50	13,27	133709	11,50
4	Isorel(M)36_d	03.12.2013 22:01	13,29	133716	11,50
5	Isorel(M)36_e	03.12.2013 23:11	13,25	133027	11,50
6	Isorel(M)36_f	04.12.2013 00:22	13,27	132824	11,50
Mittelwert			13,27	133497,17	11,50
SD			0,01	572,77	
% RSD			0,10	0,43	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)36_a	03.12.2013 17:19	16,38	5821	0,41
2	Isorel(M)36_b	03.12.2013 18:29	16,42	5731	0,41
3	Isorel(M)36_c	03.12.2013 20:50	16,38	5911	0,42
4	Isorel(M)36_d	03.12.2013 22:01	16,40	5808	0,41
5	Isorel(M)36_e	03.12.2013 23:11	16,35	5875	0,42
6	Isorel(M)36_f	04.12.2013 00:22	16,40	5826	0,42
Mittelwert			16,39	5828,67	0,42
SD			0,02	61,57	0,00
% RSD			0,15	1,06	<b>1,13</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)36_a	03.12.2013 17:19	17,12	66703	6,40
2	Isorel(M)36_b	03.12.2013 18:29	17,17	66678	6,45
3	Isorel(M)36_c	03.12.2013 20:50	17,12	66487	6,41
4	Isorel(M)36_d	03.12.2013 22:01	17,16	66600	6,42
5	Isorel(M)36_e	03.12.2013 23:11	17,10	66479	6,45
6	Isorel(M)36_f	04.12.2013 00:22	17,14	66332	6,44
Mittelwert			17,14	66546,50	6,43
SD			0,03	140,54	0,02
<b>% RSD</b>			0,15	0,21	<b>0,31</b>

### Isorel (M) 60

### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)60_a	04.12.2013 01:32	13,29	134696	11,50
2	Isorel(M)60_b	04.12.2013 02:43	13,28	135095	11,50
3	Isorel(M)60_c	04.12.2013 03:54	13,26	135399	11,50
4	Isorel(M)60_d	04.12.2013 05:04	13,27	135427	11,50
5	Isorel(M)60_e	04.12.2013 06:15	13,28	134810	11,50
6	Isorel(M)60_f	04.12.2013 07:25	13,26	133666	11,50
Mittelwert			13,27	134848,83	11,50
SD			0,01	651,39	
<b>% RSD</b>			0,09	0,48	

### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)60_a	04.12.2013 01:32	16,39	10113	0,71
2	Isorel(M)60_b	04.12.2013 02:43	16,37	10298	0,73
3	Isorel(M)60_c	04.12.2013 03:54	16,37	10318	0,73
4	Isorel(M)60_d	04.12.2013 05:04	16,38	10173	0,72
5	Isorel(M)60_e	04.12.2013 06:15	16,38	10098	0,71
6	Isorel(M)60_f	04.12.2013 07:25	16,36	10142	0,72
Mittelwert			16,38	10190,33	0,72
SD			0,01	94,90	0,01
<b>% RSD</b>			0,07	0,93	<b>0,80</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)60_a	04.12.2013 01:32	17,14	96762	9,27
2	Isorel(M)60_b	04.12.2013 02:43	17,12	97503	9,31
3	Isorel(M)60_c	04.12.2013 03:54	17,12	97543	9,29
4	Isorel(M)60_d	04.12.2013 05:04	17,14	97818	9,32
5	Isorel(M)60_e	04.12.2013 06:15	17,13	97113	9,29
6	Isorel(M)60_f	04.12.2013 07:25	17,12	96356	9,30
Mittelwert			17,13	97182,50	9,30
SD			0,01	547,96	0,02
% RSD			0,07	0,56	<b>0,19</b>

### Isorel (P) 01

#### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)01_a	06.12.2013 18:02	13,25	94655	11,50
2	Isorel(P)01_b	06.12.2013 19:12	13,26	96036	11,50
3	Isorel(P)01_c	06.12.2013 20:23	13,28	93709	11,50
4	Isorel(P)01_d	06.12.2013 21:33	13,30	94819	11,50
5	Isorel(P)01_e	06.12.2013 22:44	13,25	95706	11,50
6	Isorel(P)01_f	06.12.2013 23:55	13,26	94832	11,50
Mittelwert			13,27	94959,50	
SD			0,02	825,66	
% RSD			0,13	0,87	

#### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)01_a	06.12.2013 18:02	16,38	3105	0,03
2	Isorel(P)01_b	06.12.2013 19:12	16,39	3004	0,03
3	Isorel(P)01_c	06.12.2013 20:23	16,40	3034	0,03
4	Isorel(P)01_d	06.12.2013 21:33	16,40	3078	0,03
5	Isorel(P)01_e	06.12.2013 22:44	16,35	3072	0,03
6	Isorel(P)01_f	06.12.2013 23:55	16,38	3018	0,03
Mittelwert			16,38	3051,83	0,03
SD			0,02	39,16	0,00
% RSD			0,11	1,283	<b>1,67</b>

## Anhang

Syringenin-apiosyl-glucosid
-----------------------------

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)01_a	06.12.2013 18:02	17,13	81296	1,11
2	Isorel(P)01_b	06.12.2013 19:12	17,14	81766	1,10
3	Isorel(P)01_c	06.12.2013 20:23	17,16	79067	1,09
4	Isorel(P)01_d	06.12.2013 21:33	17,15	79967	1,09
5	Isorel(P)01_e	06.12.2013 22:44	17,11	80451	1,08
6	Isorel(P)01_f	06.12.2013 23:55	17,14	79307	1,08
Mittelwert			17,14	80309,00	1,09
SD			0,02	1075,24	0,01
<b>% RSD</b>			0,10	1,34	<b>0,96</b>

<b>Isorel (P) 06</b>
----------------------

Theophyllin
-------------

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)06_a	29.11.2013 14:17	13,30	129509	11,50
2	Isorel(P)06_b	29.11.2013 21:20	13,27	129403	11,50
3	Isorel(P)06_c	30.11.2013 04:23	13,24	128147	11,50
4	Isorel(P)06_d	30.11.2013 11:26	13,26	127330	11,50
5	Isorel(P)06_e	30.11.2013 18:30	13,29	125348	11,50
6	Isorel(P)06_f	01.12.2013 01:33	13,28	124694	11,50
Mittelwert			13,27	127405,17	11,50
SD			0,02	2027,60	
<b>% RSD</b>			0,17	1,59	

Syringin
----------

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)06_a	29.11.2013 14:17	16,39	1832	0,13
2	Isorel(P)06_b	29.11.2013 21:20	16,36	1723	0,13
3	Isorel(P)06_c	30.11.2013 04:23	16,36	1710	0,13
4	Isorel(P)06_d	30.11.2013 11:26	16,36	1735	0,13
5	Isorel(P)06_e	30.11.2013 18:30	16,38	1727	0,13
6	Isorel(P)06_f	01.12.2013 01:33	16,39	1732	0,13
Mittelwert			16,37	1743,17	0,13
SD			0,02	44,39	0,00
<b>% RSD</b>			0,09	2,55	<b>2,36</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)06_a	29.11.2013 14:17	17,12	67504	6,72
2	Isorel(P)06_b	29.11.2013 21:20	17,11	67318	6,71
3	Isorel(P)06_c	30.11.2013 04:23	17,11	66925	6,74
4	Isorel(P)06_d	30.11.2013 11:26	17,11	67145	6,80
5	Isorel(P)06_e	30.11.2013 18:30	17,13	66366	6,83
6	Isorel(P)06_f	01.12.2013 01:33	17,14	65349	6,76
Mittelwert			17,12	66768,00	6,76
SD			0,02	798,27	0,05
<b>% RSD</b>			0,09	1,20	<b>0,69</b>

### Isorel (P) 12

#### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)12_a	29.11.2013 15:27	13,27	129713	11,50
2	Isorel(P)12_b	29.11.2013 22:30	13,24	128946	11,50
3	Isorel(P)12_c	30.11.2013 05:34	13,28	128688	11,50
4	Isorel(P)12_d	30.11.2013 12:37	13,27	127017	11,50
5	Isorel(P)12_e	30.11.2013 19:40	13,27	125845	11,50
6	Isorel(P)12_f	01.12.2013 02:44	13,28	126204	11,50
Mittelwert			13,27	127735,50	
SD			0,01	1594,92	
<b>% RSD</b>			0,11	1,25	

#### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)12_a	29.11.2013 15:27	16,34	7109	0,52
2	Isorel(P)12_b	29.11.2013 22:30	16,34	6801	0,50
3	Isorel(P)12_c	30.11.2013 05:34	16,37	6741	0,50
4	Isorel(P)12_d	30.11.2013 12:37	16,37	6783	0,51
5	Isorel(P)12_e	30.11.2013 19:40	16,35	6673	0,50
6	Isorel(P)12_f	01.12.2013 02:44	16,36	6548	0,49
Mittelwert			16,35	6775,83	0,50
SD			0,02	187,29	0,01
<b>% RSD</b>			0,10	2,76	<b>1,91</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)12_a	29.11.2013 15:27	17,10	107278	10,67
2	Isorel(P)12_b	29.11.2013 22:30	17,10	106783	10,68
3	Isorel(P)12_c	30.11.2013 05:34	17,13	106387	10,66
4	Isorel(P)12_d	30.11.2013 12:37	17,14	106141	10,78
5	Isorel(P)12_e	30.11.2013 19:40	17,11	105102	10,77
6	Isorel(P)12_f	01.12.2013 02:44	17,12	104974	10,73
Mittelwert			17,12	106110,83	10,71
SD			0,02	916,67	0,05
<b>% RSD</b>			0,10	0,86	<b>0,49</b>

### Isorel (P) 24

### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)24_a	29.11.2013 16:38	13,28	129785	11,50
2	Isorel(P)24_b	29.11.2013 23:41	13,26	129210	11,50
3	Isorel(P)24_c	30.11.2013 06:44	13,27	129362	11,50
4	Isorel(P)24_d	30.11.2013 13:48	13,32	126789	11,50
5	Isorel(P)24_e	30.11.2013 20:51	13,26	126421	11,50
6	Isorel(P)24_f	01.12.2013 03:54	13,26	125404	11,50
Mittelwert			13,27	127828,50	11,50
SD			0,03	1845,42	
<b>% RSD</b>			0,20	1,44	

### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)24_a	29.11.2013 16:38	16,36	21603	1,58
2	Isorel(P)24_b	29.11.2013 23:41	16,35	21354	1,57
3	Isorel(P)24_c	30.11.2013 06:44	16,34	21467	1,58
4	Isorel(P)24_d	30.11.2013 13:48	16,45	20767	1,56
5	Isorel(P)24_e	30.11.2013 20:51	16,35	20838	1,57
6	Isorel(P)24_f	01.12.2013 03:54	16,33	20674	1,57
Mittelwert			16,36	21117,17	1,57
SD			0,04	402,85	0,01
<b>% RSD</b>			0,25	1,91	<b>0,57</b>

## Anhang

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)24_a	29.11.2013 16:38	17,13	173393	17,23
2	Isorel(P)24_b	29.11.2013 23:41	17,12	172748	17,24
3	Isorel(P)24_c	30.11.2013 06:44	17,10	174519	17,40
4	Isorel(P)24_d	30.11.2013 13:48	17,22	171978	17,49
5	Isorel(P)24_e	30.11.2013 20:51	17,12	171114	17,46
6	Isorel(P)24_f	01.12.2013 03:54	17,10	169536	17,44
Mittelwert			17,13	172214,67	17,38
SD			0,04	1756,45	0,11
% RSD			0,25	1,02	<b>0,65</b>

### Isorel (P) 36

### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)36_a	29.11.2013 17:48	13,26	129877	11,50
2	Isorel(P)36_b	30.11.2013 00:52	13,27	131498	11,50
3	Isorel(P)36_c	30.11.2013 07:55	13,25	132578	11,50
4	Isorel(P)36_d	30.11.2013 14:58	13,31	131030	11,50
5	Isorel(P)36_e	30.11.2013 22:01	13,28	126613	11,50
6	Isorel(P)36_f	01.12.2013 05:05	13,27	124569	11,50
Mittelwert			13,27	129360,83	
SD			0,02	3113,92	
% RSD			0,16	2,41	

### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)36_a	29.11.2013 17:48	16,33	28556	2,09
2	Isorel(P)36_b	30.11.2013 00:52	16,36	27800	2,01
3	Isorel(P)36_c	30.11.2013 07:55	16,33	27994	2,01
4	Isorel(P)36_d	30.11.2013 14:58	16,40	27339	1,99
5	Isorel(P)36_e	30.11.2013 22:01	16,37	27035	2,03
6	Isorel(P)36_f	01.12.2013 05:05	16,37	26370	2,02
Mittelwert			16,36	27515,67	2,02
SD			0,03	770,29	0,04
% RSD			0,16	2,80	<b>1,80</b>

Anhang

Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)36_a	29.11.2013 17:48	17,09	244259	24,26
2	Isorel(P)36_b	30.11.2013 00:52	17,12	249910	24,51
3	Isorel(P)36_c	30.11.2013 07:55	17,09	252989	24,61
4	Isorel(P)36_d	30.11.2013 14:58	17,17	252384	24,84
5	Isorel(P)36_e	30.11.2013 22:01	17,13	245014	24,96
6	Isorel(P)36_f	01.12.2013 05:05	17,14	240519	24,90
Mittelwert			17,12	247512,50	24,68
SD			0,03	5004,17	0,27
<b>% RSD</b>			0,17	2,02	<b>1,10</b>

Isorel (P) 60

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60_a	29.11.2013 18:59	13,25	134353	11,50
2	Isorel(P)60_b	30.11.2013 02:02	13,26	135806	11,50
3	Isorel(P)60_c	30.11.2013 09:05	13,26	135037	11,50
4	Isorel(P)60_d	30.11.2013 16:09	13,29	133326	11,50
5	Isorel(P)60_e	30.11.2013 23:12	13,25	131808	11,50
6	Isorel(P)60_f	01.12.2013 06:15	13,27	130649	11,50
Mittelwert			13,26	133496,50	11,50
SD			0,02	1971,24	
<b>% RSD</b>			0,12	1,48	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60_a	29.11.2013 18:59	16,34	71771	5,09
2	Isorel(P)60_b	30.11.2013 02:02	16,33	72171	5,06
3	Isorel(P)60_c	30.11.2013 09:05	16,36	72059	5,08
4	Isorel(P)60_d	30.11.2013 16:09	16,40	70975	5,07
5	Isorel(P)60_e	30.11.2013 23:12	16,33	70516	5,09
6	Isorel(P)60_f	01.12.2013 06:15	16,34	69919	5,09
Mittelwert			16,35	71235,17	5,08
SD			0,03	912,01	0,01
<b>% RSD</b>			0,16	1,28	<b>0,28</b>

## Anhang

---

Syringenin-apiosyl-glucosid
-----------------------------

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60_a	29.11.2013 18:59	17,10	638607	61,31
2	Isorel(P)60_b	30.11.2013 02:02	17,09	645090	61,27
3	Isorel(P)60_c	30.11.2013 09:05	17,13	644782	61,58
4	Isorel(P)60_d	30.11.2013 16:09	17,17	638127	61,73
5	Isorel(P)60_e	30.11.2013 23:12	17,10	632805	61,92
6	Isorel(P)60_f	01.12.2013 06:15	17,11	628850	62,08
Mittelwert			17,11	638043,50	61,64
SD			0,03	6439,68	0,33
<b>% RSD</b>			0,16	1,01	<b>0,53</b>

Tabelle IV: Linearität

<b>Syringin a</b>
-------------------

Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Syringinlg_1a	14.01.2014 13:56	16,37	4176	0,23
2	Syringinlg_1b	14.01.2014 18:38	16,29	4262	0,24
3	Syringinlg_1c	14.01.2014 23:20	16,32	4329	0,24
4	Syringinlg_1d	15.01.2014 04:03	16,31	4280	0,24
5	Syringinlg_1e	15.01.2014 08:45	16,30	4270	0,24
6	Syringinlg_1f	15.01.2014 13:27	16,34	4334	0,24
Mittelwert			16,32	4275	
SD			0,03	57,30	
<b>% RSD</b>			0,18	<b>1,34</b>	

<b>Syringin b</b>
-------------------

Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Syringinlg_2a	14.01.2014 15:07	16,33	41596	3,09
2	Syringinlg_2b	14.01.2014 19:49	16,32	40767	3,03
3	Syringinlg_2c	15.01.2014 00:31	16,34	41652	3,10
4	Syringinlg_2d	15.01.2014 05:13	16,32	41441	3,08
5	Syringinlg_2e	15.01.2014 09:55	16,32	41319	3,07
6	Syringinlg_2f	15.01.2014 14:37	16,35	41583	3,09
Mittelwert			16,33	41393	
SD			0,01	329,86	
<b>% RSD</b>			0,07	<b>0,80</b>	

<b>Syringin c</b>
-------------------

Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Syringinlg_3a	14.01.2014 16:17	16,37	199123	15,15
2	Syringinlg_3b	14.01.2014 20:59	16,30	197505	15,03
3	Syringinlg_3c	15.01.2014 01:41	16,28	196258	14,93
4	Syringinlg_3d	15.01.2014 06:24	16,30	195716	14,89
5	Syringinlg_3e	15.01.2014 11:06	16,33	197258	15,01
6	Syringinlg_3f	15.01.2014 15:48	16,36	195870	14,90
Mittelwert			16,32	196955	
SD			0,04	1287,84	
<b>% RSD</b>			0,22	<b>0,65</b>	

Tabelle V: Richtigkeit

<b>Isorel (P) 60 I</b>
------------------------

<b>Isorel (P) 60</b>
----------------------

Theophyllin					
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 a	08.01.2014 00:00	13,19	134575	11,50
2	Isorel(P)60 b	08.01.2014 01:10	13,21	142131	11,50
3	Isorel(P)60 c	08.01.2014 02:21	13,23	141194	11,50
4	Isorel(P)60 d	08.01.2014 03:31	13,25	141769	11,50
5	Isorel(P)60 e	08.01.2014 04:42	13,25	141700	11,50
6	Isorel(P)60 f	08.01.2014 05:52	13,24	141202	11,50
MW			13,23	140428,50	11,50
SD			0,02	2889,98	
% RSD			0,19	2,06	

Syringin					
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 a	08.01.2014 00:00	16,27	70409	4,98
2	Isorel(P)60 b	08.01.2014 01:10	16,30	70512	4,72
3	Isorel(P)60 c	08.01.2014 02:21	16,32	69298	4,67
4	Isorel(P)60 d	08.01.2014 03:31	16,33	70103	4,71
5	Isorel(P)60 e	08.01.2014 04:42	16,32	70410	4,73
6	Isorel(P)60 f	08.01.2014 05:52	16,31	70246	4,74
MW			16,31	70163,00	4,76
SD			0,02	447,67	0,11
% RSD			0,14	0,64	2,34

<b>Syringin I</b>
-------------------

Theophyllin					
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Syringin Ia	09.01.2014 21:51	13,20	130564	11,50
2	Syringin Ib	09.01.2014 23:02	13,23	130821	11,50
3	Syringin Ic	10.01.2014 00:12	13,23	130566	11,50
4	Syringin Id	10.01.2014 01:23	13,25	130418	11,50
5	Syringin Ie	10.01.2014 02:33	13,23	130755	11,50
6	Syringin If	10.01.2014 03:44	13,21	130705	11,50
MW			13,27	130638,17	11,50
SD			0,02	148,81	
% RSD			0,12	0,11	

Anhang

Syringin					
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Syringin Ia	09.01.2014 21:51	16,28	80586	5,88
2	Syringin Ib	09.01.2014 23:02	16,31	80418	5,85
3	Syringin Ic	10.01.2014 00:12	16,31	80094	5,84
4	Syringin Id	10.01.2014 01:23	16,32	80125	5,85
5	Syringin Ie	10.01.2014 02:33	16,28	80763	5,88
6	Syringin If	10.01.2014 03:44	16,27	80296	5,85
MW			16,30	80380,33	5,86
SD			0,02	262,47	0,02
% RSD			0,13	0,33	0,30

**Isorel (P) 60 dotiert I**

Theophyllin					
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 dot. Ia	08.01.2014 16:28	13,20	133383	11,50
2	Isorel(P)60 dot. Ib	08.01.2014 17:38	13,23	135224	11,50
3	Isorel(P)60 dot. Ic	08.01.2014 18:49	13,20	134571	11,50
4	Isorel(P)60 dot. Id	08.01.2014 19:59	13,21	136229	11,50
5	Isorel(P)60 dot. Ie	08.01.2014 22:20	13,24	134263	11,50
6	Isorel(P)60 dot. If	08.01.2014 23:31	13,21	134837	11,50
MW			13,21	134751,17	11,50
SD			0,02	954,73	
% RSD			0,13	0,71	

Syringin						Wieder- findung (%)
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)	
1	Isorel(P)60 dot. Ia	08.01.2014 16:28	16,27	71515	10,21	95,98
2	Isorel(P)60 dot. Ib	08.01.2014 17:38	16,30	71364	10,05	94,69
3	Isorel(P)60 dot. Ic	08.01.2014 18:49	16,26	72566	10,27	96,86
4	Isorel(P)60 dot. Id	08.01.2014 19:59	16,28	72562	10,14	95,59
5	Isorel(P)60 dot. Ie	08.01.2014 22:20	16,31	72172	10,23	96,19
6	Isorel(P)60 dot. If	08.01.2014 23:31	16,27	73372	10,36	97,66
MW			16,28	72258,50	10,18	<b>95,86</b>
SD			0,02	746,59	0,09	0,80
% RSD			0,13	1,03	0,85	<b>0,84</b>

Anhang

**Isorel (P) 60 II**

**Isorel (P) 60**

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 a	08.01.2014 00:00	13,19	134575	11,50
2	Isorel(P)60 b	08.01.2014 01:10	13,21	142131	11,50
3	Isorel(P)60 c	08.01.2014 02:21	13,23	141194	11,50
4	Isorel(P)60 d	08.01.2014 03:31	13,25	141769	11,50
5	Isorel(P)60 e	08.01.2014 04:42	13,25	141700	11,50
6	Isorel(P)60 f	08.01.2014 05:52	13,24	141202	11,50
MW			13,23	140428,50	11,50
SD			0,02	2889,98	
% RSD			0,19	2,06	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 a	08.01.2014 00:00	16,27	70409	4,98
2	Isorel(P)60 b	08.01.2014 01:10	16,30	70512	4,72
3	Isorel(P)60 c	08.01.2014 02:21	16,32	69298	4,67
4	Isorel(P)60 d	08.01.2014 03:31	16,33	70103	4,71
5	Isorel(P)60 e	08.01.2014 04:42	16,32	70410	4,73
6	Isorel(P)60 f	08.01.2014 05:52	16,31	70246	4,74
MW			16,31	70163,00	4,76
SD			0,02	447,67	0,11
% RSD			0,14	0,64	2,34

**Syringin II**

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Syringin IIa	10.01.2014 06:05	13,19	129680	11,50
2	Syringin IIb	10.01.2014 07:16	13,22	129532	11,50
3	Syringin IIc	10.01.2014 08:26	13,23	129615	11,50
4	Syringin IId	10.01.2014 09:37	13,23	130275	11,50
5	Syringin IIe	10.01.2014 10:47	13,21	129996	11,50
6	Syringin IIf	10.01.2014 11:58	13,21	129861	11,50
MW			13,21	129826,50	11,50
SD			0,01	277,13	
% RSD			0,11	0,21	

## Anhang

Syringin					
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Syringin IIa	10.01.2014 06:05	16,27	42886	3,15
2	Syringin IIb	10.01.2014 07:16	16,29	42950	3,16
3	Syringin IIc	10.01.2014 08:26	16,32	42079	3,09
4	Syringin IId	10.01.2014 09:37	16,30	43485	3,18
5	Syringin IIe	10.01.2014 10:47	16,28	42889	3,14
6	Syringin IIf	10.01.2014 11:58	16,28	43481	3,19
MW			16,29	42961,67	3,15
SD			0,02	516,49	0,03
% RSD			0,12	1,20	1,08

### Isorel (P) 60 dotiert II

Theophyllin					
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 dot. IIa	09.01.2014 00:41	13,22	134431	11,50
2	Isorel(P)60 dot. IIb	09.01.2014 01:52	13,21	133251	11,50
3	Isorel(P)60 dot. IIc	09.01.2014 03:03	13,21	133414	11,50
4	Isorel(P)60 dot. IID	09.01.2014 05:24	13,24	134818	11,50
5	Isorel(P)60 dot. IIe	09.01.2014 06:34	13,21	134703	11,50
6	Isorel(P)60 dot. IIf	09.01.2014 07:45	13,20	133218	11,50
MW			13,21	133972,50	11,50
SD			0,01	756,37	
% RSD			0,11	0,56	

### Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)	Wieder- findung (%)
1	Isorel(P)60 dot. IIa	09.01.2014 00:41	16,27	55850	7,91	100,02
2	Isorel(P)60 dot. IIb	09.01.2014 01:52	16,28	55786	7,97	100,69
3	Isorel(P)60 dot. IIc	09.01.2014 03:03	16,30	55405	7,91	100,72
4	Isorel(P)60 dot. IID	09.01.2014 05:24	16,30	55449	7,83	98,65
5	Isorel(P)60 dot. IIe	09.01.2014 06:34	16,27	55671	7,87	99,59
6	Isorel(P)60 dot. IIf	09.01.2014 07:45	16,27	56000	8,00	100,71
MW			16,28	55693,50	7,92	<b>100,06</b>
SD			0,02	232,60	0,06	0,83
% RSD			0,09	0,42	0,80	<b>0,83</b>

Anhang

**Isorel (P) 60 III**

**Isorel (P) 60**

**Theophyllin**

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 a	08.01.2014 00:00	13,19	134575	11,50
2	Isorel(P)60 b	08.01.2014 01:10	13,21	142131	11,50
3	Isorel(P)60 c	08.01.2014 02:21	13,23	141194	11,50
4	Isorel(P)60 d	08.01.2014 03:31	13,25	141769	11,50
5	Isorel(P)60 e	08.01.2014 04:42	13,25	141700	11,50
6	Isorel(P)60 f	08.01.2014 05:52	13,24	141202	11,50
MW			13,23	140428,50	11,50
SD			0,02	2889,98	
% RSD			0,19	2,06	

**Syringin**

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 a	08.01.2014 00:00	16,27	70409	4,98
2	Isorel(P)60 b	08.01.2014 01:10	16,30	70512	4,72
3	Isorel(P)60 c	08.01.2014 02:21	16,32	69298	4,67
4	Isorel(P)60 d	08.01.2014 03:31	16,33	70103	4,71
5	Isorel(P)60 e	08.01.2014 04:42	16,32	70410	4,73
6	Isorel(P)60 f	08.01.2014 05:52	16,31	70246	4,74
MW			16,31	70163,00	4,76
SD			0,02	447,67	0,11
% RSD			0,14	0,64	2,34

**Syringin III**

**Theophyllin**

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Syringin 3a	10.01.2014 16:40	13,26	129486	11,50
2	Syringin 3b	10.01.2014 16:40	13,25	129870	11,50
3	Syringin 3c	10.01.2014 17:50	13,24	129925	11,50
4	Syringin 3d	10.01.2014 19:01	13,22	129958	11,50
5	Syringin 3e	10.01.2014 20:11	13,20	129535	11,50
6	Syringin 3f	10.01.2014 21:22	13,22	129892	11,50
MW			13,23	129777,67	11,50
SD			0,02	209,66	
% RSD			0,16	0,16	

Anhang

Syringin					
Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Syringin 3a	10.01.2014 16:40	16,35	21270	1,56
2	Syringin 3b	10.01.2014 16:40	16,31	21625	1,59
3	Syringin 3c	10.01.2014 17:50	16,29	21237	1,56
4	Syringin 3d	10.01.2014 19:01	16,29	21798	1,60
5	Syringin 3e	10.01.2014 20:11	16,28	20992	1,54
6	Syringin 3f	10.01.2014 21:22	16,30	21927	1,61
MW			16,30	21474,83	1,58
SD			0,02	364,17	0,03
% RSD			0,14	1,70	1,59

**Isorel (P) 60 dotiert III**

Theophyllin					
Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 dot. IIIa	09.01.2014 10:06	13,21	136191	11,50
2	Isorel(P)60 dot. IIIb	09.01.2014 11:16	13,23	136714	11,50
3	Isorel(P)60 dot. IIIc	09.01.2014 13:37	13,22	133897	11,50
4	Isorel(P)60 dot. IIId	09.01.2014 14:48	13,20	135485	11,50
5	Isorel(P)60 dot. IIIe	09.01.2014 15:58	13,23	133577	11,50
6	Isorel(P)60 dot. IIIf	09.01.2014 17:09	13,25	134588	11,50
MW			13,22	135075,33	11,50
SD			0,02	1262,44	
% RSD			0,13	0,93	

Syringin						Wieder- findung (%)
Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)	
1	Isorel(P)60 dot. IIIa	09.01.2014 10:06	16,30	44967	6,29	99,41
2	Isorel(P)60 dot. IIIb	09.01.2014 11:16	16,32	44977	6,26	98,72
3	Isorel(P)60 dot. IIIc	09.01.2014 13:37	16,28	45321	6,44	102,03
4	Isorel(P)60 dot. IIId	09.01.2014 14:48	16,28	45165	6,35	99,85
5	Isorel(P)60 dot. IIIe	09.01.2014 15:58	16,32	44807	6,39	101,33
6	Isorel(P)60 dot. IIIf	09.01.2014 17:09	16,33	44882	6,35	99,72
MW			16,30	45019,83	6,35	<b>100,18</b>
SD			0,02	190,10	0,07	1,25
% RSD			0,13	0,42	1,04	<b>1,25</b>

Tabelle VII: Tag-zu-Tag-Präzision

<b>Isorel (A) 24 Tag 1</b>
----------------------------

			Theophyllin		
Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)24 a	12.12.2013 13:27	13,23	134755	11,50
2	Isorel(A)24 b	12.12.2013 14:38	13,26	129207	11,50
3	Isorel(A)24 c	12.12.2013 16:59	13,24	128730	11,50
4	Isorel(A)24 d	12.12.2013 18:09	13,21	127698	11,50
5	Isorel(A)24 e	12.12.2013 19:20	13,21	127269	11,50
6	Isorel(A)24 f	12.12.2013 20:31	13,24	126876	11,50
Mittelwert			13,23	129089,17	11,50
SD			0,02	2911,74	
% RSD			0,16	2,26	

			Syringin		
Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)24 a	12.12.2013 13:27	16,33	3418	0,24
2	Isorel(A)24 b	12.12.2013 14:38	16,37	3453	0,25
3	Isorel(A)24 c	12.12.2013 16:59	16,32	3430	0,25
4	Isorel(A)24 d	12.12.2013 18:09	16,30	3444	0,26
5	Isorel(A)24 e	12.12.2013 19:20	16,31	3388	0,25
6	Isorel(A)24 f	12.12.2013 20:31	16,34	3307	0,25
Mittelwert			16,33	3406,67	0,25
SD			0,02	53,84	0,006
% RSD			0,15	1,58	<b>2,22</b>
s <sup>2</sup>					0,00003

			Syringenin-apiosyl-glucosid		
Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)24 a	12.12.2013 13:27	17,09	108877	10,42
2	Isorel(A)24 b	12.12.2013 14:38	17,13	108903	10,87
3	Isorel(A)24 c	12.12.2013 16:59	17,09	108198	10,84
4	Isorel(A)24 d	12.12.2013 18:09	17,06	107576	10,87
5	Isorel(A)24 e	12.12.2013 19:20	17,08	107065	10,85
6	Isorel(A)24 f	12.12.2013 20:31	17,11	106596	10,84
Mittelwert			17,09	107869,17	10,78
SD			0,02	953,55	0,18
% RSD			0,14	0,88	<b>1,64</b>
s <sup>2</sup>					0,03125

Anhang

**Isorel (A) 24 Tag 2**

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)24 g	13.12.2013 18:51	13,25	124529	11,50
2	Isorel(A)24 h	13.12.2013 21:12	13,22	124609	11,50
3	Isorel(A)24 i	13.12.2013 22:22	13,23	124771	11,50
4	Isorel(A)24 j	13.12.2013 23:33	13,23	124391	11,50
5	Isorel(A)24 k	14.12.2013 00:44	13,23	124746	11,50
6	Isorel(A)24 l	14.12.2013 01:54	13,22	124576	11,50
Mittelwert			13,23	124603,67	11,50
SD			0,01	141,32	
% RSD			0,06	0,11	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)24 g	13.12.2013 18:51	16,34	3121	0,24
2	Isorel(A)24 h	13.12.2013 21:12	16,30	3200	0,24
3	Isorel(A)24 i	13.12.2013 22:22	16,32	3258	0,25
4	Isorel(A)24 j	13.12.2013 23:33	16,34	3177	0,24
5	Isorel(A)24 k	14.12.2013 00:44	16,31	3054	0,23
6	Isorel(A)24 l	14.12.2013 01:54	16,31	3262	0,25
Mittelwert			16,32	3178,67	0,24
SD			0,02	80,70	0,01
% RSD			0,10	2,54	<b>2,54</b>
s <sup>2</sup>					0,00004

Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)24 g	13.12.2013 18:51	17,11	103121	10,68
2	Isorel(A)24 h	13.12.2013 21:12	17,06	102630	10,62
3	Isorel(A)24 i	13.12.2013 22:22	17,08	102721	10,62
4	Isorel(A)24 j	13.12.2013 23:33	17,10	102046	10,58
5	Isorel(A)24 k	14.12.2013 00:44	17,08	101814	10,53
6	Isorel(A)24 l	14.12.2013 01:54	17,07	101767	10,54
Mittelwert			17,08	102349,83	10,59
SD			0,02	553,19	0,06
% RSD			0,10	0,54	<b>0,55</b>
s <sup>2</sup>					0,00339

	SY	SYA
<b>F-Test</b>	1,222	9,231
<b>t-Test</b>	2,486	2,454

Anhang

**Isorel (A) 60 Tag 1**

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)60 a	14.12.2013 14:50	13,25	124908	11,50
2	Isorel(A)60 b	14.12.2013 16:00	13,22	124998	11,50
3	Isorel(A)60 c	14.12.2013 18:22	13,24	125655	11,50
4	Isorel(A)60 d	14.12.2013 19:32	13,23	125841	11,50
5	Isorel(A)60 e	14.12.2013 20:43	13,21	126239	11,50
6	Isorel(A)60 f	14.12.2013 21:53	13,22	126167	11,50
Mittelwert			13,23	125634,67	
SD			0,01	570,08	
% RSD			0,10	0,45	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)60 a	14.12.2013 14:50	16,34	3162	0,24
2	Isorel(A)60 b	14.12.2013 16:00	16,32	3076	0,23
3	Isorel(A)60 c	14.12.2013 18:22	16,32	3069	0,23
4	Isorel(A)60 d	14.12.2013 19:32	16,32	3017	0,23
5	Isorel(A)60 e	14.12.2013 20:43	16,30	3108	0,23
6	Isorel(A)60 f	14.12.2013 21:53	16,32	3024	0,23
Mittelwert			16,32	3076,00	0,23
SD			0,01	54,14	0,005
% RSD			0,07	1,76	<b>2,04</b>
s <sup>2</sup>					0,00002

Syringenin-apiosyl-glycosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)60 a	14.12.2013 14:50	17,09	199676	20,62
2	Isorel(A)60 b	14.12.2013 16:00	17,08	199999	20,64
3	Isorel(A)60 c	14.12.2013 18:22	17,08	200393	20,57
4	Isorel(A)60 d	14.12.2013 19:32	17,07	200661	20,57
5	Isorel(A)60 e	14.12.2013 20:43	17,06	201169	20,55
6	Isorel(A)60 f	14.12.2013 21:53	17,09	200171	20,46
Mittelwert			17,08	200344,83	20,57
SD			0,01	525,11	0,06
% RSD			0,06	0,26	<b>0,30</b>
s <sup>2</sup>					0,00369

Anhang

**Isorel (A) 60 Tag 2**

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)60 g	15.12.2013 20:13	13,23	125301	11,50
2	Isorel(A)60 h	15.12.2013 22:34	13,25	126365	11,50
3	Isorel(A)60 i	15.12.2013 23:45	13,24	125999	11,50
4	Isorel(A)60 j	16.12.2013 00:55	13,24	125818	11,50
5	Isorel(A)60 k	16.12.2013 02:06	13,25	125852	11,50
6	Isorel(A)60 l	16.12.2013 03:17	13,23	125858	11,50
Mittelwert			13,24	125865,50	11,50
SD			0,01	343,07	
% RSD			0,07	0,27	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)60 g	15.12.2013 20:13	16,29	3028	0,23
2	Isorel(A)60 h	15.12.2013 22:34	16,33	2856	0,22
3	Isorel(A)60 i	15.12.2013 23:45	16,30	2909	0,22
4	Isorel(A)60 j	16.12.2013 00:55	16,34	2925	0,22
5	Isorel(A)60 k	16.12.2013 02:06	16,34	2862	0,22
6	Isorel(A)60 l	16.12.2013 03:17	16,30	3007	0,23
Mittelwert			16,31	2931,17	0,22
SD			0,02	72,24	0,006
% RSD			0,12	2,46	<b>2,68</b>
s <sup>2</sup>					0,00004

Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(A)60 g	15.12.2013 20:13	17,06	198572	20,44
2	Isorel(A)60 h	15.12.2013 22:34	17,08	199941	20,41
3	Isorel(A)60 i	15.12.2013 23:45	17,06	199398	20,41
4	Isorel(A)60 j	16.12.2013 00:55	17,10	199825	20,48
5	Isorel(A)60 k	16.12.2013 02:06	17,10	199137	20,41
6	Isorel(A)60 l	16.12.2013 03:17	17,06	199036	20,40
Mittelwert			17,08	199318,17	20,42
SD			0,02	513,88	0,03
% RSD			0,12	0,26	<b>0,16</b>
s <sup>2</sup>					0,00106

	SY	SYA
<b>F-Test</b>	1,555	3,483
<b>t-Test</b>	3,661	5,083

Anhang

**Isorel (M) 24 Tag 1**

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)24 a	12.12.2013 04:03	13,27	134183	11,50
2	Isorel(M)24 b	12.12.2013 05:13	13,28	134067	11,50
3	Isorel(M)24 c	12.12.2013 06:24	13,25	133584	11,50
4	Isorel(M)24 d	12.12.2013 08:45	13,26	132614	11,50
5	Isorel(M)24 e	12.12.2013 09:56	13,27	134275	11,50
6	Isorel(M)24 f	12.12.2013 11:06	13,27	132402	11,50
Mittelwert			13,27	133520,83	11,50
SD			0,01	822,64	
% RSD			0,07	0,62	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)24 a	12.12.2013 04:03	16,37	8048	0,57
2	Isorel(M)24 b	12.12.2013 05:13	16,36	8218	0,58
3	Isorel(M)24 c	12.12.2013 06:24	16,33	8205	0,58
4	Isorel(M)24 d	12.12.2013 08:45	16,38	8151	0,59
5	Isorel(M)24 e	12.12.2013 09:56	16,37	8084	0,57
6	Isorel(M)24 f	12.12.2013 11:06	16,36	8122	0,58
Mittelwert			16,36	8138,00	0,58
SD			0,02	66,83	0,006
% RSD			0,09	0,82	1,10
s <sup>2</sup>					0,00004

Syringenin-apiosyl-glycosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)24 a	12.12.2013 04:03	17,12	75597	7,27
2	Isorel(M)24 b	12.12.2013 05:13	17,11	74892	7,20
3	Isorel(M)24 c	12.12.2013 06:24	17,08	74780	7,22
4	Isorel(M)24 d	12.12.2013 08:45	17,13	74589	7,25
5	Isorel(M)24 e	12.12.2013 09:56	17,12	75444	7,25
6	Isorel(M)24 f	12.12.2013 11:06	17,11	74349	7,24
Mittelwert			17,11	74941,83	7,24
SD			0,02	487,04	0,023
% RSD			0,10	0,65	0,31
s <sup>2</sup>					0,00052

Anhang

**Isorel (M) 24 Tag 2**

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)24 g	13.12.2013 09:27	13,23	127981	11,50
2	Isorel(M)24 h	13.12.2013 10:37	13,24	128497	11,50
3	Isorel(M)24 i	13.12.2013 11:48	13,25	128582	11,50
4	Isorel(M)24 j	13.12.2013 14:09	13,22	127889	11,50
5	Isorel(M)24 k	13.12.2013 15:19	13,23	127695	11,50
6	Isorel(M)24 l	13.12.2013 16:30	13,23	127433	11,50
Mittelwert			13,23	128012,83	11,50
SD			0,01	449,88	
% RSD			0,09	0,35	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)24 g	13.12.2013 09:27	16,33	7696	0,57
2	Isorel(M)24 h	13.12.2013 10:37	16,35	7647	0,57
3	Isorel(M)24 i	13.12.2013 11:48	16,36	7742	0,57
4	Isorel(M)24 j	13.12.2013 14:09	16,32	7617	0,57
5	Isorel(M)24 k	13.12.2013 15:19	16,35	7528	0,56
6	Isorel(M)24 l	13.12.2013 16:30	16,32	7566	0,57
Mittelwert			16,34	7632,67	0,57
SD			0,02	79,77	0,005
% RSD			0,10	1,05	0,80
s <sup>2</sup>					0,00002

Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)24 g	13.12.2013 09:27	17,09	71746	7,23
2	Isorel(M)24 h	13.12.2013 10:37	17,10	72365	7,26
3	Isorel(M)24 i	13.12.2013 11:48	17,11	71749	7,20
4	Isorel(M)24 j	13.12.2013 14:09	17,07	71592	7,22
5	Isorel(M)24 k	13.12.2013 15:19	17,10	71443	7,22
6	Isorel(M)24 l	13.12.2013 16:30	17,08	71268	7,21
Mittelwert			17,09	71693,83	7,22
SD			0,01	377,05	0,022
% RSD			0,09	0,53	0,31
s <sup>2</sup>					0,00051

	SY	SYA
<b>F-Test</b>	1,995	1,020
<b>t-Test</b>	3,947	1,211

Anhang

**Isorel (M) 60 Tag 1**

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)60 a	14.12.2013 05:26	13,23	129823	11,50
2	Isorel(M)60 b	14.12.2013 06:36	13,22	129069	11,50
3	Isorel(M)60 c	14.12.2013 07:47	13,23	129464	11,50
4	Isorel(M)60 d	14.12.2013 08:57	13,25	128880	11,50
5	Isorel(M)60 e	14.12.2013 11:18	13,22	128630	11,50
6	Isorel(M)60 f	14.12.2013 12:29	13,25	129124	11,50
Mittelwert			13,23	129165,00	11,50
SD			0,01	424,43	
% RSD			0,10	0,33	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)60 a	14.12.2013 05:26	16,32	9861	0,72
2	Isorel(M)60 b	14.12.2013 06:36	16,32	9794	0,72
3	Isorel(M)60 c	14.12.2013 07:47	16,34	9609	0,71
4	Isorel(M)60 d	14.12.2013 08:57	16,35	9557	0,71
5	Isorel(M)60 e	14.12.2013 11:18	16,33	9505	0,70
6	Isorel(M)60 f	14.12.2013 12:29	16,37	9379	0,69
Mittelwert			16,34	9617,50	0,71
SD			0,02	180,95	0,012
% RSD			0,13	1,88	1,71
s <sup>2</sup>					0,00015

Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)60 a	14.12.2013 05:26	17,07	93091	9,25
2	Isorel(M)60 b	14.12.2013 06:36	17,07	92847	9,28
3	Isorel(M)60 c	14.12.2013 07:47	17,10	92503	9,22
4	Isorel(M)60 d	14.12.2013 08:57	17,10	92021	9,21
5	Isorel(M)60 e	14.12.2013 11:18	17,09	91493	9,17
6	Isorel(M)60 f	14.12.2013 12:29	17,13	91500	9,14
Mittelwert			17,09	92242,50	9,21
SD			0,02	680,49	0,05
% RSD			0,13	0,74	0,54
s <sup>2</sup>					0,00248

Anhang

**Isorel (M) 60 Tag 2**

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)60 g	15.12.2013 10:49	13,25	128352	11,50
2	Isorel(M)60 h	15.12.2013 12:00	13,23	128051	11,50
3	Isorel(M)60 i	15.12.2013 13:10	13,26	128827	11,50
4	Isorel(M)60 j	15.12.2013 15:31	13,27	127672	11,50
5	Isorel(M)60 k	15.12.2013 16:42	13,22	127529	11,50
6	Isorel(M)60 l	15.12.2013 17:52	13,24	128566	11,50
Mittelwert			13,24	128166,17	11,50
SD			0,02	508,83	
% RSD			0,12	0,40	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)60 g	15.12.2013 10:49	16,33	9362	0,69
2	Isorel(M)60 h	15.12.2013 12:00	16,33	9425	0,70
3	Isorel(M)60 i	15.12.2013 13:10	16,37	9154	0,68
4	Isorel(M)60 j	15.12.2013 15:31	16,35	9057	0,68
5	Isorel(M)60 k	15.12.2013 16:42	16,30	9134	0,68
6	Isorel(M)60 l	15.12.2013 17:52	16,35	9093	0,67
Mittelwert			16,34	9204,17	0,68
SD			0,02	151,75	0,011
% RSD			0,15	1,65	1,65
s <sup>2</sup>					0,00013

Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(M)60 g	15.12.2013 10:49	17,09	89902	9,03
2	Isorel(M)60 h	15.12.2013 12:00	17,09	89979	9,06
3	Isorel(M)60 i	15.12.2013 13:10	17,13	90261	9,04
4	Isorel(M)60 j	15.12.2013 15:31	17,10	89092	9,00
5	Isorel(M)60 k	15.12.2013 16:42	17,06	89236	9,02
6	Isorel(M)60 l	15.12.2013 17:52	17,11	89700	9,00
Mittelwert			17,09	89695,00	9,03
SD			0,02	451,26	0,02
% RSD			0,14	0,50	0,27
s <sup>2</sup>					0,00059

	SY	SYA
<b>F-Test</b>	1,147	4,198
<b>t-Test</b>	3,726	8,158

Anhang

**Isorel (P) 24 Tag 1**

**Theophyllin**

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)24 a	11.12.2013 18:39	13,27	125231	11,50
2	Isorel(P)24 b	11.12.2013 19:49	13,24	126024	11,50
3	Isorel(P)24 c	11.12.2013 21:00	13,26	126594	11,50
4	Isorel(P)24 d	11.12.2013 22:10	13,28	126962	11,50
5	Isorel(P)24 e	11.12.2013 23:21	13,25	126916	11,50
6	Isorel(P)24 f	12.12.2013 01:42	13,24	126100	11,50
Mittelwert			13,26	126304,50	11,50
SD			0,02	657,72	
% RSD			0,12	0,52	

**Syringin**

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)24 a	11.12.2013 18:39	16,35	20049	1,52
2	Isorel(P)24 b	11.12.2013 19:49	16,33	19971	1,51
3	Isorel(P)24 c	11.12.2013 21:00	16,35	20133	1,51
4	Isorel(P)24 d	11.12.2013 22:10	16,37	20141	1,51
5	Isorel(P)24 e	11.12.2013 23:21	16,34	20360	1,53
6	Isorel(P)24 f	12.12.2013 01:42	16,31	19540	1,48
Mittelwert			16,34	20032,33	1,51
SD			0,02	274,13	0,02
% RSD			0,12	1,37	1,23
s <sup>2</sup>					0,00035

**Syringenin-apiosyl-glycosid**

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)24 a	11.12.2013 18:39	17,11	165113	17,01
2	Isorel(P)24 b	11.12.2013 19:49	17,10	166413	17,03
3	Isorel(P)24 c	11.12.2013 21:00	17,13	167080	17,02
4	Isorel(P)24 d	11.12.2013 22:10	17,14	167409	17,01
5	Isorel(P)24 e	11.12.2013 23:21	17,10	167399	17,01
6	Isorel(P)24 f	12.12.2013 01:42	17,08	166634	17,04
Mittelwert			17,11	166674,67	17,02
SD			0,02	864,54	0,02
% RSD			0,11	0,52	0,09
s <sup>2</sup>					0,00023

Anhang

**Isorel (P) 24 Tag 2**

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)24 g	13.12.2013 00:02	13,22	124915	11,50
2	Isorel(P)24 h	13.12.2013 01:13	13,24	124403	11,50
3	Isorel(P)24 i	13.12.2013 02:23	13,24	124040	11,50
4	Isorel(P)24 j	13.12.2013 03:34	13,23	125128	11,50
5	Isorel(P)24 k	13.12.2013 04:44	13,24	124401	11,50
6	Isorel(P)24 l	13.12.2013 07:05	13,20	125581	11,50
Mittelwert			13,23	124744,67	11,50
SD			0,02	566,89	
% RSD			0,11	0,45	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)24 g	13.12.2013 00:02	16,31	19721	1,50
2	Isorel(P)24 h	13.12.2013 01:13	16,33	19452	1,49
3	Isorel(P)24 i	13.12.2013 02:23	16,32	19294	1,48
4	Isorel(P)24 j	13.12.2013 03:34	16,31	19458	1,48
5	Isorel(P)24 k	13.12.2013 04:44	16,31	19674	1,51
6	Isorel(P)24 l	13.12.2013 07:05	16,29	19652	1,49
Mittelwert			16,31	19541,83	1,49
SD			0,01	166,27	0,01
% RSD			0,09	0,85	0,72
s <sup>2</sup>					0,00012

Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)24 g	13.12.2013 00:02	17,08	165457	17,08
2	Isorel(P)24 h	13.12.2013 01:13	17,10	164926	17,10
3	Isorel(P)24 i	13.12.2013 02:23	17,09	163824	17,03
4	Isorel(P)24 j	13.12.2013 03:34	17,07	164176	16,92
5	Isorel(P)24 k	13.12.2013 04:44	17,07	164266	17,03
6	Isorel(P)24 l	13.12.2013 07:05	17,06	164200	16,86
Mittelwert			17,08	164474,83	17,01
SD			0,01	600,04	0,09
% RSD			0,09	0,36	0,55
s <sup>2</sup>					0,00864

	SY	SYA
<b>F-Test</b>	2,980	37,405
<b>t-Test</b>	2,116	0,374

Anhang

**Isorel (P) 60 Tag 1**

**Theophyllin**

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 a	15.12.2013 01:25	13,23	133696	11,50
2	Isorel(P)60 b	15.12.2013 02:35	13,20	130599	11,50
3	Isorel(P)60 c	15.12.2013 03:46	13,22	130762	11,50
4	Isorel(P)60 d	15.12.2013 04:56	13,24	130982	11,50
5	Isorel(P)60 e	15.12.2013 06:07	13,21	131277	11,50
6	Isorel(P)60 f	15.12.2013 08:28	13,24	132304	11,50
Mittelwert			13,22	131603,33	11,50
SD			0,02	1189,90	
% RSD			0,12	0,90	

**Syringin**

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 a	15.12.2013 01:25	16,31	68321	4,86
2	Isorel(P)60 b	15.12.2013 02:35	16,29	67327	4,91
3	Isorel(P)60 c	15.12.2013 03:46	16,32	67176	4,89
4	Isorel(P)60 d	15.12.2013 04:56	16,33	67118	4,88
5	Isorel(P)60 e	15.12.2013 06:07	16,29	67226	4,87
6	Isorel(P)60 f	15.12.2013 08:28	16,34	67080	4,83
Mittelwert			16,31	67374,67	4,87
SD			0,02	471,61	0,03
% RSD			0,13	0,70	0,56
s <sup>2</sup>					0,00075

**Syringenin-apiosyl-glycosid**

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 a	15.12.2013 01:25	17,08	640575	61,80
2	Isorel(P)60 b	15.12.2013 02:35	17,06	632310	62,45
3	Isorel(P)60 c	15.12.2013 03:46	17,09	634102	62,54
4	Isorel(P)60 d	15.12.2013 04:56	17,10	633543	62,38
5	Isorel(P)60 e	15.12.2013 06:07	17,06	632089	62,10
6	Isorel(P)60 f	15.12.2013 08:28	17,12	636400	62,04
Mittelwert			17,08	634836,50	62,22
SD			0,02	3209,97	0,29
% RSD			0,14	0,51	0,46
s <sup>2</sup>					0,08186

Anhang

**Isorel (P) 60 Tag 2**

Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 g	16.12.2013 06:48	13,22	131872	11,50
2	Isorel(P)60 h	16.12.2013 07:59	13,24	131277	11,50
3	Isorel(P)60 i	16.12.2013 09:09	13,25	131928	11,50
4	Isorel(P)60 j	16.12.2013 11:30	13,21	131462	11,50
5	Isorel(P)60 k	16.12.2013 12:41	13,21	132124	11,50
6	Isorel(P)60 l	16.12.2013 13:52	13,22	131313	11,50
Mittelwert			13,23	131662,67	11,50
SD			0,01	357,30	
% RSD			0,11	0,27	

Syringin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 g	16.12.2013 06:48	16,29	66466	4,80
2	Isorel(P)60 h	16.12.2013 07:59	16,32	66060	4,79
3	Isorel(P)60 i	16.12.2013 09:09	16,34	65887	4,75
4	Isorel(P)60 j	16.12.2013 11:30	16,29	66326	4,80
5	Isorel(P)60 k	16.12.2013 12:41	16,29	66413	4,79
6	Isorel(P)60 l	16.12.2013 13:52	16,31	65736	4,77
Mittelwert			16,31	66148,00	4,78
SD			0,02	299,55	0,02
% RSD			0,13	0,45	0,40
s <sup>2</sup>					0,00036

Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60 g	16.12.2013 06:48	17,06	634313	62,04
2	Isorel(P)60 h	16.12.2013 07:59	17,09	632129	62,11
3	Isorel(P)60 i	16.12.2013 09:09	17,11	636582	62,23
4	Isorel(P)60 j	16.12.2013 11:30	17,05	635644	62,36
5	Isorel(P)60 k	16.12.2013 12:41	17,06	634897	61,98
6	Isorel(P)60 l	16.12.2013 13:52	17,08	633466	62,22
Mittelwert			17,07	634505,17	62,16
SD			0,02	1582,82	0,14
% RSD			0,14	0,25	0,23
s <sup>2</sup>					0,02023

	SY	SYA
<b>F-Test</b>	2,072	0,247
<b>t-Test</b>	6,683	0,478

Tabelle VIII: Robustheit

Flussrate (0,35 ml/min / 0,45 ml/min / 0,45 ml/min)					
Theophyllin					
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60_0,35 a	16.01.2014 11:35	14,23	154453	11,50
2	Isorel(P)60_0,35 b	16.01.2014 12:45	14,22	153315	11,50
3	Isorel(P)60_0,35 c	16.01.2014 13:56	14,22	154325	11,50
1	Isorel(P)60_0,40 a	29.11.2013 18:59	13,25	134353	11,50
2	Isorel(P)60_0,40 b	30.11.2013 02:02	13,26	135806	11,50
3	Isorel(P)60_0,40 c	30.11.2013 09:05	13,26	135037	11,50
1	Isorel(P)60_0,45 a	16.01.2014 17:28	12,46	127989,00	11,50
2	Isorel(P)60_0,45 b	16.01.2014 18:38	12,47	128387,00	11,50
3	Isorel(P)60_0,45 c	16.01.2014 19:49	12,45	128592,00	11,50
Mittelwert			13,31	139139,67	
SD			0,53	11554,76	
% RSD			3,97	8,30	
Syringenin-apiosyl-glucosid					
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60_0,35 a	16.01.2014 11:35	18,04	757020	63,22
2	Isorel(P)60_0,35 b	16.01.2014 12:45	18,03	758575	63,82
3	Isorel(P)60_0,35 c	16.01.2014 13:56	18,04	761936	63,68
1	Isorel(P)60_0,40 a	29.11.2013 18:59	17,10	638607	61,31
2	Isorel(P)60_0,40 b	30.11.2013 02:02	17,09	645090	61,27
3	Isorel(P)60_0,40 c	30.11.2013 09:05	17,13	644782	61,58
1	Isorel(P)60_0,45 a	16.01.2014 17:28	16,33	575027	57,95
2	Isorel(P)60_0,45 b	16.01.2014 18:38	16,33	578444	58,11
3	Isorel(P)60_0,45 c	16.01.2014 19:49	16,32	577477	57,92
Mittelwert			17,16	659662,00	62,48
SD			0,74	79932,18	1,22
% RSD			4,32	12,12	<b>1,95</b>

Anhang

Temperatur (20°C / 25°C / 30°C)

Theophyllin					
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60_20° a	16.01.2014 23:20	13,82	137037	11,50
2	Isorel(P)60_20° b	17.01.2014 00:31	13,84	135704	11,50
3	Isorel(P)60_20° c	17.01.2014 01:42	13,81	136260	11,50
1	Isorel(P)60_25° a	29.11.2013 18:59	13,25	134353	11,50
2	Isorel(P)60_25° b	30.11.2013 02:02	13,26	135806	11,50
3	Isorel(P)60_25° c	30.11.2013 09:05	13,26	135037	11,50
1	Isorel(P)60_30° a	17.01.2014 05:13	12,67	137960	11,50
2	Isorel(P)60_30° b	17.01.2014 06:24	12,67	141266	11,50
3	Isorel(P)60_30° c	17.01.2014 07:34	12,67	137706	11,50
Mittelwert			13,25	136792,11	
SD			0,31	2053,78	
% RSD			2,34	1,50	

Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60_20° a	16.01.2014 23:20	17,52	674458	63,48
2	Isorel(P)60_20° b	17.01.2014 00:31	17,53	671987	63,87
3	Isorel(P)60_20° c	17.01.2014 01:42	17,51	671780	63,59
1	Isorel(P)60_25° a	29.11.2013 18:59	17,10	638607	61,31
2	Isorel(P)60_25° b	30.11.2013 02:02	17,09	645090	61,27
3	Isorel(P)60_25° c	30.11.2013 09:05	17,13	644782	61,58
1	Isorel(P)60_30° a	17.01.2014 05:13	16,65	645614	60,36
2	Isorel(P)60_30° b	17.01.2014 06:24	16,64	648580	59,22
3	Isorel(P)60_30° c	17.01.2014 07:34	16,65	643250	60,25
Mittelwert			17,09	653794,22	61,66
SD			0,38	14467,11	1,65
% RSD			2,22	2,21	<b>2,68</b>

pH-Wert ( 2,22 / 2,62 / 2,92 )

Theophyllin					
Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60_2,22 a	20.01.2014 11:36	13,06	142910	11,50
2	Isorel(P)60_2,22 b	20.01.2014 12:47	13,03	142736	11,50
3	Isorel(P)60_2,22 c	20.01.2014 13:57	13,02	142955	11,50

## Anhang

1	Isorel(P)60_2,62 a	29.11.2013 18:59	13,25	134353	11,50
2	Isorel(P)60_2,62 b	30.11.2013 02:02	13,26	135806	11,50
3	Isorel(P)60_2,62 c	30.11.2013 09:05	13,26	135037	11,50
1	Isorel(P)60_2,92 a	17.01.2014 10:51	13,28	134532	11,50
2	Isorel(P)60_2,92 b	17.01.2014 12:02	13,30	135737	11,50
3	Isorel(P)60_2,92 c	17.01.2014 13:12	13,31	135228	11,50
Mittelwert			13,20	137699,33	
SD			0,12	3905,16	
% RSD			0,92	2,84	

### Syringenin-apiosyl-glucosid

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60_2,22 a	20.01.2014 11:36	16,91	646985	58,39
2	Isorel(P)60_2,22 b	20.01.2014 12:47	16,89	646635	58,43
3	Isorel(P)60_2,22 c	20.01.2014 13:57	16,89	645308	58,22
1	Isorel(P)60_2,62 a	29.11.2013 18:59	17,10	638607	61,31
2	Isorel(P)60_2,62 b	30.11.2013 02:02	17,09	645090	61,27
3	Isorel(P)60_2,62 c	30.11.2013 09:05	17,13	644782	61,58
1	Isorel(P)60_2,92 a	17.01.2014 10:51	17,12	626152	60,03
2	Isorel(P)60_2,92 b	17.01.2014 12:02	17,16	627531	59,63
3	Isorel(P)60_2,92 c	17.01.2014 13:12	17,15	625685	59,68
Mittelwert			17,05	638530,56	59,84
SD			0,12	9383,72	1,32
% RSD			0,69	1,47	2,21

### Säule (1 / 2)

### Theophyllin

Messung	Probe	Durchgeföhrt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60_Säule1 a	29.11.2013 18:59	13,25	134353	11,50
2	Isorel(P)60_Säule1 b	30.11.2013 02:02	13,26	135806	11,50
3	Isorel(P)60_Säule1 c	30.11.2013 09:05	13,26	135037	11,50
1	Isorel(P)60_Säule2 a	21.01.2014 11:34	13,30	142189	11,50
2	Isorel(P)60_Säule2 b	21.01.2014 12:44	13,28	141112	11,50
3	Isorel(P)60_Säule2 c	21.01.2014 13:55	13,25	142098	11,50
Mittelwert			13,27	138432,50	
SD			0,02	3736,23	
% RSD			0,14	2,70	

## Anhang

Syringenin-apiosyl-glucosid
-----------------------------

Messung	Probe	Durchgeführt am/um	R.T. (min)	Peakfläche	Gehalt (µg/ml)
1	Isorel(P)60_Säule1 a	29.11.2013 18:59	17,10	638607	61,31
2	Isorel(P)60_Säule1 b	30.11.2013 02:02	17,09	645090	61,27
3	Isorel(P)60_Säule1 c	30.11.2013 09:05	17,13	644782	61,58
1	Isorel(P)60_Säule2 a	21.01.2014 11:34	17,06	643130	58,34
2	Isorel(P)60_Säule2 b	21.01.2014 12:44	17,05	638106	58,32
3	Isorel(P)60_Säule2 c	21.01.2014 13:55	17,00	641337	58,21
Mittelwert			17,07	641842,00	59,84
SD			0,04	3017,61	1,70
<b>% RSD</b>			0,26	0,47	<b>2,84</b>

Syringenin-apiosyl-glucosid
-----------------------------

<b>MW</b>	<b>über</b>	60,65
<b>SD</b>	<b>alle</b>	1,92
<b>% RSD</b>	<b>Werte</b>	<b>3,17</b>

## 9. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1. *Viscum album* L.  
<http://elwinga.blox.pl/resource/jemiola.jpg> (11.04.2014)
- Abb. 2. Viscotoxin A3  
<http://www.medicinescomplete.com/mc/merck/current/images/12469677.png> (11.04.2014)
- Abb. 3. Vereinfachte Darstellung der Modifizierung zu RP-18
- Abb. 4. Schematische Darstellung des HPLC-Aufbaus [9]
- Abb. 5. Chromatogramm von Isorel®A60 (Methode\_2)
- Abb. 6. Chromatogramm von Isorel®M60 (Methode\_2)
- Abb. 7. Chromatogramm von Isorel®P60 (Methode\_2)
- Abb. 8. Chromatogramm von Isorel®M6 (Methode\_2)
- Abb. 9. Chromatogramm von Isorel®M24 (Methode\_2)
- Abb. 10. Chromatogramm von Isorel®M60 (Methode\_2)
- Abb. 11. Chromatogramm von Isorel®M60 (Methode\_3)
- Abb. 12. Chromatogramm von Isorel®P60 mit C8-Säule
- Abb. 13. Chromatogramm von Isorel®P60 mit C18-Säule
- Abb. 14. Chromatogramm von Isorel®P60 mit C18-Säule  
Polar Advantage
- Abb. 15. Chromatogramm von Isorel®P60 (Methode\_final)
- Abb. 16. Syringenin-4'-O-glucosid
- Abb. 17. Syringenin-4'-O[apiosyl(1→2)]glucosid
- Abb. 18. Massenspektren von Syringenin-4'-O[apiosyl(1→2)]glucosid
- Abb. 19. Chromatogramm von Phenylpropanderivaten in Isorel®P60
- Abb. 20. Dünnschichtchromatogramm 1 von Aminosäuren und Isorel®
- Abb. 21. Dünnschichtchromatogramm 2 von Aminosäuren und Isorel®
- Abb. 22. Zuordnung der Substanzklasse am Beispiel von Isorel®P60
- Abb. 23. Chromatogramm von Arbutin (untere Spur) und  
Isorel®M60 (obere Spur)
- Abb. 24. Chromatogramm von Coffein (untere Spur) und  
Isorel®M60 (obere Spur)
- Abb. 25. Chromatogramm von Theophyllin (untere Spur) und  
Isorel®M60 (obere Spur)
- Abb. 26. Chromatogramm von Isorel®A60 und Internem Standard
- Abb. 27. Chromatogramm von Isorel®M60 und Internem Standard

- Abb. 28. Chromatogramm von Isorel®P60 und Internem Standard
- Abb. 29. Chromatogramm des Internen Standards und Syringin (SL)
- Abb. 30. Chromatogramm des Internen Standards und Syringin (1:10)
- Abb. 31. Chromatogramm des Internen Standards und Syringin (1:300)
- Abb. 32. Chromatogramm von blank Wasser dest.
- Abb. 33. Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std mit den Standardparametern aus Methode\_final (Flussrate:0,40 ml/min, Temperatur 25°C, pH 2,62, Säule1)
- Abb. 34. Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einer Flussrate von 0,35 ml/min
- Abb. 35. Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einer Flussrate von 0,45 ml/min
- Abb. 36. Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einer Säulenofentemperatur von 20°C
- Abb. 37. Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einer Säulenofentemperatur von 30°C
- Abb. 38. Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einem pH-Wert von 2,22 (Elutionsmittel)
- Abb. 39. Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std bei einem pH-Wert von 2,92 (Elutionsmittel)
- Abb. 40. Chromatogramm von Isorel®P60 mit Int. Std mit Säule2

## 10. Tabellenverzeichnis

Tab.1.	Berechnung des Standardkorrekturfaktors
Tab. I	Systemeignung
Tab. II	Spezifität
Tab. III	Methodenpräzision
Tab. IV	Linearität
Tab. V	Richtigkeit
Tab. VI	Wiederholbarkeit
Tab. VII	Tag-zu-Tag-Präzision
Tab. VIII	Robustheit

## 11. Abkürzungsverzeichnis

A	Angström
bidest.	bidestillatum/-a
cm	Centimeter
DC	Dünnschichtchromatographie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ELLA	Enzyme Linked Lectin Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
f <sub>st</sub>	Standardkorrekturfaktor
g	Gramm
GMP	Good Manufacturing Practice
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
Int. Std	Interner Standard
Isorel® A	Abietis
Isorel® M	Mali
Isorel® P	Pini
L.	Linnaeus
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ML	Mistellektin
MS	Massenspektrometrie
MG	Molekulargewicht
n.d.	nicht detektierbar
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	Natural Killer-Zellen
nm	Nanometer
Ph.Eur.	Pharmacopoeia Europea
R.T.	Retention Time
RP	Reversed Phase
RSD	relative Standardabweichung

## Abkürzungsverzeichnis

---

SD	Standardabweichung
SL	Stammlösung
ssp.	subspecies
SY	Syringin
SYA	Syringenin-apiosyl-glucosid
UV/Vis	Ultraviolet/Visible
<i>V.album</i>	<i>Viscum album</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## 12. Literaturverzeichnis

- [1] Blaschek W., Ebel S., Hackentha E., Holzgrabe U., Keller K., Reichling J., Schulz V. (2007): Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, 6. Auflage, Band 16, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- [2] Hensel W. (1994): Das Kosmos-Kräuterbuch, Frankh-Kosmos, Verlags-GmbH & Co
- [3] Bianchini F., Corbetta F., Pistoia M.(Übersetzt von Thiede U.) (1978): Der große Heilpflanzenatlas, 1. Auflage, BLV Verlagsgesellschaft mbH, München
- [4] Dingermann T., Hiller K., Schneider G., Zündorf I. (2004): Schneider Arzneidrogen, 5. Auflage, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München
- [5] <http://www.zeit.de/wissen/2009-11/adventskalender-mistel> (01.07.2014)
- [6] Hänsel R., Sticher O. (1999): Pharmakognosie – Phytopharmazie , 6. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg
- [7] Isorel®- Therapierichtlinien
- [8] Rücker G., Neugebauer M., Willens G. (2013): Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- [9] Dominik A., Steinbilder D., Wurglics M. (2013): Instrumentelle Analytik kompakt, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- [10] Adam K., Becker H. (2000): Analytik biogener Arzneistoffe, Pharmazeutische Biologie Band 4, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- [11] Wagner H., Blatt S., Zgainski E.M. (1983): Drogenanalyse, Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

## 13. Curriculum vitae

### Persönliche Angaben

Name: Nadine Sarah Grosinger  
Geburtsdatum: 19.08.1988  
Geburtsort: Wien  
Staatsbürgerschaft: Österreich  
Eltern: Mag. Denise Grosinger  
Mag. Ernst Grosinger

### Ausbildung

09/1994 – 06/1998: VS Mondweg, Wien  
09/1998 – 06/2006: GRG XIII Wenzgasse, Wien  
06/2006 : Erwerb des Reifezeugnisses am GRG XIII Wenzgasse  
10/2007 – : Studium der Pharmazie an der Fakultät für  
Lebenswissenschaften der Universität Wien  
  
10/2013 – 03/2014: Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie an der  
Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien

### Bisherige berufliche Tätigkeit

08/2010 bzw. 07/2011: je einmonatiges Feriapraktikum in der „Apotheke im  
Auhofcenter“, 1140 Wien  
Seit 10/2011 : geringfügige Beschäftigung als Sprechstundenhilfe bei  
Dr. Claude Frühwald, Ärztin für Allgemeinmedizin  
Seit 03/2011 : regelmäßige Anstellung im Tutorium der  
Lehrveranstaltung „Quantitative Pharmazeutische  
Analytik“ des Studiengangs Pharmazie, Universität Wien