

Untersuchungen zur Zusammensetzung und  
Verarbeitung von Trockenextrakten aus  
*Hypericum perforatum* L.

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

Stephan von Egelkraut-Gottanka

Tag der mündlichen Prüfung:

9. November 2001

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. P. C. Schmidt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. S. Laufer

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von  
Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen.

Meinem verehrten Lehrer und Doktorvater, Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt, danke ich  
für die hervorragende fachliche Unterstützung, seine menschliche Großzügigkeit  
sowie für das in mich gesetzte Vertrauen. Seine persönliche Unterstützung und  
unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen  
dieser Arbeit beigetragen. Seine verständnisvolle Art und seine Anteilnahme in  
persönlichen Angelegenheiten machen ihn zu einem wirklichen *Doktorvater*.  
Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme an Weiterbildungs-  
veranstaltungen zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie sowie an  
Kongressen und Exkursionen bedanken.

Bei der Lichtwer Pharma AG, vornehmlich vertreten durch Herrn Dr. Salah Abu Abed  
und Herrn Dr. Wolfgang Müller, bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die  
Finanzierung der Arbeit, die Überlassung von Trockenextrakten und die Überlassung  
der Analysenmethode für die Bestimmung der Hyperforinfreisetzung.

Der Fa. Gerteis, vornehmlich vertreten durch Herrn Paul Gerteis und Herrn Robert  
Rickli, gilt mein besonderer Dank für die Ermöglichung von Kompaktierversuchen mit  
dem GMP Mini-Pactor.

Herrn Dr. Robert Lammens, Bayer AG, Leverkusen, gebührt Dank für die  
Überlassung von Skizzen zum Aufbau des Kompaktors und für seine Hilfs- und  
Diskussionsbereitschaft.

Dr. Jürgen Lühmann, Fa. Malvern, danke ich für die Ermöglichung der  
Partikelgrößenmessungen mittels Laserbeugungsspektrometrie und seine stete Hilfs-  
bereitschaft.

Der Fa. Dr. W. Schwabe danke ich für die Überlassung von Hypericin- und  
Hyperforin/Adhyperforin-Standardsubstanzen.

Herrn Wolfgang Bock, Institut für Anorganische Chemie der Universität Tübingen, gebührt Dank für die Durchführung der Elementaranalysen.

Herrn Martin Berner, Frau Birgit Bittner, Herrn Simon Forster, Frau Daniela Gschwend, Frau Berta Sánchez de Juan und Herrn Luiz Soares danke ich ganz herzlich für die große Unterstützung bei Pulvertechnologie, Kompaktierung und Tablettierung.

Herrn Apotheker Jochen Dressler danke ich sehr für die Programmierung des Datenerfassungssystems der Tablettenmaschine und seine Hilfe bei tablettier-technischen Fragestellungen.

Herrn Apotheker Marc Schiller danke ich herzlich für die Bestimmung der organischen Säuren sowie die gute Zusammenarbeit und seine stete Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Martin Wahl gebührt Dank für seine Unterstützung in den letzten Monaten dieser Arbeit.

Frau Renate Beer, Herrn Roland Walker und Herrn Klaus Weyhing danke ich für ihre Hilfe bei unzähligen größeren wie kleineren technischen Problemen.

Ein herzlicher Dank sei auch Herrn Geiger und den Mitarbeitern der Werkstatt des Pharmazeutischen Institutes für die Reparaturen und Anfertigung diverser Kleinteile ausgesprochen.

Bei meinen ehemaligen und derzeitigen Kolleginnen und Kollegen bedanke ich mich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit, die zahlreichen fachlichen Diskussionen und die große Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern, meinen Großeltern Frau Ingeborg Weigand und Herrn Dr. Leonhard Weigand, sowie meinem Onkel Herrn Prof. Dr. Wolfgang Weigand danke ich ganz herzlich für ihre immerwährende Unterstützung und ihren guten Rat, die das Gelingen dieser Arbeit erst möglich machten.

Ganz besonders danke ich meiner Verlobten, Frau Apothekerin Regula Pohl, für ihre Geduld und Unterstützung.

**Meinen Eltern und Regula  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet**



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Hypericum perforatum L. Überblick über Geschichte, Inhaltsstoffe, Pharmakologie und Klinik</b>	<b>3</b>
2.1	Geschichte, Botanik und Verbreitung	3
2.2	Inhaltsstoffe	4
2.3	Pharmakologie und Klinik	6
<b>3</b>	<b>Analytische Charakterisierung der Extrakte</b>	<b>11</b>
3.1	Einleitung	11
3.2	Dünnschichtchromatographie	12
3.3	Extraktfraktionierung	14
3.4	Quantifizierung der potentiell wirksamen Inhaltsstoffe Flavonoide, Hyperforin und Hypericin	15
3.4.1	HPLC-Bestimmung der Flavonoide	15
3.4.2	HPLC-Bestimmung und Stabilität von Hyperforin	20
3.4.3	HPLC-Bestimmung von Gesamthypericin	24
3.4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung der wirksamen Bestandteile	27
3.5	Quantifizierung der Hauptbegleitstoffe	28
3.5.1	Bestimmung der Zucker	28
3.5.2	Bestimmung der Gerbstoffe	34
3.5.3	Bestimmung von Asche, Gesamtprotein und organischen Säuren	36
3.5.4	Bestimmung der lipophilen Inhaltsstoffe	37
3.5.5	Zusammenfassung der Untersuchung der Hauptbegleitstoffe	38
<b>4</b>	<b>Physikalische, physikalisch-chemische und tablettiertechnische Charakterisierung der Extrakte</b>	<b>39</b>
4.1	Physikalische und physikalisch-chemische Charakterisierung der Extrakte	39
4.2	Direktablettierung von Extraktpulver	42
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	45

<b>5</b>	<b>Kompaktierung der Extrakte mit einem spalt- und kraft-kontrollierten Laborkompaktor und Tablettierung der Kompaktate</b>	<b>46</b>
5.1	Einleitung	46
5.2	Kompaktierung der Extraktpulver	48
5.3	Pulvertechnologische Untersuchungen an Kompaktaten	49
5.4	Tablettierung der Kompaktate	52
5.4.1	Rezepturenentwicklung	52
5.4.2	Tablettierbarkeit extrakt- und kompaktathaltiger Mischungen	54
5.5	Eigenschaften der kompaktathaltigen Tabletten	55
5.5.1	Bruchfestigkeit und Friabilität	55
5.5.2	Zerfallszeit	57
5.5.3	Freisetzung von Hyperforin, Hypericin und Rutin	59
5.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	61
<b>6</b>	<b>Optimierung der Kompaktat- und Tabletteneigenschaften mittels eines 3<sup>3</sup> Faktorenexperimentes</b>	<b>62</b>
6.1	Einleitung	62
6.2	Versuchsplanung und Theorie	63
6.3	Experimentelle Ergebnisse	64
6.4	Mittlere Partikelgröße $d_{50}$	66
6.5	Zerfallszeit	69
6.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	73
<b>7</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>74</b>
7.1	Materialien	74
7.2	Allgemein verwendete Geräte	78
7.3	Datenverarbeitung	78
7.4	Analytische Verfahren	79
7.4.1	Dünnschichtchromatographie	79
7.4.2	Extraktfraktionierung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion	79
7.4.3	HPLC-Methode zur Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt	80
7.4.4	HPLC-Methode zur Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeit von Rutin im Freisetzungsmedium	83

7.4.5	HPLC-Methode zur Bestimmung von Hyperforin im Extrakt	84
7.4.6	HPLC-Methode zur Bestimmung der Auflösungs­geschwindigkeit von Hyperforin im Freisetzungsmedium	86
7.4.7	HPLC-Methode zur Bestimmung von Gesamthypericin im Extrakt	87
7.4.8	HPLC-Methode zur Bestimmung der Auflösungs­geschwindigkeit von Hypericin im Freisetzungsmedium	89
7.4.9	HPLC-Methode zur Bestimmung der Zucker	90
7.4.10	Bestimmung der Gerbstoffe	92
7.4.11	Bestimmung des Aschegehaltes	92
7.4.12	Bestimmung von Gesamtprotein	92
7.4.13	Bestimmung der organischen Säuren	92
7.4.14	Bestimmung der lipophilen Inhaltsstoffe	93
7.4.15	Wassergehalt nach Karl-Fischer	93
7.4.16	pH-Wert	93
7.4.17	Kurzzeitwasseraufnahme und Sorptionsisothermen der Extrakte	94
7.5	Gefriertrocknung	94
7.6	Kompaktierung	95
7.6.1	Funktionsweise des GMP Mini-Pactor	95
7.6.2	Kompaktierung mit dem GMP Mini-Pactor	96
7.7	Pulvertechnologische Methoden	99
7.7.1	Extraktcharakterisierung	99
7.7.2	Charakterisierung der Kompaktate	100
7.7.3	Charakterisierung der Pressmischungen	100
7.8	Tablettierung	100
7.8.1	Herstellung der Pressmischungen	101
7.8.2	Tablettierung und Messwerterfassung	101
7.9	Prüfung der Tabletten	102
7.9.1	Galenische Prüfungen	102
7.9.2	Freisetzungsuntersuchungen	103
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>

<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>123</b>
10.1	Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der quantitativen HPLC-Bestimmung von Rutin, Hyperforin und Hypericin im Extrakt	123
10.2	Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der quantitativen HPLC-Bestimmung von Rutin, Hyperforin und Hypericin im FreisetzungsmEDIUM	128
10.3	Parameter der Kalibrierung und Validierung der HPLC-Analysenverfahren zur Bestimmung von Rutin, Hyperforin und Hypericin im FreisetzungsmEDIUM	130
10.4	Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der quantitativen HPLC-Bestimmung der Zucker	131
10.5	Rezepturanhang	137
10.6	Zusammenfassung der statistischen Parameter der Faktorenexperimente	138
10.7	Firmenverzeichnis	140

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
Art.-Nr.	Artikelnummer
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
et al.	et alii
Fa.	Firma
Gl.	Gleichung
PAD	gepulste amperometrische Detektion
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europea
relsdv	relative Standardabweichung
r. F.	relative Feuchte
RID	refraktometrische Detektion
$R_f$	Retentionsfaktor
RRF	relativer Responsefaktor
$R^t$	Retentionszeit
sdv	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TS	Trockensubstanz
U/min	Umdrehungen pro Minute
USP	United States Pharmacopeia
V/V	Volumen in Volumen
$d_{10/50/90}$	Partikelgröße bei einem volumenbezogenen Summendurchgang von 10, 50 und 90 Prozent

**Besondere Hinweise:**

Falls nicht anders gekennzeichnet geben Fehlerbalken und Intervalle immer den 95 % Vertrauensbereich des Mittelwerts an.

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

# KAPITEL 1

## EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Heilpflanzen waren vor Entwicklung der modernen Medizin Jahrhunderte lang die wichtigsten Arzneimittel. Nachdem die Bedeutung pflanzlicher Arzneimittel in den westlichen Ländern seit Beginn des 20. Jahrhunderts im Zuge der Entwicklung chemisch definierter Arzneistoffe zunächst abnahm, findet der Gebrauch pflanzlicher Arzneizubereitungen seit den 70er Jahren wieder zunehmend Verbreitung. Der deutsche Markt der Phytopharmaka weist folgende Hauptindikationsgebiete auf: Zentrales Nervensystem 23 %, Erkrankungen der Atemwege 25 %, Herz-Kreislauf-erkrankungen 10 %, Erkrankungen der inneren Organe 21 %, Topika 10 %, sonstige 11 % (Schulz und Hänsel 1999). Phytopharmaka zeichnen sich zumeist durch eine geringe Nebenwirkungsrate aus und eignen sich bevorzugt auch für eine langfristige Therapie. Voraussetzung für den Einsatz von Arzneipflanzen, für eine rationelle Phytotherapie und für die Zulassung von Phytopharmaka als Arzneimittel ist der Nachweis ihrer Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit.

Ein typisches Phytopharmakon, dessen Wirksamkeit und Unbedenklichkeit bei der Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen in zahlreichen Studien belegt wurde, ist das Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.). 1997 verzeichnete das Handelsvolumen dieser Arzneipflanze eine Zuwachsrate von 2800 % (Wills 2000). Johanniskrautpräparate hatten 1999 einen Anteil von rund 25 % an allen ärztlichen Antidepressiva-Verordnungen in Deutschland (Jungmayr 1999). Mit Prävalenzraten von über 15 % gehören depressive Störungen unterschiedlichen Schweregrades nach ICD10 (International Classification of Diseases, 10. Fassung 1992) zu den häufigsten psychiatrischen Erkrankungen überhaupt. Depressionen werden heute nach der Häufigkeit und dem Schweregrad unterteilt. Eine schwere Depression mit Suizidgefahr ist eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung, die mit adäquat wirksamen Medikamenten behandelt werden muss. Jedoch ist auch eine leichte andauernde depressive Episode, die zu einer Beeinträchtigung im persönlichen und beruflichen Umfeld führt, eine ernstzunehmende behandlungsbedürftige Erkrankung (Müller et al.

1999). Johanniskraut stellt bei der Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen eine anerkannte Therapiemöglichkeit dar. Johanniskrautextrakt wird aus den oberirdischen Pflanzenteilen von *Hypericum perforatum* L. durch Extraktion mit Ethanol/Methanol-Wassermischungen gewonnen. Bei Johanniskraut gilt der gesamte Pflanzenextrakt als wirksames Prinzip, wobei als zur Wirkung beitragende Bestandteile vor allem Hyperforin, Hypericin und Flavonoide diskutiert werden. Die Sicherung einer reproduzierbaren Qualität ist bei Extraktpräparaten ungleich schwieriger als bei synthetischen Wirkstoffen. Für die Gewährleistung einer definierten Extraktqualität ist neben der Qualität der Ausgangsdroge ein festgelegtes Auszugsmittel und das Herstellungsverfahren maßgebend. Neben den Wirksubstanzen enthalten Extrakte Begleitstoffe, die als Coeffektoren die physikochemischen Eigenschaften und biopharmazeutischen Parameter beeinflussen können (Eder und Mehnert 1998). Da Begleitstoffe einen überwiegenden Anteil des Extraktes ausmachen, beeinflussen sie auch seine technologischen Eigenschaften und damit die Herstellung fester Darreichungsformen. Bislang gibt es keine Erkenntnisse über den Einfluss der Inhaltsstoffzusammensetzung von Johanniskrauttrockenextrakt auf die technologische Verarbeitbarkeit.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe von acht verschiedenen Johanniskrauttrockenextrakt-Chargen unter besonderer Berücksichtigung der Begleitstoffe. Ferner werden die pulvertechnologischen Eigenschaften der Extrakte mit den Eigenschaften kompaktierter Extraktpulver verglichen. Die Qualität extraktpulver- und kompaktathaltiger Tabletten wird verglichen. Der Einfluss von Verfahrensparametern auf den Kompaktierprozess und die Tablettenqualität unter besonderer Berücksichtigung der für den Zerfall der Tabletten wesentlichen Schmiermittelkonzentration wird untersucht.

## KAPITEL 2

### *HYPERICUM PERFORATUM L.*

## ÜBERBLICK ÜBER GESCHICHTE, INHALTSSTOFFE, PHARMAKOLOGIE UND KLINIK

### 2.1 Geschichte, Botanik und Verbreitung

Das Johanniskraut ist eine seit dem Altertum vielfältig genutzte Arzneipflanze, die bereits von den Völkern der Antike verwendet wurde (Czygan 1993). Bei den Griechen diente die über Götterfiguren angebrachte Pflanze der Abwehr böser Geister. 77 n. Chr. dokumentiert der griechische Arzt Dioskurides in seinem Kräuterbuch die arzneiliche Anwendung von Johanniskraut-Arten bei fiebrigen Erkrankungen, zur Diureseförderung und zur Wundbehandlung. *Hypericum perforatum* L. wird später von Paracelsus (1493-1541) als Heil- und Zauberkraut mit Wunderkräften beschrieben. Auch Leonhart Fuchs schreibt in seinem „New Kreüterbuch“ (1543) in Cap. CCCXXIII von der Verwendung des „S. Johanskraut zu Latein Perforata und Fuga daemonum“ gegen fiebrige Erkrankungen, zur Diureseförderung und zur Wundbehandlung. Der botanische Name *Hypericum* leitet sich von griechisch „hyper“ (auf, über) und „ereikon“ (Heide) ab, also: ein auf der Heide wachsendes Kraut. Der Artname „*perforatum*“ bezeichnet die durch kugelige Exkretbehälter wie durchlöchert erscheinenden punktierten Blätter. Die Christen haben diese Pflanze Johannes dem Täufer geweiht. Daher kommt die deutsche Bezeichnung „Johanniskraut“, da es um den 24. Juni (Johannistag) blüht und der rote Saft der Blüten an das Blut des Märtyrers Johannes des Täufers erinnern soll. *Hypericum perforatum* L. wird 1941 in das Ergänzungsbuch des Deutschen Arzneibuchs (DAB 6) als *Hyperici herba* und 1979 in den Deutschen Arzneimittel Codex (DAC) aufgenommen. Die Kommission E des vormaligen Bundesgesundheitsamtes (BGA) bewertet das Johanniskraut positiv und erfasst es mit der Monographie „*Hyperici herba*“. Die Aufnahme von Johanniskrauttrockenextrakt in das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.) ist für das Jahr 2002 vorgesehen (Franz 2001).

Die Gattung *Hypericum* L. gehört zu der Familie der Hypericaceae (syn. Guttiferae), auch Johanniskraut- oder Hartheugewächse genannt, und umfasst weltweit 370 Arten, von denen 20 in Mitteleuropa heimisch sind. Die offizinelle Pflanze *Hypericum perforatum* L. ist eine bis ein Meter hohe aufrechte Pflanze. Charakteristika der Spezies sind goldgelbe, fünfzählige in Trugdolden angeordnete Blüten, schmale, fein zugespitzte Kelchblätter sowie stielrunde, kahle mit zwei Längskanten besetzte Stengel. *Hypericum perforatum* L. ist in Europa, Westasien, auf den Kanarischen Inseln und in Nordafrika heimisch. Eingeschleppt und eingebürgert ist die Spezies in Ostasien, Nord- und Südamerika, Australien und Neuseeland (Schütt und Schulz 1993, Hölzl et al. 1994, Kaul 2000).

## 2.2 Inhaltsstoffe

Gute Übersichten über das bisher bekannte Inhaltsstoffspektrum finden sich bei Maisenbacher (1991), Schütt und Schulz (1993), Hölzl et al. (1994), Bombardelli und Morazzoni (1995) und Nahrstedt und Butterweck (1997).

### *Phloroglucine*

Hagenström (1955) entdeckt eine stark antibakterielle Wirkung in Auszügen von *Hypericum perforatum* L. Gurevich beschreibt zum ersten Mal die Charakterisierung und Isolierung von Hyperforin (Gurevich et al. 1971). Das Vorkommen von Hyperforin ist charakteristisch für *Hypericum perforatum* L. und ist in allen oberirdischen Pflanzenteilen in unterschiedlichen Mengen enthalten. Nach Maisenbacher und Kovar (1992) findet sich Hyperforin in Blüten zu 2 % und ist in unreifen Früchten in Mengen bis zu 4,5 % enthalten. Die Autoren charakterisieren das Adhyperforin, ein Methylanaloges von Hyperforin, welches in Blüten und Stengeln zu 0,8-1,8 % enthalten ist. Kürzlich wurde Hydroperoxycadiforin, eine Substanz mit einer Kombinationsstruktur von Cadinan, Sesquiterpen und Hyperforin in geringen Konzentrationen von 0,0006 % in den vegetativen Teilen, Stengeln und Blättern der Pflanze gefunden (Rücker et al. 1995).

### ***Naphthodianthrone***

Von bisher zehn bekannten Naphthodianthronstrukturen sind Hypericin und Pseudohypericin sowie deren Biosynthesevorstufen Protohypericin und Protopseudohypericin mengenmäßig von Bedeutung. Hypericin findet sich zu 0,03-0,3 % in der gesamten Pflanze. Es ist eine wasserunlösliche Verbindung, die nativ wahrscheinlich als Glucosid vorkommt und deren Kaliumsalze wasserlöslich sind (Falk und Schmitzberger 1992). Brockmann et al. können 1942 die Struktur aufklären. Von derselben Arbeitsgruppe werden Proto- und Protopseudohypericin im Jahre 1957 und Pseudohypericin, dies mit einem Anteil von 0,1-0,6 %, gefunden (1974). Berghöfer untersucht „lipophile Ölhypericine“ (1987). Cyclopseudohypericin wird von Häberlein et al. (1992) beschrieben und als Oxidationsprodukt des Pseudohypericins betrachtet.

### ***Flavonoide, Biflavone und Xanthone***

Die Pflanze enthält ein breites Spektrum an Flavonolen und Flavonen sowie deren Glykosiden in Konzentrationen von 2-4 %, von denen die Quercetinglykoside Hyperosid, Rutin, Quercitrin und Isoquercitrin die Hauptkomponenten darstellen. Als Aglyka konnten Quercetin, Kämpferol, Luteolin und Myricetin nachgewiesen werden (Berghöfer 1987, Hölzl und Ostrowski 1987). Geringe Mengen an freiem Quercetin entstehen wahrscheinlich während der Trocknung der Droge durch Hydrolyse der Quercetinglycoside.

Charakteristisch sind die in Blüten und Knospen der Pflanze lokalisierten dimeren Flavonoide I3,I18-Biapienin (0,1-0,5 %) und für I3',I18-Biapienin (Amentoflavon) (0,01-0,05 %) (Berghöfer 1987).

Für die Familien der Hypericaceae stellen die Xanthone eine typische Naturstoffklasse dar, deren Substanzen vorwiegend in den Wurzeln gespeichert werden. Sie werden jedoch in allen Teilen der Pflanze gefunden. Kielcorin findet sich in einer Konzentration von 0,01 % in *Hypericum perforatum* L., Tetrahydroxyxanthon wird nur in geringen Mengen von 0,0004 % gefunden (Sparenberg 1993).

### ***Tannine und Proanthocyanidine***

Tannine sind mit einem Anteil von ca. 6-15 % vorhanden, weshalb Johanniskraut auch als Gerbstoffdroge bezeichnet wird. Der Gehalt ist während der Blütezeit am höchsten. Die Gerbstoffe sind für den bitteren, adstringierenden Geschmack von Johanniskraut-trockenextrakten verantwortlich. Es handelt sich um Gerbstoffe vom Catechin-Typ. Des Weiteren ist das Vorkommen von Procyanidinen beschrieben (Hölzl et al. 1994).

### ***Aminosäuren und andere stickstoffhaltige Verbindungen***

Nach Lapke et al. (1996) beträgt der Aminosäureanteil in der Droge ca. 1 %. Darin sind geringe Mengen von  $\gamma$ -Aminobuttersäure enthalten. Schütt und Schulz (1993) berichten über Spuren von Cholin und Alkaloiden.

### ***Lipophile Begleitstoffe***

Durch Wasserdampfdestillation lassen sich ca. 0,1 bis 1 % ätherisches Öl aus der Droge gewinnen. Gehaltsdifferenzen resultieren aus jahreszeitlichen Schwankungen. Es enthält als Hauptbestandteile n-Nonan, n-Undecan, 2-Methyloctan und  $\alpha$ -Pinen (Mathis und Ourisson 1964). Im Fett-Wachs-Gemisch, durch Petroletherextraktion erhalten, befinden sich verschiedene Paraffine  $C_{28}$  und  $C_{30}$  sowie langkettige Fettalkohole  $C_{24}$ ,  $C_{26}$  und  $C_{28}$  (Roth 1990). Auch Alkane und Alkanole im Bereich von  $C_{10}$  bis  $C_{22}$  werden gefunden (Omarova und Artamonova 1999). Des Weiteren sind Xanthophylle und 0,75 % Chlorophyll enthalten (Roth 1990).

### ***Pflanzensäuren***

Pflanzensäuren wie Kaffeesäure, Chlorogensäure (weniger als 1 %) und Ascorbinsäure (0,04 %) sind beschrieben (Roth 1990).

## **2.3 Pharmakologie und Klinik**

Von der Kommission E wird Johanniskraut positiv bewertet und durch die Monographie „Hyperici herba“ erfasst. Ölige Hypericum-Zubereitungen werden zur innerlichen Anwendung bei dyspeptischen Beschwerden und äußerlich zur Behandlung und Nachbehandlung von Verletzungen, Myalgien und Verbrennungen

1. Grades empfohlen. Für die Wirkung in der Wundbehandlung wird die stark antibakterielle Wirkung von Hyperforin verantwortlich gemacht (Reichling et al. 2001). Neben Hyperforin beschreibt Maisenbacher (1991) Adhyperforin, Flavonoide, Xanthone und Hypericine in Johanniskrautöl, die ebenfalls an der antiphlogistischen Wirkung beteiligt sein können. So berichten Bork et al. (1999) über die Hemmwirkung von Hypericin auf den am Entzündungsgeschehen beteiligten Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B.

Wesentlich größere Bedeutung kommt der ebenfalls von der Kommission E in der Monographie „Hyperici herba“ beschriebenen innerlichen Anwendung von Johanniskraut zur Behandlung psychovegetativer Störungen, depressiver Verstimmungszustände, Angst und nervöser Unruhe zu. Bei der Anwendung von Johanniskrautfertigpräparaten werden zumeist insgesamt 900 mg Extrakt täglich verabreicht, wobei neuere Präparate auch höhere Dosiermengen empfehlen.

Die Entstehung von Depression wird pharmakologisch mit einem Mangel an Neurotransmittern Noradrenalin, Dopamin und Serotonin (5-HT) in Zusammenhang gebracht. Über eine Hemmung der neuronalen Noradrenalin- bzw. Serotonin-Wiederaufnahme, Hemmung der Monaminoxidase (MAO)-A und Hemmung der präsynaptischen  $\alpha_2$ -Rezeptoren erhöhen viele Antidepressiva die Neurotransmitterkonzentration an den Synapsen der Nervenzellen im Gehirn. Daraufhin kommt es zu adaptiven Veränderungen postsynaptischer Rezeptorsysteme, die zeitparallel mit der antidepressiven Wirkung auftreten: an der noradrenergen Synapse nimmt die Dichte der  $\beta$ -Rezeptoren ab; an der serotoninerger Synapse nimmt die Dichte der 5-HT<sub>2a</sub>-Rezeptoren ebenfalls ab, während die Dichte der 5-HT<sub>1a</sub>-Rezeptoren zunimmt (Müller et al. 1999).

Für Johanniskraut werden dieselben und darüber hinausgehende Wirkmechanismen diskutiert. Hypericine bewirken in vitro eine MAO-Hemmung in hohen Konzentrationen, die jedoch in vivo nicht zu erzielen sind (Thiede und Walper 1993). Sloley et al. (2000) zeigen, dass sich Johanniskrautextrakte in der Inhaltsstoffzusammensetzung und der pharmakologischen Aktivität sehr unterscheiden können, auch wenn sie auf einen Hypericingehalt von 0,3 % standardisiert sind. Hypericine können also nicht allein wirkungsbestimmend sein. Demisch et al. (1989) zeigen, dass

aus Johanniskraut isolierte Xanthere und Flavonoide wirksame MAO-A-Hemmer sind. Diese Verbindungen sind jedoch im Johanniskraut nur in geringen Mengen vorhanden. Man geht daher heute davon aus, dass MAO-Hemmung nicht der einzige Wirkmechanismus von Johanniskraut sein kann.

Des Weiteren berichten zahlreiche Autoren, dass Hyperforin, Adhyperforin, Hypericin und Kämpferol die synaptosomale Wiederaufnahme der fünf Neurotransmitter Serotonin, Dopamin, Noradrenalin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure und L-Glutamat hemmen (Perovic und Müller 1995, Müller et al. 1997 und 1998, Singer et al. 1999, Jensen et al. 2001). Hyperforin und Adhyperforin zeigen hierbei die stärkste Aktivität (Wonnemann et al. 2001). Der Wirkmechanismus von Hyperforin beruht auf einer Erhöhung der intrazellulären Natriumionenkonzentration und wurde bisher einzig für Hyperforin nachgewiesen (Müller et al. 2001). Wie bei der Gabe synthetischer Wiederaufnahme-Hemmer wird auch durch Johanniskraut die Rezeptordichte im Zentralen Nervensystem beeinflusst. Mit Johanniskrautextrakt können Müller et al. (1997) in Tierversuchen eine signifikante Abnahme der  $\beta$ -Rezeptordichte (Downregulation), jedoch auch eine signifikante Zunahme der Dichte der 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren (Upregulation) im frontalen Cortex nachweisen. Ähnliches ist für die Elektrokrampftherapie beschrieben worden, die ultima ratio der Depressionstherapie. Dies ist aussergewöhnlich, da bei Gabe von trizyklischen Antidepressiva die 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptordichte abnimmt. Die Zunahme von 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren kann wünschenswert sein, da diese ausschließlich exzitatorische Funktionen haben und somit der Depression entgegenwirken. Nach heutigem Kenntnisstand könnte Hyperforin an der antidepressiven Wirkung von Johanniskraut wesentlich beteiligt sein (Chatterjee et al. 1998, Dimpfel et al. 1998). Beim Menschen werden pharmakologisch wirksame Blutspiegel von 280 bis 850 nmol/ml erreicht. Die Gabe von Hyperforin führt in EEG-Untersuchungen am Menschen zu ähnlichen Veränderungen wie die Gabe moderner selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren. Hierbei finden Schellenberg et al. (1998) für hyperforinreichen Johanniskrautextrakt eine größere Wirkung als für hyperforinarmen Extrakt. Neuere Untersuchungen weisen für Hyperforin auch eine Stimulierung der Neurotransmitterfreisetzung nach (Chatterjee et al. 2001). In-vivo-Tests ergeben, dass isolierte Hypericine unwirksam sind, jedoch im Beisein von

Procyanidinen (Procyanidin B2), die deren Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit verbessern, Wirksamkeit zeigen. (Kaul 2000). Dies beweist den Einfluss von Coeffektoren. Im Tierversuch bestätigen Butterweck et al. (2000) die antidepressive Wirkung diverser aus Johanniskraut isolierter Flavonoide. Folglich weisen die bisher vorliegenden biochemischen und tierexperimentellen Untersuchungen darauf hin, dass die antidepressive Wirksamkeit von Johanniskraut auf dem Zusammenspiel mehrerer Wirkmechanismen beruht und der gesamte Hypericum-Extrakt als therapeutisch wirksames Prinzip angesehen werden muss (Simmen et al. 2001).

Die Wirksamkeit von Johanniskraut in der Behandlung milder bis mittelschwerer Depressionen wird in einer Vielzahl klinischer Studien belegt. Befindensstörungen wie Konzentrationsschwäche, Schlafstörungen, Libidoverlust und Müdigkeit stehen häufig im Vordergrund der psychischen Erkrankung. Auch diese Begleitsymptome können durch eine Johanniskrautbehandlung signifikant vermindert werden. Der Nachweis der Wirksamkeit erfolgt mittels verschiedener psychometrischer Methoden wie der Hamilton-Depressionsskala (HAMD). Die Aussagekraft der klinischen Studien wird dennoch häufig aufgrund methodischer Mängel kritisiert. Die Vorgabe der Richtlinien zur klinischen Prüfung von Antidepressiva, die eine Studiendauer von mindestens sechs Wochen, eine definierte Indikationsstellung gemäß der International Classification of Diseases (ICD) 10 und zusätzlich einen HAMD-Wert von mindestens 17 Punkten fordert, erfüllen nur wenige neuere Studien (Volz 1997). Linde et al. (1996) zeigen in einer Metaanalyse von 23 klinischen Studien, dass Johanniskrautextrakt gegenüber Placebo deutlich überlegen ist und bei der Behandlung leichter bis mittelstarker Depressionen eine ähnliche Wirkung wie synthetische Antidepressiva aufweist. Nur 22,3 % der mit Placebo behandelten Patienten verzeichneten eine Besserung der Symptome, während bei 55,1 % der mit Johanniskrautextrakt behandelten Patienten Besserung eintrat. Eine aktuelle Zusammenfassung pharmakologischer und toxikologischer Untersuchungen von Johanniskrautextrakt sowie der Ergebnisse klinischer Studien in der Zeit von 1990 bis 2000 geben Greeson et al. (2001). Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass Johanniskraut eine mögliche antidepressive Wirkung zukommt. Woelk (2000) berichtet von einer randomisierten, multizentrischen Doppelblind-Vergleichsstudie, die an einem Patientenkollektiv von

324 Personen mit leichter bis mittelschwerer Depression durchgeführt wurde. Die Studienteilnehmer erhielten entweder zweimal täglich 75 mg Imipramin oder 250 mg Hypericumextrakt sowie jeweils das Placebo der Vergleichsmedikation (Double-Dummy-Design). Johanniskraut ist in dieser Studie nach einer Behandlungszeit von sechs Wochen gegenüber Imipramin therapeutisch äquivalent. Johanniskraut zeigt jedoch eine deutlich geringere Nebenwirkungsrate als Imipramin. Eine amerikanische randomisierte Doppelblind-Vergleichsstudie gegen Sertralin kommt zu dem selben Ergebnis (Brenner et al. 2000).

Als Nebenwirkungen des Johanniskrauts überwiegen harmlose subjektive Beschwerden wie gastrointestinale Symptome und Schwindelgefühl, die den Nebenwirkungen bei Placebogabe entsprechen (Linde et al. 1996, Käufeler et al. 2001). Des weiteren wird selten Photosensibilisierung beobachtet. In jüngster Zeit werden vermehrt Nebenwirkungen diskutiert, die auf eine Aktivierung des P-450 Systems der Leber durch Johanniskraut zurückzuführen sind. So wird eine Verringerung der Serumkonzentrationen von Warfarin, Digoxin, Theophyllin, Cyclosporin und oraler Antikontrazeptiva unter gleichzeitiger Therapie mit Johanniskrautpräparaten berichtet (Johne 1999, Biffignandi und Bilia 2000, Nöldner 2001).

# KAPITEL 3

## ANALYTISCHE CHARAKTERISIERUNG DER EXTRAKTE

### 3.1 Einleitung

Das Inhaltsstoffspektrum in Pflanzen unterliegt natürlichen Schwankungen. Dies wurde auch für Johanniskraut nachgewiesen. Brantner et al. (1994) und Umek et al. (1999) weisen Schwankungen des Gehalts an Hyperforin, Hypericin und Flavonoiden in Johanniskraut in Abhängigkeit von der Vegetationsperiode und Lage der Fundorte nach. Extrakte können daher in Abhängigkeit von der Qualität der verwendeten Ausgangsdroge bei gleicher Extrakterstellungsweise eine unterschiedliche Inhaltsstoffzusammensetzung haben. Dies zeigt sich auch in Untersuchungen von Johanniskraut-Fertigpräparaten. Hiller et al. (2000) und Wurglics et al. (2000) finden bei der Untersuchung des Gesamthypercingehalts und des Hyperforingehalts verschiedener Chargen von Johanniskrautpräparaten zum Teil erhebliche Varianzen bis zu 70 %. Diese Untersuchungen erfassen jedoch nur einen kleinen Teil der Inhaltsstoffe. Der pflanzliche Extrakt ist ein komplex zusammengesetztes Vielstoffgemisch, der in Hauptwirkstoffe und Begleitstoffe unterteilt werden kann (Eder und Mehnert 1998). Begleitstoffe können die physikochemischen Eigenschaften der Hauptwirkstoffe verändern und somit als Coeffektoren biopharmazeutische Parameter beeinflussen. Da Begleitstoffe zum Teil in erheblichen Anteilen im Extrakt enthalten sind, ist auch ein bedeutender Einfluss der Begleitstoffe auf die Verarbeitbarkeit des Extrakts zu erwarten. Dies könnte insbesondere für Kohlenhydrate zutreffen, die in der Literatur für Johanniskraut bis jetzt nicht beschrieben sind.

Im folgenden wird der Gehalt an Wirk- und Begleitstoffen in acht verschiedenen Chargen von Johanniskraut-Trockenextrakten untersucht. Die verwendeten Extraktchargen sind in Tab. 3.1 aufgelistet.

Tab. 3.1 *Verwendete Extraktchargen (94 % Nativanteil / 4 % Lactose D 80 / 2 % Aerosil 200)*

<i>Hersteller/Lieferant</i>	<i>Chargenbezeichnung</i>	<i>Herstellungsjahr</i>	<i>In der Arbeit verwendetes Kürzel</i>
Müggenburg	98040500	1998	M 9845
Indena	98060100	1998	I 9861
	97030100	1997	I 9731
	00040400	2000	I 0044
Finzelberg	98050200	1998	F 9852
	97020200	1997	F 9722
	98030100	1998	F 9831
	00010500	2000	F 0015

### 3.2 Dünnschichtchromatographie

Für eine rasche Überprüfung der Verteilung bestimmter Inhaltsstoffe in verschiedenen Chargen eignet sich als einfache Methode die Dünnschichtchromatographie. So schreibt der DAC (Nachtrag 1991) die Prüfung von Johanniskraut-Droge auf Identität mittels einer dünnschichtchromatographischen Methode vor. Abb. 3.1 zeigt das dünnschichtchromatographische Fingerprint der Extrakte M 9845, I 9861, F 9852, I 9731, F 9831 und F 9722. Nach der chromatographischen Auftrennung ermöglicht das Besprühen der Platte mit Naturstoffreagenz A eine Detektion unter UV-Licht der Wellenlänge 365 nm. Durch Nachbesprühen mit Polyethylenglycol-Reagenz wird eine Fluoreszenzverstärkung und -differenzierung der Flavonoidaglyka und -glykoside erreicht. Bahn 4 in Abb. 3.1 enthält ein Flavonoid-Standardgemisch. Die Quercetin-glykoside Rutin (Retentionsfaktor  $R_f$  0,11) und Isoquercitrin ( $R_f$  0,33) zeigen eine orange Fluoreszenz im UV bei 365 nm. Kämpferol ( $R_f$  0,92) fluoresziert gelbgrün, Quercetin ( $R_f$  0,89) fluoresziert gelb und die Phenolcarbonsäuren Chlorogensäure ( $R_f$  0,24) und Kaffeesäure ( $R_f$  0,86) fluoreszieren blau. In weiteren Versuchen wurde gefunden, dass die Standardsubstanzen Hyperosid ( $R_f$  0,28) orange, Hypericin ( $R_f$  0,6) dunkelrot und Hyperforin ( $R_f$  0,95) blauweiß fluoreszieren. Die Extraktchromatogramme zeigen deutlich die Anwesenheit von Rutin, Chlorogensäure, Hyperosid, Isoquercitrin, Hypericin und Quercitin in allen Extrakten. Kämpferol ist nicht nachweisbar. Kaffeesäure kommt in Spuren vor. Unbekannte Substanzen erscheinen bei  $R_f$  0,43 und 0,49 als orange Banden. Der Fluoreszenzfärbung nach zu urteilen handelt es sich um Flavonglykoside.

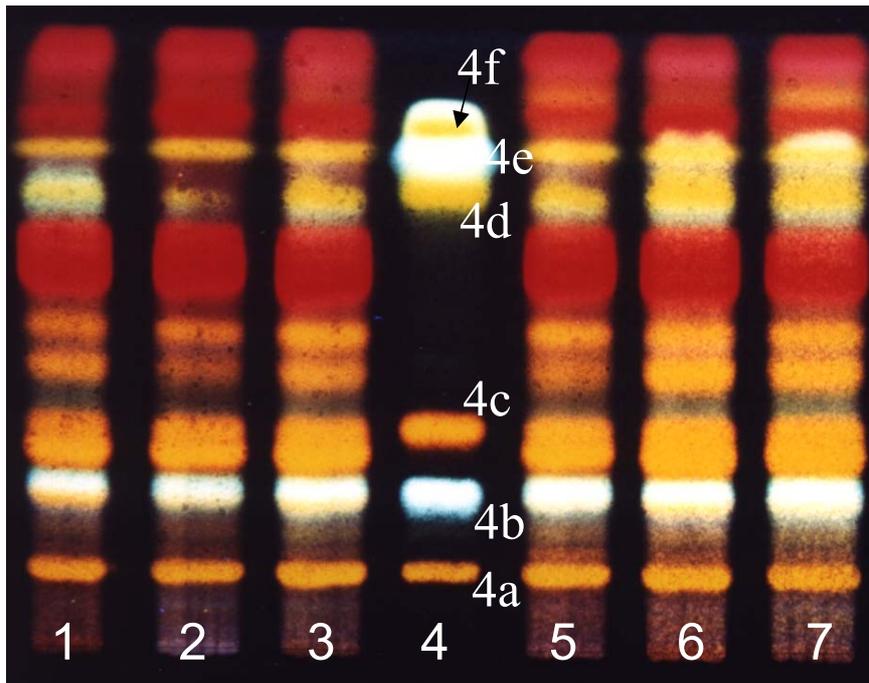


Abb. 3.1 Dünnschichtchromatographisches Fingerprint der Extrakte  
 (1) F 9722, (2) F 9831, (3) I 9731, (5) F 9852, (6) I 9861, (7) M 9845  
 Standardgemisch (4): (4a) Rutin, (4b) Chlorogensäure, (4c) Isoquercitrin  
 (4d) Kaffeesäure, (4e) Quercetin, (4f) Kämpferol;  
 Detektion: Naturstoffreagenz / Polyethylenglykol, UV 365 nm.

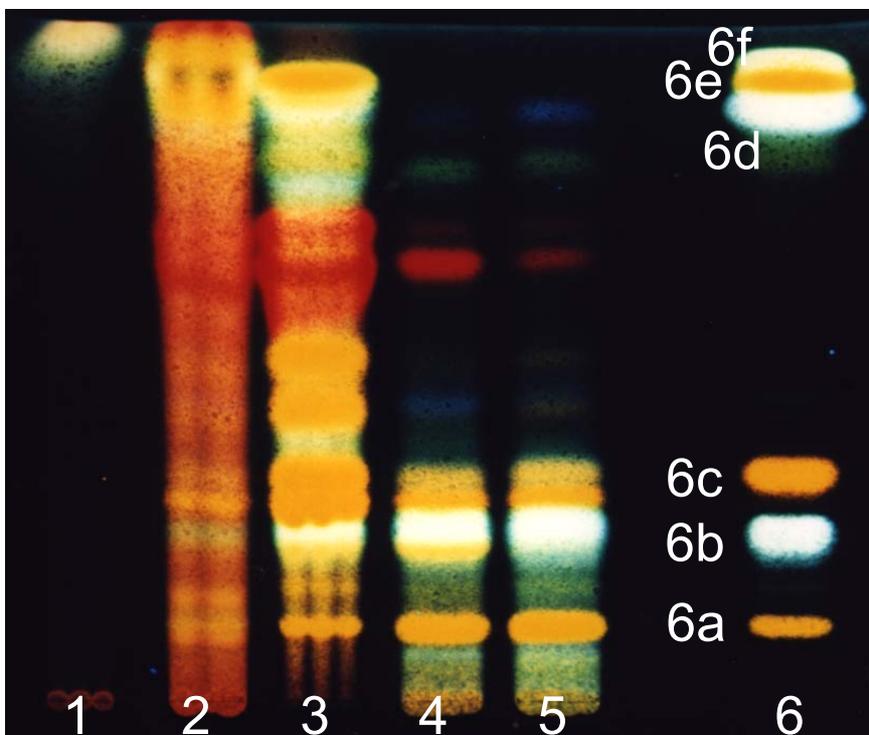


Abb. 3.2 Dünnschichtchromatographisches Fingerprint der Phasen des Schüttelganges  
 (1) Hexan-Phase, (2) Dichlormethan-Phase, (3) Ethylacetat-Phase, (4) Wasser,  
 (5) Oasis-Eluat-(Methanol), (6) Standardgemisch: (6a) Rutin, (6b)  
 Chlorogensäure, (6c) Isoquercitrin, (6d) Kaffeesäure, (6e) Quercetin, (6f)  
 Kämpferol; Detektion: NST/PEG, UV 365 nm.

Im  $R_f$ -Bereich 0,9-1 fluoresziert eine Substanz leuchtend rot, bei der es sich um Chlorophyll handeln könnte. Alle sechs Extrakte zeigen eine vergleichbare Flavonoidzusammensetzung. Die Extrakte I 0044 und F 0015 standen zum Zeitpunkt dieser Untersuchung noch nicht zur Verfügung. Die später vorgenommene Untersuchung dieser Extrakte mittels HPLC zeigt qualitativ keine Unterschiede.

### 3.3 Extraktfraktionierung

Merfort (1990) beschreibt die Fraktionierung der Inhaltsstoffe von Arnica mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität. Um das Vorkommen von Substanzen unterschiedlicher Polarität in den Johanniskrautextrakten abschätzen zu können, werden in der vorliegenden Arbeit die Extrakte M 9845, I 9861, F 9852, I 9731, F 9831 und F 9722 durch Flüssig-Flüssig-Extraktion unter Verwendung von n-Hexan, Dichlormethan, Ethylacetat und Wasser wie bei Merfort (1990) beschrieben fraktioniert. Die getrockneten organischen Phasen und die getrocknete Wasserphase werden gewogen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.2 zusammengefasst. Die Extrakte I 0044 und F 0015 werden nur mit n-Hexan extrahiert. Die n-Hexanphase enthält die apolaren Bestandteile wie Chlorophyll, Fette, Wachse, Terpene und Hyperforin. Nach Merfort (1990) werden in der Dichlormethanphase (mittlerer Trockensubstanzgehalt aus zwei Bestimmungen (TS) 3,2-7,0 %) Flavonaglyka (z.B. Quercetin) und in der Ethylacetatphase (TS 7,0-10,6 %) Flavonglykoside erwartet. In der Wasserphase (TS 62,3-72,5 %) sollten nur die polaren Inhaltsstoffe wie Salze, Pflanzensäuren, Flavondiglykoside (Rutin), Aminosäuren, Gerbstoffe und Zucker vorhanden sein. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.2 dargestellt. Der TS der n-Hexan-Phase beträgt 10,0 bis 14,4 %. Eine dünnschichtchromatographische Untersuchung (Abb. 3.2) der Fraktionen des Schüttelganges zeigt, dass in der n-Hexanphase ausschließlich stark lipophile Bestandteile vorliegen. Die Extraktion mit Dichlormethan und Ethylacetat erbringt jedoch keine klare Auftrennung der Inhaltsstoffe von Johanniskraut. Die Ethylacetat-Phase enthält sowohl Flavonaglyka als auch Rutin. In der Wasserphase werden noch deutliche Mengen an Flavonglykosid (Isoquercitrin) gefunden. Die Fraktionierung von Johanniskrautextrakt mit Dichlormethan und Ethylacetat kann daher nur zur Orientierung dienen.

Tab. 3.2 Trockensubstanzgehalt der organischen Phasen und der Wasserphase bezogen auf die Einwaage

Extraktchargen	Trockensubstanzgehalt (Bestimmungen a / b)			
	n-Hexan-Phase	Dichlormethan-Phase	Ethylacetat-Phase	Wasserphase
M 9845	9,8 / 10,1	3,9 / 4,1	11,5 / 9,6	65,8 / 66,0
I 9861	9,4 / 11,3	2,7 / 3,4	9,7 / 10,7	65,5 / 59,0
F 9852	10,7 / 15,0	8,5 / 5,5	6,9 / 7,4	65,2 / 66,8
I 9731	10,0 / 10,5	5,1 / 7,5	9,5 / 10,4	65,3 / 64,9
F 9722	12,2 / 11,7	4,2 / 5,5	8,5 / 10,3	72,6 / 72,3
F 9831	12,4 / 15,4	2,7 / 3,6	6,5 / 7,4	67,2 / 63,5
I 0044	12,3 / 13,6	-	-	-
F 0015	14,8 / 13,9	-	-	-

### 3.4 Quantifizierung der potentiell wirksamen Inhaltsstoffe Flavonoide, Hyperforin und Hypericin

#### 3.4.1 HPLC-Bestimmung der Flavonoide

Die in Johanniskraut vorkommenden Flavonoide sind zumeist Glykoside des Flavonols Quercetin. Quercetin ist eines der am weitesten verbreiteten Flavonoide in Pflanzen (Roth 1990). Die chemische Struktur einiger Flavonoide in *Hypericum perforatum* L. ist in Abb. 3.3 dargestellt.

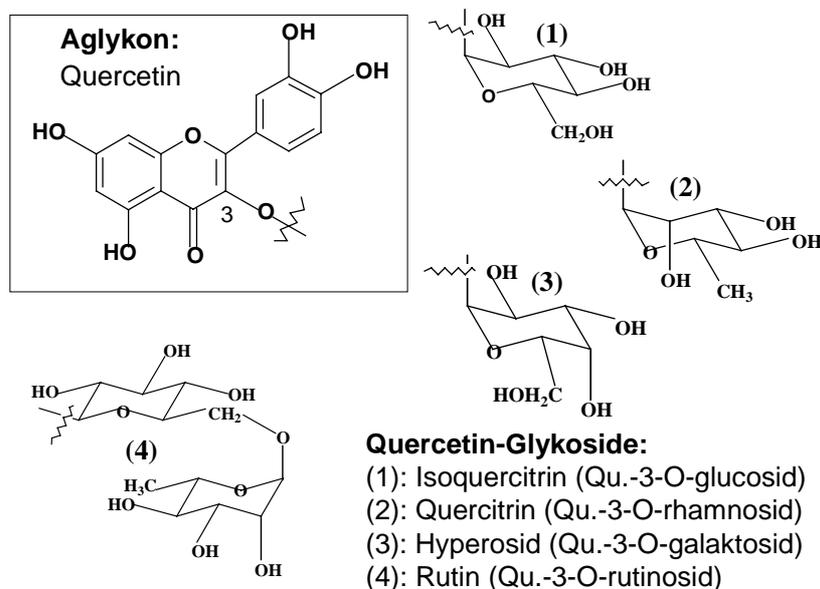


Abb. 3.3 Chemische Struktur einiger Flavonoide in *Hypericum perforatum* L.

### Methoden

Christ und Müller (1960) geben eine photometrische Methode zur Bestimmung des Gehaltes an Flavonolen in *Herba Hyperici* an. Diese Methode ist jedoch sehr unspezifisch. Eine zur Aufnahme in die USP vorgeschlagene Methode (In-process revision 1998) und Brolis et al. (1998) verwenden eine identische HPLC-Methode zur Auftrennung der Inhaltsstoffe. Da diese Methode eine Trennung der Flavonoide ermöglicht und als künftige USP-Methode anerkannt ist, erfolgt in dieser Arbeit die Bestimmung der Flavonoide nach der von Brolis et al. (1998) beschriebenen Gradienten-Methode. Die Trennung der Flavonoide ist nach 27 min, die Trennung aller erfassten Inhaltsstoffe nach 45 min abgeschlossen. Abb 3.4 zeigt das HPLC-Chromatogramm der Flavonoide und weiterer Inhaltsstoffe des Extraktes F 9831.

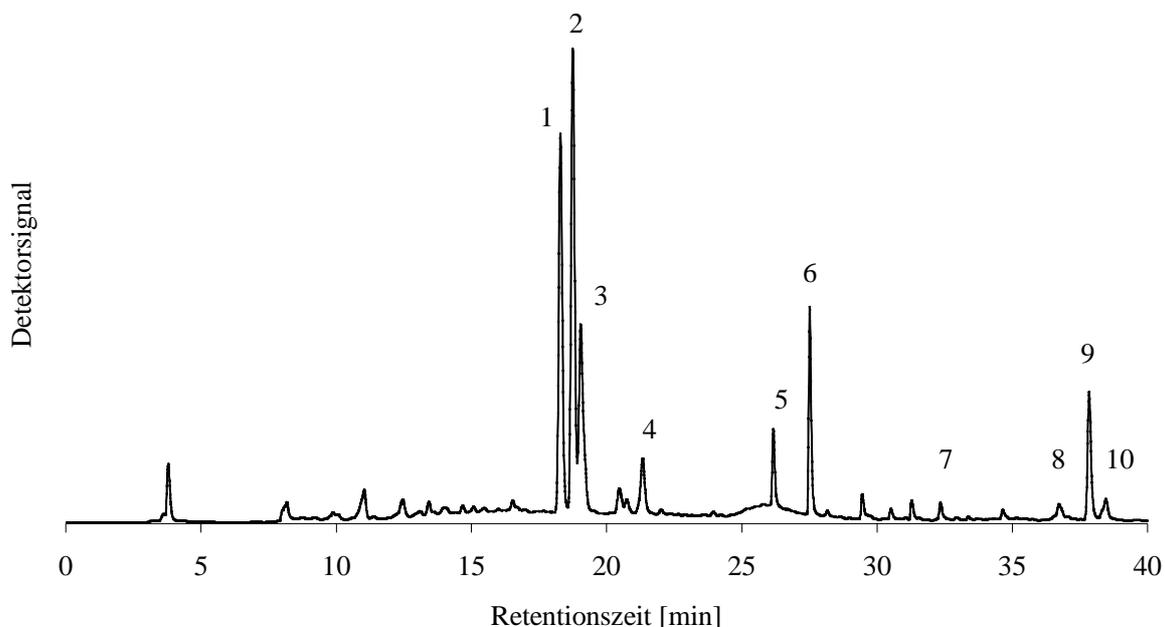


Abb. 3.4 HPLC-Chromatogramm der Flavonoide und weiterer Inhaltsstoffe des Extraktes F 9831; Peaknachweis: 1 Rutin, 2 Hyperosid, 3 Isoquercitrin, 4 Quercitrin, 5 Quercetin, 6 13,118 Biapigenin, 7 Pseudohypericin, 8 Hypericin, 9 Hyperforin, 10 Adhyperforin.

Durch Vergleich mit Standardsubstanzen werden die Peaks anhand ihrer Retentionszeit ( $R^t$ ) identifiziert. Die wesentlichen Flavonoide sind die C-3-Glykoside des Quercetins ( $R^t$  26,2 min): Rutin ( $R^t$  18,3 min), Hyperosid ( $R^t$  18,7 min), Isoquercitrin ( $R^t$  19 min) und Quercitrin ( $R^t$  21,3 min). Die Bestimmung des Flavonoidgehalts erfolgt mit Rutin als externem Standard. Da bei der UV-Detektion die Responsefaktoren der Flavonoide gegenüber dem Responsefaktor des Rutins

verschieden sind, werden die relativen Responsefaktoren (RRF) bezogen auf Rutin bestimmt. Die RRF von Hyperosid (1,25), Isoquercitrin (1,20), Quercitrin (1,23) und Quercetin (1,69) sind mit den von Brolis et al. (1998) ermittelten RRF vergleichbar. Abb 3.5 zeigt die Flavonoidgehalte der Extrakte bestimmt mittels HPLC.

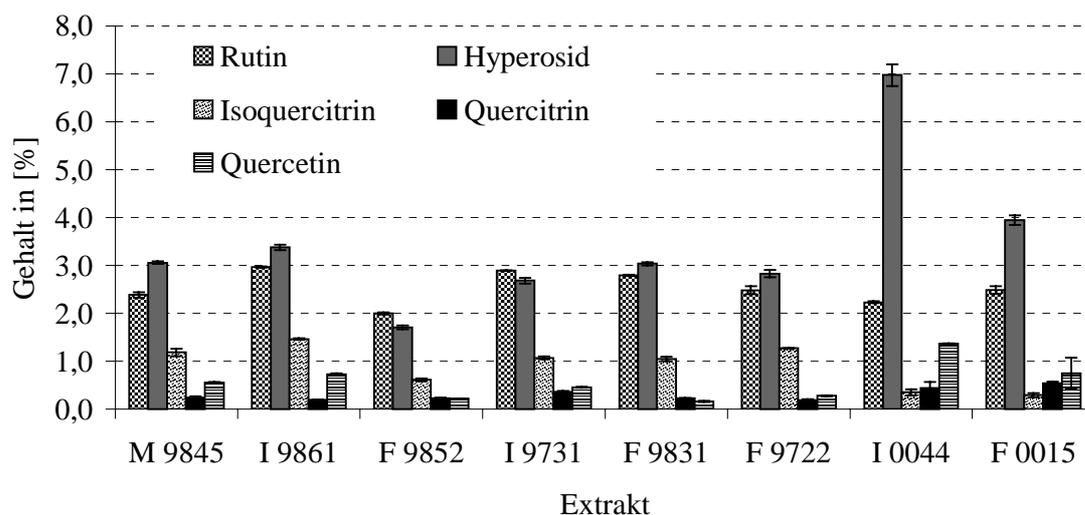


Abb. 3.5 Flavonoidgehalt der Extrakte bestimmt mittels HPLC.

Die Hauptflavonoide sind Rutin und Hyperosid, wobei der Rutingehalt 2,0 bis 3,0 % und der Hyperosidgehalt 1,7 bis 7,0 % beträgt. Alle Extrakte haben eine charakteristische Flavonoidverteilung, wobei besonders Extrakt I 0044 einen hohen Anteil an Hyperosid und Quercetin aufweist. Freies Quercetin entsteht wahrscheinlich durch Hydrolyse von Quercetinglykosiden während der Extraktion, der Trocknung und der weiteren Verarbeitung der Extrakte (Nahrstedt und Butterweck (1997)). Der Quercetingehalt der Extrakte beträgt 0,2 bis 1,4 %. Isoquercitrin kommt in Mengen von 0,3 bis 1,5 % vor, während der Quercitringehalt für alle Extrakte mit Ausnahme des Extraktes F 0015 unter 0,5 % beträgt. Aus der Summe der Einzelflavonoidgehalte wird der Gesamtflavonoidgehalt zu 4,8-11,4 % bestimmt (Tab. 3.10, S. 27). Die in der Literatur für die Johanniskraut-Droge beschriebenen Flavonoidgehalte sind sehr unterschiedlich. Bombardelli und Morazzoni (1995) geben für 50 untersuchte Pflanzen einen durchschnittlichen Rutingehalt von 0,28 %, während Umek et al. (1999) in 22 verschiedenen Johanniskraut-Ernten einen durchschnittlichen Rutingehalt von 0,4 % finden. Brantner et al. (1994) geben für 38 Johanniskraut-Ernten einen

durchschnittlichen Gesamtflavonoidgehalt von 2,2 % an. Der Gesamtflavonoidgehalt in Johanniskraut-Droge beträgt im Allgemeinen 2 % bis 4 % (Kaul 2000). Somit bewirkt die Extrakterstellung im Vergleich zur Droge eine vier- bis zehnfache Aufkonzentrierung der Flavonoide. Für eine zukünftige Monographie für Trockenextrakt von *Hypericum perforatum* L. schlagen Lang et al. (1999) einen Gesamtflavonoidgehalt von 4 % bis 8 % vor. Alle untersuchten Extrakte erfüllen diese Forderung mit Ausnahme der Extrakte I 9861 und I 0044, die einen höheren Gesamtflavonoidgehalt aufweisen. Das Chromatogramm in Abb. 3.4 zeigt des weiteren I3,II8-Biapigenin ( $R^t$  27,5 min), Hypericin ( $R^t$  34,6 min), Orthoforin ( $R^t$  36,7 min), Hyperforin ( $R^t$  37,8 min) und Adhyperforin ( $R^t$  38,5 min), die mittels Standardsubstanzen identifiziert werden. Hypericin und Hyperforin werden mit anderen Analysemethoden (3.4.2 und 3.4.3) quantifiziert, da die Bestimmung von Hypericin eine vorhergehende Belichtung der Probe erfordert, während die Bestimmung von Hyperforin unter Lichtschutz erfolgen muss.

### ***Kalibrierung und Validierung des HPLC-Analysenverfahrens zur Bestimmung der Flavonoide***

Nähere Angaben zur Kalibrierung und Validierung von Analyseverfahren finden sich bei Ebel (1995). Die Parameter der Kalibrierung und Validierung sind in Tab. 3.3 und 3.4 zusammengestellt.

*Tab. 3.3 Kalibrierparameter der HPLC-Bestimmung von Rutin im Extrakt*

<i>Parameter</i>	<i>Rutin</i>
Messbereich [mg/100 ml]	1,892 – 47,306
Anzahl der Kalibrierproben	36
Datenschwerpunkt	E[xc] = 23,968 mg/100 ml E[yc] = 1217866 AUC
Korrelationskoeffizient (r)	0,9999
Steigung/Empfindlichkeit [AUC / (mg/100 ml)]	50384,7
Kalibrierfunktion (Extrakt)	$y(x) = 50384,7 [x-23,968] + 1217866,4$

*Tab. 3.4 Validierungsparameter der HPLC-Bestimmung von Rutin im Extrakt*

<i>Parameter</i>	<i>relsdv [%]</i>	
Systempräzision (n=12)	Standard (Rutin)	0,51
	Extrakt (Gesamtflavonoide)	0,73
Methodenpräzision (n=6)		0,83
Erfassungsgrenze [mg/100 ml]		0,030
Bestimmungsgrenze [mg/100 ml]		0,093

Der Zusammenhang zwischen vorgegebener Konzentration und den erhaltenen Messwerten ist linear. Die Kalibriergerade für Rutin und der zugehörige Residuenplot sind in Abb. 3.6 gezeigt. Die Bereichsmittle der Kalibrierung wird so gewählt, dass sie mit der am häufigsten zu erwartenden Probenkonzentration übereinstimmt. Jeder Punkt der Regressionsgeraden wird durch sechsfache Wiederholungsmessung bestimmt.

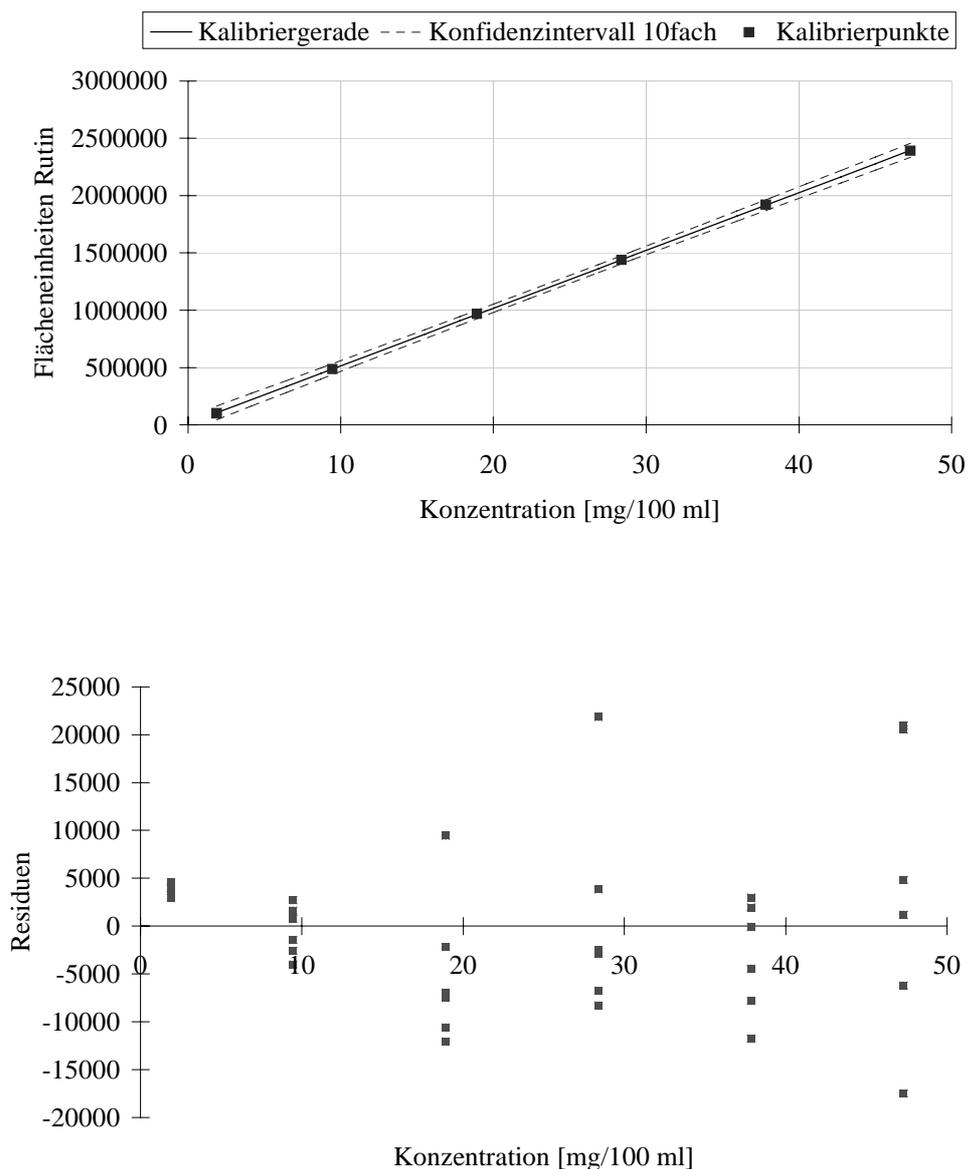


Abb. 3.6 Kalibriergerade für Rutin und zugehöriger Residuenplot.

Die Unsicherheit der Datenpunkte in y-Richtung und die Unsicherheit der Steigung der Geraden werden durch den 95 % Vertrauensbereich erfasst. Der lineare Zusammenhang zwischen Detektorsignal und Probengehalt eines Extraktes wird

überprüft und nachgewiesen. System- und Methodenpräzision der Analytik sind kleiner als 1 %.

### **3.4.2 HPLC-Bestimmung und Stabilität von Hyperforin**

Hyperforin ist eine lipophile Verbindung, die als eine der wertbestimmenden Inhaltsstoffe von Johanniskraut betrachtet wird. Es ist sehr oxidationsempfindlich und wird unter dem Einfluss von Licht und Wärme abgebaut (Erdelmeier 1998). Orth et al. (1999b) klären die Struktur eines Oxidationsproduktes namens Orthoforin auf. Ferner untersuchen Orth et al. (2000) die Stabilität von Hyperforin und Adhyperforin in Lösung und machen Vorschläge für Stabilisierungsmaßnahmen. Das Stabilitätsverhalten von Hyperforin und Adhyperforin ist identisch. In Lösung wird eine deutliche Destabilisierung bei abnehmender Polarität des Lösungsmittels beobachtet. Im Extrakt übt die Drogenmatrix einen stabilisierenden Effekt auf Hyperforin aus (Orth 1999a).

#### ***HPLC-Bestimmung von Hyperforin***

Die Hyperforingehalte aller Extrakte werden nach einer von Orth et al. (1999c) beschriebenen isokratischen Methode untersucht. Eine sehr ähnliche HPLC-Methode wird auch von Chi und Franklin (1999) zur Bestimmung von Hyperforin in Blutplasma angewandt. Durch Vergleich mit Standardsubstanz wird der Hyperforin-Peak anhand seiner Retentionszeit identifiziert. Die Bestimmung von Hyperforin erfolgt mit Hyperforin 95,8 % als externem Standard. Die Isolierung von Reinsthyperforin 99,9 % erfolgte durch Orth et al. (1999c). Der Hyperforingehalt des Isolates nimmt während der Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  langsam ab und beträgt zum Untersuchungszeitpunkt noch 95,8 %. Die Berechnung des Hyperforingehalts von Hyperforin 95,5 % erfolgt aus dem Verhältnis der Flächenanteile von Hyperforin (MG 535) und Orthoforin (MG 551) unter Berücksichtigung der Molekulargewichte. Da die Reinheit des Standards von Orth et al. (1999c) nachgewiesen wurde, können weitere Verunreinigungen ausgeschlossen werden. Das HPLC-Chromatogramm von Hyperforin 95,8 % ist in Abb. 3.7 gezeigt.

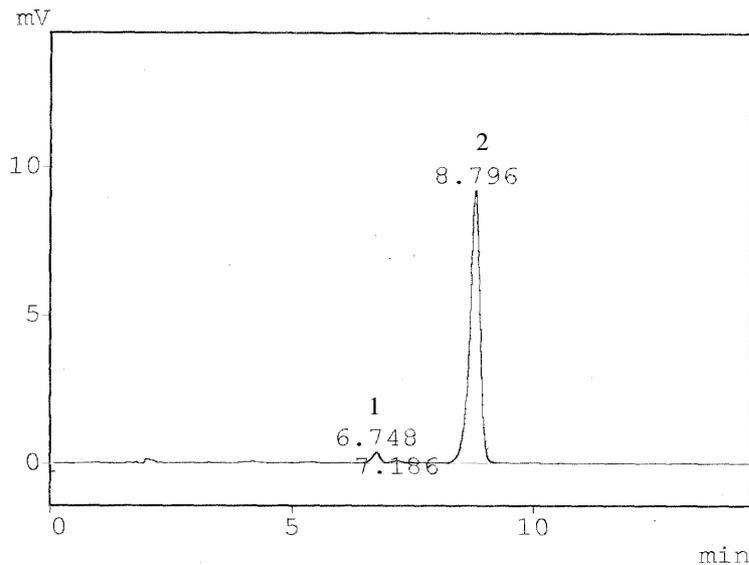


Abb. 3.7 HPLC-Chromatogramm von Hyperforin 95,8 %;  
Peak-Nachweis: 1 Orthofoforin, 2 Hyperforin.

Als Beispiel eines Extraktchromatogramms ist das HPLC-Chromatogramm des Extraktes I 9861 in Abb. 3.8 dargestellt. Hyperforin ist bei  $R^t$  8,6 min und Adhyperforin bei  $R^t$  9,9 zu erkennen. Das Abbauprodukt von Hyperforin, das Orthofoforin, ist bei  $R^t$  7,1 sichtbar. Das Signal bei  $R^t$  7,7 weist auf das entsprechende Abbauprodukt von Adhyperforin hin.

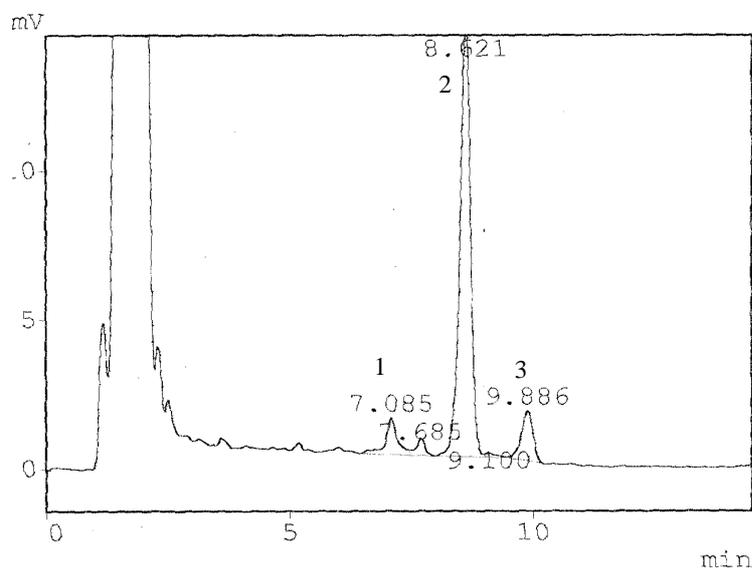


Abb. 3.8 HPLC-Chromatogramm des Extraktes I 9861;  
Peak-Nachweis: 1 Orthofoforin, 2 Hyperforin, 3 Adhyperforin.

Die Hyperforin-Gehalte der Extrakte sind in Abb. 3.9 dargestellt. Hyperforin ist in den Extrakten zu 1,3-3,9 % enthalten. Der Extrakt I 9731 weist mit 1,3 % den geringsten

Hyperforin-Gehalt auf. Mit Ausnahme der Extrakte I 9731, F 9722 und F 0015 haben alle Extrakte einen Hyperforin-Gehalt von über 3 %.

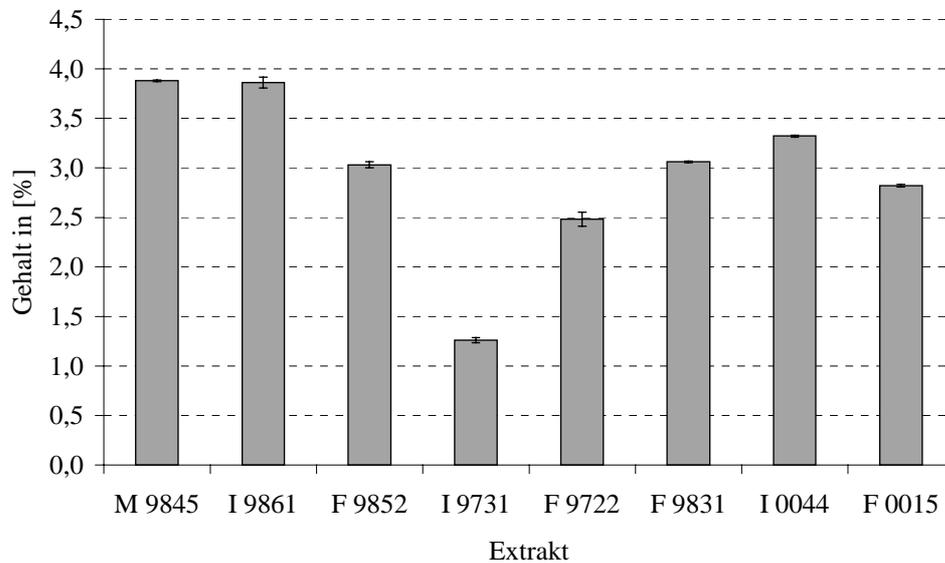


Abb. 3.9 Hyperforingehalt der Extrakte bestimmt mittels HPLC.

Da der Hyperforinstandard 95,8 % nur in sehr begrenzten Mengen zur Verfügung steht, werden für weitere Arbeiten zur Quantifizierung von Hyperforin zwei Sekundärstandards ausgewählt. Sekundärstandard I ist ein Gemisch von Hyperforin und Adhyperforin im Verhältnis 80/20.

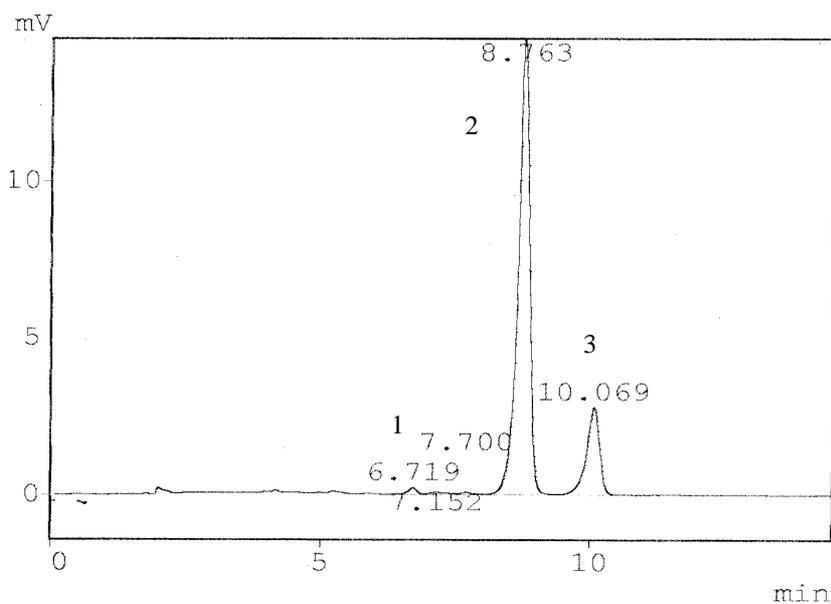


Abb. 3.10 HPLC-Chromatogramm des Sekundärstandards Hyperforin/Adhyperforin 80 % / 20 % (Sekundärstandard I); Peak-Nachweis: 1 Orthoformin, 2 Hyperforin, 3 Adhyperforin.

Das Chromatogramm des Sekundärstandards I (Abb. 3.10) zeigt bei  $R^t$  6,7 min Orthoformin, bei  $R^t$  8,8 min Hyperforin und bei  $R^t$  10,1 min Adhyperforin. Der Hyperforin-Gehalt des Sekundärstandards I beträgt 75,8 %. Als weiterer Sekundärstandard wurde der hyperforinreiche Extrakt I 9861 ausgewählt, dessen Gehalt mit 3,9 % bestimmt wird (Sekundärstandard II). Die Lagerung der Sekundärstandards erfolgt bei  $-70^\circ\text{C}$ .

### *Lagerstabilität der Sekundärstandards und Extrakte*

Die Lagerstabilität der Sekundärstandards wird nach 18 Monaten Lagerung bei  $-70^\circ\text{C}$  bestimmt. Während der Hyperforin-Gehalt von Sekundärstandard I im Untersuchungszeitraum um 30 % abnimmt, bleibt der Hyperforin-Gehalt des Sekundärstandards II stabil (Tab. 3.5). Dies zeigt den stabilisierenden Einfluss der Extraktmatrix. Folglich ist ein Trockenextrakt mit bekanntem Hyperforingehalt als Sekundärstandard besser geeignet als ein Hyperforin-Isolat. Desweiteren wird die Lagerstabilität der Extrakte M 9845, I 9861, F 9852, I 9731, F 9831 und F 9722 überprüft. Die Extrakte wurden 18 Monate bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gelagert. Der Hyperforingehalt der Extrakte vor und nach Lagerung ist ebenfalls in Tab. 3.5 aufgelistet.

*Tab. 3.5 Hyperforingehalt der Extrakte und Sekundärstandards vor und nach Lagerung (18 Monate Lagerung bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss)*

<i>Chargen</i>	<i>Hyperforingehalt (<math>\pm</math> sdv)</i>	
	<i>Vor der Lagerung</i>	<i>Nach 18 Monaten Lagerung unter Raumtemperatur und Lichtausschluss</i>
M 9845	3,9 *	3,1 *
I 9861	3,9 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,1
F 9852	3,0 *	1,7 $\pm$ 0,1
I 9731	1,3 *	1,0 *
F 9722	2,5 $\pm$ 0,1	1,2 *
F 9831	3,1 *	0,7 **
Hyperforin/Adhyp. 80% / 20 % <sup>1)</sup>	75,8 $\pm$ 0,1	53,3 *
I 9861 (gelagert bei $-70^\circ\text{C}$ ) <sup>2)</sup>	3,9 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,1

<sup>1)</sup> Sekundärstandard I (gelagert bei  $-70^\circ\text{C}$ ); <sup>2)</sup> Sekundärstandard II;

\* sdv < 0,1; \*\* sdv < 0,01.

Die Stabilitätsdaten zeigen, dass der Hyperforingehalt der Extrakte nach 18 monatiger Lagerung 0,7 % bis 3,1 % beträgt. Dies ist eine bedeutende Abnahme des Hyperforingehalts von 17 % bis 77 % verglichen mit den Ausgangsgehalten. Die Hyperforinabnahme ist bei Extrakt F 9831 am stärksten. Die Ergebnisse zeigen, dass sich Hyperforin auch in der Gegenwart von stabilisierenden Begleitstoffen des Extrakts bei

Raumtemperatur zersetzt. Das Ausmaß der Zersetzung ist jedoch für jeden Extrakt unterschiedlich. Für eine zukünftige Monographie für Trockenextrakt von *Hypericum perforatum* L. schlagen Lang et al. (1999) einen Hyperforingehalt von 2,0 % bis 6,0 % vor. Mit Ausnahme des Extrakts I 9731 erfüllen alle Extrakte diese Forderung.

### ***Kalibrierung und Validierung des HPLC-Analysenverfahrens zur Bestimmung von Hyperforin***

Die Kalibrierparameter der HPLC-Bestimmung von Hyperforin sind in Tab. 3.6 angegeben. Die Validierungsparameter sind in Tab 3.7 angegeben.

*Tab. 3.6 Kalibrierparameter der HPLC-Bestimmung von Hyperforin in Extrakt*

<i>Parameter</i>	<i>Hyperforin</i>
Messbereich [mg/100 ml]	0,295 – 14,765
Anzahl der Kalibrierproben	36
Datenschwerpunkt	E[xc] = 6,152 mg/100 ml E[yc] = 142582 AUC
Korrelationskoeffizient (r)	1,0000
Steigung/Empfindlichkeit [AUC / (mg/100 ml)]	23113,5
Kalibrierfunktion (Extrakt)	$y(x) = 23114,5 [x - 6,1521] + 142582$

*Tab. 3.7 Validierungsparameter der HPLC-Bestimmung von Hyperforin in Extrakt*

<i>Parameter</i>		<i>relsdv [%]</i>
Systempräzision (n=12)	Standard	0,26
	Extrakt	0,30
Methodenpräzision (n=6)		1,50
Erfassungsgrenze [mg/100 ml]		0,007
Bestimmungsgrenze [mg/100 ml]		0,024

Im Rahmen der Validierung werden die Systempräzision, die Methodenpräzision, die Erfassungsgrenze und die Bestimmungsgrenze bestimmt.

### **3.4.3 HPLC-Bestimmung von Gesamthypericin**

Hypericin und Pseudohypericin sind die mengenmäßig vorherrschenden Naphthodiantrone in Johanniskraut, wobei Pseudohypericin meist in zwei- bis vierfach höher Konzentration vorliegt als Hypericin. Sie entstehen durch Cyclisierung aus Protohypericin und Protopseudohypericin unter der Einwirkung von Licht. Wirz et al. (2001) untersuchen die Stabilität von Hypericin und Pseudohypericin in Extraktlösungen von *Hypericum perforatum* L. und in Standardlösungen. Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  sind die Lösungen 140 Tage lang stabil, wohingegen Temperaturerhöhung und Licht die

Zersetzung von Hypericin und Pseudohypericin beschleunigen. Sie bestätigen damit von Müller-Kuhrt und Boesel (1993) veröffentlichte Befunde.

### *Method*

Nach DAC (1991) werden die Dianthrone photometrisch bei einer Wellenlänge von 590 nm bestimmt und als Hypericin berechnet (Brockmann et al. 1942). Um den Mehrbefund durch unspezifische Begleitstoffe wie Chlorophyll zu reduzieren, werden diese durch Extraktion mit Dichlormethan vor der Analyse abgetrennt. Nachteilig ist der Mangel an Selektivität, so werden beispielsweise die Protohypericine miterfaßt. Dies führt zu erhöhten Werten (Schütt und Hölzl 1994; Müller-Kuhrt und Boesel 1993). Krämer und Wiartalla stellen 1992 eine isokratische, selektive HPLC-Methode zur Bestimmung von Naphthodiantronen vor. Um reproduzierbare Bedingungen zu erhalten, werden die Protoberbindungen durch Belichtung vor der Analyse quantitativ in Pseudohypericin und Hypericin überführt (Krämer und Wiartalla 1992, Gaedcke 1997) und der Gesamthypericingehalt bestimmt. Eine zu lange Belichtungszeit ist zu vermeiden, da dies zu einer Polymerisation des Hypericins führen kann (Müller-Kuhrt und Boesel 1993).

Die in dieser Arbeit angewandte isokratische HPLC-Methode zur Bestimmung von Gesamthypericin mittels UV-Detektion erfolgt in Anlehnung an die Methode nach Schütt und Hölzl (1994). Die Trennung von Pseudohypericin, Cyclopseudohypericin und Hypericin ist nach 10 min abgeschlossen. Durch Vergleich mit Standardsubstanz wird Hypericin anhand der Retentionszeit zugeordnet. Die Bestimmung des Gesamthypericingehaltes erfolgt mit Hypericin als externem Standard. Maßgeblich für die Berechnung des Gesamthypericingehaltes als Hypericin ist die integrierte Peaksummenfläche von Pseudohypericin und Hypericin nach Belichtung der Proben. Cyclopseudohypericin wird wegen der geringen Konzentration nicht mitberechnet. Das HPLC-Chromatogramm der Hypericin-Analytik des Extrakts F 0015 ist in Abb. 3.11 dargestellt.

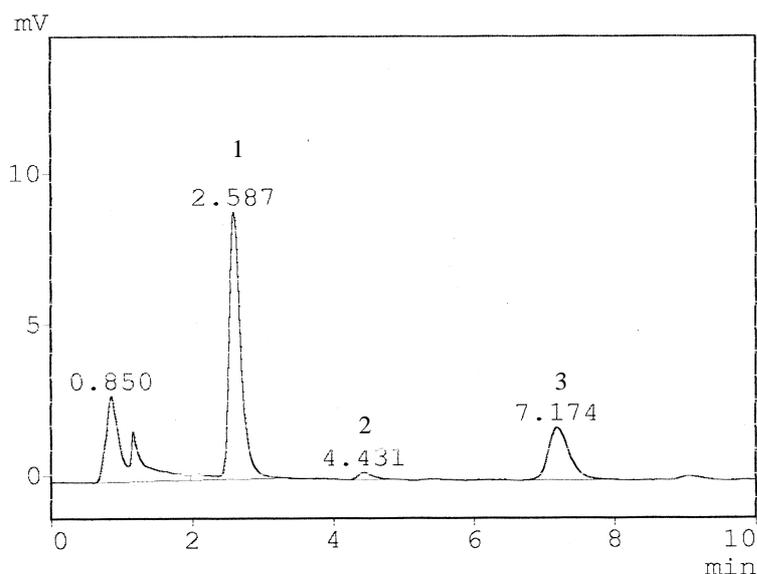


Abb. 3.11 HPLC-Chromatogramm der Hypericin-Analytik des Extrakts F 0015;  
Peak-Nachweis: 1 Pseudohypericin, 2 Cyclopseudohypericin, 3 Hypericin.

Pseudohypericin ist bei  $R^t$  2,6 min, Cyclopseudohypericin bei  $R^t$  4,4 min und Hypericin bei  $R^t$  7,2 min zu erkennen. Wie in Abb. 3.12 gezeigt, enthalten die Extrakte Gesamthypericin in Konzentrationen von 0,19 bis 0,3 %.

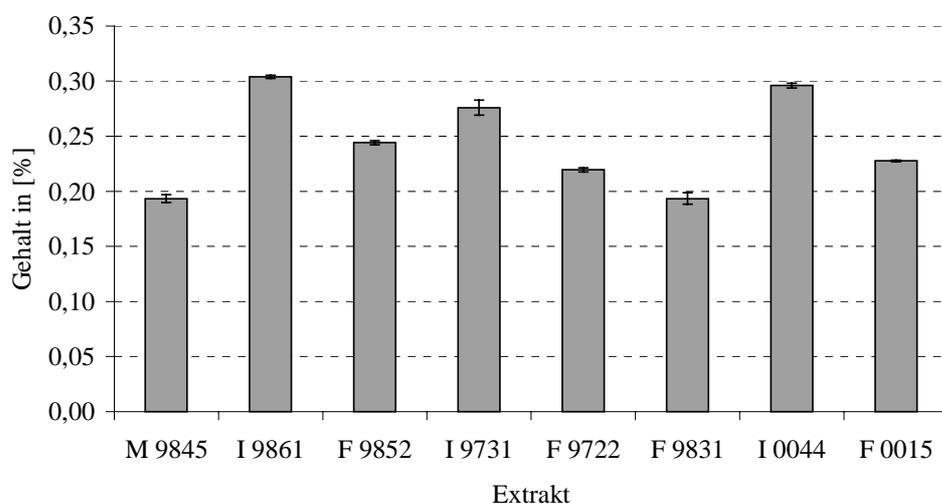


Abb. 3.12 Gesamthypericingehalt der Extrakte bestimmt mittels HPLC.

Dies ist im Bereich von 0,03 bis 0,3 %, der von Nahrstedt und Butterweck (1997) für den Gesamthypericingehalt der Johanniskraut-Droge angegeben wird. Für eine zukünftige Monographie für Trockenextrakt von *Hypericum perforatum* L. schlagen Lang et al. (1999) einen Gesamthypericingehalt von 0,1 % bis 0,3 % vor. Alle untersuchten Extrakte erfüllen diese Forderung.

### ***Kalibrierung und Validierung des HPLC-Analysenverfahrens zur Bestimmung von Hypericin***

Die Kalibrierparameter der HPLC-Bestimmung von Hypericin sind in Tab. 3.8 und die Validierungsparameter sind in Tab. 3.9 angegeben.

*Tab. 3.8 Kalibrierparameter der HPLC-Bestimmung von Hypericin in Extrakt*

<i>Parameter</i>	<i>Gesamthypericin</i>
Messbereich [mg/100 ml]	0,052 - 2,601
Anzahl der Kalibrierproben	36
Datenschwerpunkt	E[xc] = 0,806 mg/100 ml E[yc] = 99236 AUC
Korrelationskoeffizient	1,0000
Steigung/Empfindlichkeit [AUC / (mg/100 ml)]	125330
Kalibrierfunktion Gesamthypericin	$y(x) = 125330,174 [x-0,806] + 99236,444$

*Tab. 3.9 Validierungsparameter der HPLC-Bestimmung von Gesamthypericin im Extrakt*

<i>Parameter</i>		<i>relsdv [%]</i>
Systempräzision (n=12)	Standard	0,28
	Extrakt	0,34
Methodenpräzision (n=6)		0,94
Erfassungsgrenze [mg/100 ml]		0,011
Bestimmungsgrenze [mg/100 ml]		0,036

### **3.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung der wirksamen Bestandteile**

Der Gehalt an Gesamtflavonoid, Hyperforin und Hypericin ist in Tab. 3.10 zusammengefasst.

*Tab. 3.10 Gehalt an Gesamtflavonoid, Hyperforin und Hypericin in den untersuchten Extrakten bestimmt mittels HPLC*

Extrakt	<i>Gehalt [% vom Trockengewicht] (<math>\pm</math> sdv; n=3)</i>		
	Gesamt-Flavonoide	Hyperforin	Hypericin **
M 9845	7,4 $\pm$ 0,1	3,9 *	0,19
I 9861	8,7 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1	0,30
F 9852	4,8 *	3,0 *	0,24
I 9731	7,5 *	1,3 *	0,24
F 9722	7,1 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,1	0,22
F 9831	7,3 *	3,1 *	0,19
I 0044	11,4 $\pm$ 0,5	3,3 *	0,30
F 0015	8,0 $\pm$ 0,2	2,8 *	0,23

\* sdv < 0,1; \*\* sdv < 0,01.

Die in der Literatur als Wirkprinzip des Johanniskrauts diskutierten Inhaltsstoffe Flavonoide, Hyperforin und Hypericin werden mit HPLC-Methoden quantitativ

bestimmt. Zur Analyse der Flavonoide wird ein Gradientensystem verwendet. Die Bestimmung von Hyperforin und Hypericin erfolgt isokratisch mit kurzer Retentionszeit. Alle untersuchten Extrakte zeigen qualitativ vergleichbare HPLC-Fingerprint-Chromatogramme, unterscheiden sich jedoch in der quantitativen Zusammensetzung.

### **3.5 Quantifizierung der Hauptbegleitstoffe**

#### **3.5.1 Bestimmung der Zucker**

Kohlenhydrate entstehen in der Pflanze durch Photosynthese. Sie haben wichtige Funktionen im Stoffwechsel der Pflanze und sind wesentliche Biosynthesebausteine für eine Vielzahl von Molekülen wie Lipiden, Proteinen und Polysacchariden. Die Gerüstmatrix von Pflanzen besteht zu großen Teilen aus den Polysacchariden Cellulose, Hemicellulose und Pektin, begleitet von kleineren Mengen an phenolischen Ligninpolymeren. Stärke und andere Kohlenhydrate dienen als Energielieferanten und Energiespeicher. Desweiteren haben Kohlenhydrate wichtige osmoregulatorische und osmoprotektive Funktionen (Cataldi et al. 2000). Lösliche Kohlenhydrate sind im Pflanzenreich ubiquitär und sind als Begleitstoffe auch in Pflanzenextrakten zu erwarten.

Polysaccharide sind in den Extrakten aufgrund der Herstellungsweise des Extraktes nicht enthalten, da diese in 80 % igem Methanol quantitativ ausgefällt werden. (Morrison 1996). In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Analytik von Kohlenhydraten beschrieben. Die Dünnschichtchromatographie ist eine einfache Methode, die auch zur Quantifizierung des Zuckergehaltes verwendet werden kann (Ghebregzabher et al. 1976, Grösz und Braunsteiner 1989). Kapillar-Gaschromatographie von Kohlenhydraten erfordert eine vorhergehende Derivatisierung (Methylierung, Acylierung, Trimethylsilylierung oder Butylboronat-Bildung), um die Zucker verdampfbar zu machen. Diese Methode hat den Nachteil, dass aus einem Zucker mehrere Peaks resultieren, da die anomeren Zucker verschiedene Derivate bilden können (Laker 1980). In neuerer Zeit wird auch die Kapillarelektrophorese zur Bestimmung von Zuckern verwendet (El Rassi 1996).

Die HPLC ist eine häufig angewandte Methode zur Analyse von Kohlenhydraten. Hierbei stellt die Detektion das Hauptproblem dar, da Zuckermoleküle keine chromophoren oder fluorophoren Gruppen enthalten und somit eine UV- oder Fluoreszenzdetektion nicht möglich ist. In der Literatur werden verschiedene Techniken zur Detektion von Zuckern genannt. Die Einführung chromophorer Gruppen in Zuckermoleküle durch Benzylierung (Oehlke et al. 1994) ermöglicht die UV-Detektion, erfordert jedoch einen Derivatisierungsschritt. Auch die Trennung von Zuckern mittels Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender gepulst-amprometrischer Detektion (Pulsed Amperometric Detection, PAD) ist eine häufig angewandte und empfindliche Methode, die allerdings eine spezielle HPLC-Ausrüstung erfordert (Cataldi et al. 2000, Martens und Frankenberger 1990). Die refraktometrische Detektion (Refractive Index Detection, RID) ist eine weitere häufig verwendete Detektionsmethode. RID ist wesentlich unempfindlicher als PAD, ist jedoch als DIN-Vorschrift zur Bestimmung des Gehalts von Sacchariden in Honig offiziell anerkannt (DIN 10758). Die refraktometrische Detektion erfordert jedoch isokratische Elution, sodass keine Gradienten eingesetzt werden können. Da RID eine unspezifische Detektionsmethode darstellt, wird die RID von Zuckern in komplexen Matrices durch koeluiierende Stoffe erschwert. Aus diesem Grund ist eine Probenaufreinigung erforderlich. Viele Autoren verwenden zur Probenaufbereitung die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE). Iuliano (1996) setzt C18, Kationen- und Anionenaustauscherkartuschen für die Probenaufbereitung von Orangensaft ein.

### ***Aufreinigung der Zucker***

Die Aufreinigung erfolgt nach dem in Abb. 3.13 gezeigten Schema. Eine lipophile SPE-Kartusche (Oasis, Fa. Waters), eine Anionenaustauscher-Kartusche (QMA, Fa. Waters) und zwei Kationenaustauscher-Kartuschen (SCX, Fa. Varian) sind für eine ausreichende Probenaufbereitung des Johanniskrautextrakts erforderlich. Die Oasis-Kartusche besteht aus Poly(divinylbenzol-Co-N-Vinylpyrrolidon) mit hydrophilen und lipophilen Eigenschaften und soll lipophile Bestandteile und weitere Inhaltsstoffe wie Flavonoide, Hypericin und Gerbstoffe abtrennen.

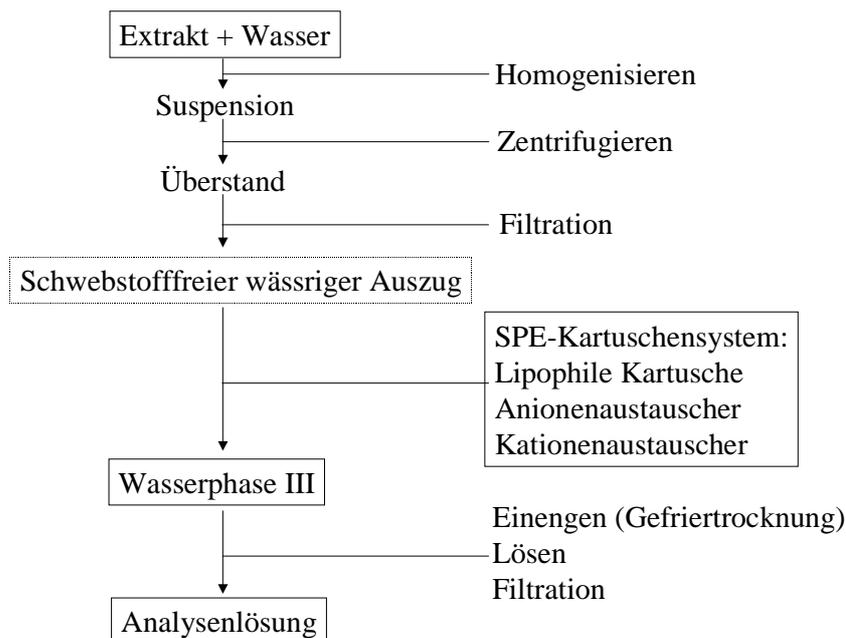


Abb. 3.13 Schema der Aufreinigung der Zucker.

Flavonoide werden abgetrennt, wie das Methanol-Eluat einer Oasis-Kartusche auf Bahn 5 des DC-Chromatogramms von Abb. 3.2 auf Seite 13 zeigt. Der Anionenaustauscher (Acrylamid-Copolymer auf Silicabasis) dient zur Abtrennung von Basen und der Kationenaustauscher (Sulfonsäure-modifizierte Silicabasis) zur Abtrennung von Pflanzensäuren.

### **HPLC-Bestimmung der Zucker**

Die Zucker werden mit einer isokratischen HPLC-Methode und refraktometrischer Detektion bestimmt. Die analytische Trennsäule ist mit einer Aminophase (Aminomodifiziertes Kieselgel) von sehr feiner Partikelgröße (3  $\mu\text{m}$ ) gepackt. Diese Phase ermöglicht die Trennung von Glucose und Fructose, welche mit einer Aminophase der Partikelgröße 5  $\mu\text{m}$  nicht möglich ist. Ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Zucker von Extrakt M 9845 ist in Abb. 3.14 dargestellt. Die Zucker-Fingerprints der Extrakte sind qualitativ gleich. Durch Vergleich mit Standardsubstanzen werden die Zucker anhand der Retentionszeit zugeordnet. Fructose wird nach  $R^t$  9,0 min eluiert, Glucose nach  $R^t$  10.5 min, Saccharose nach  $R^t$  15.0 min und Lactose nach  $R^t$  18.5 min. Lactose ist ein bei der Herstellung der Trockenextrakte zugesetzter Hilfsstoff.

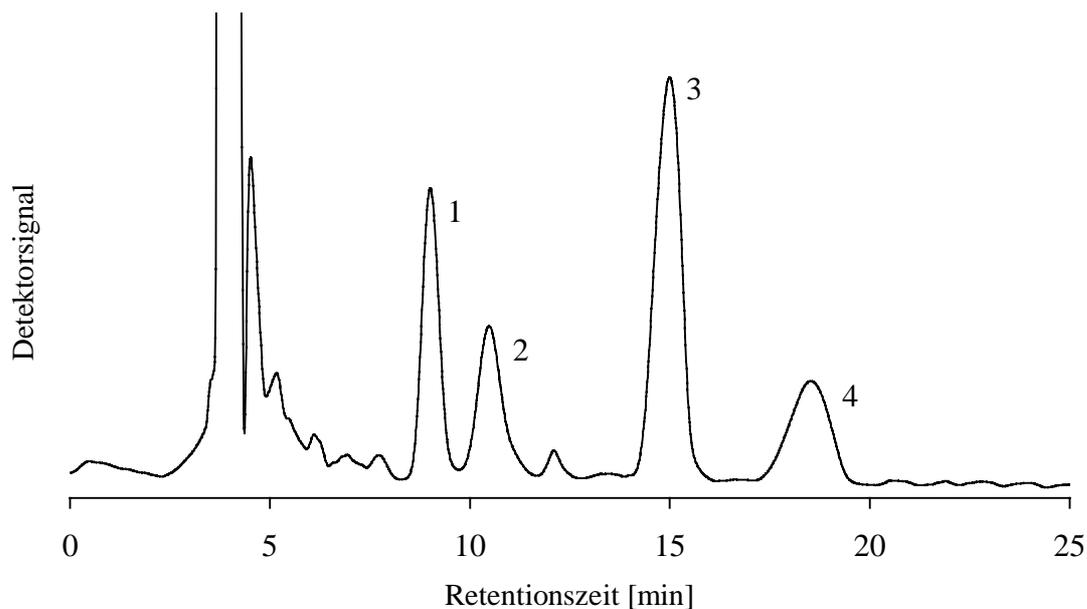


Abb. 3.14 HPLC-Chromatogramm der Zucker von Extrakt M 9845;  
Peaknachweis: 1 Fructose, 2 Glucose, 3 Saccharose, 4 Lactose.

Die Extrakte unterscheiden sich deutlich in der quantitativen Zusammensetzung der Zucker. Abb. 3.15 zeigt den Zuckergehalt der Extrakte. Fructosegehalte von 5,2 bis 9,8 % und Glucosegehalte von 3,2 bis 7,2 % werden gefunden. Der Gehalt an Saccharose (1,4-10,4 %) ist sehr unterschiedlich.

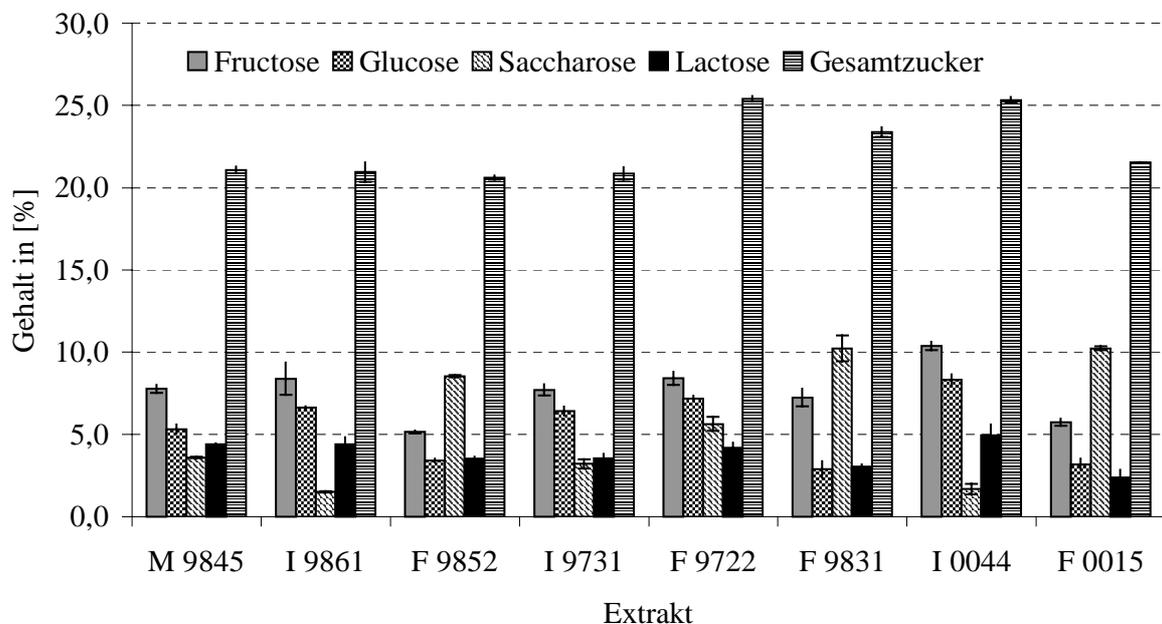


Abb. 3.15 Zuckergehalt der Extrakte bestimmt mittels HPLC.

Mono- und Disaccharide werden in der Pharma- und Lebensmittelindustrie als Kryoprotektiva und Kristallisationsverzögerer verwendet und haben möglicherweise einen

Einfluss auf Hygroskopizität und Verarbeitbarkeit der Extrakte. Besonders Schwankungen im Saccharosegehalt könnten von Bedeutung sein. Der Gesamtzuckergehalt der Extrakte beträgt 19,1 bis 25,4 % und ist somit für alle Extrakte ähnlich.

### *Kalibrierung und Validierung des HPLC-Analysenverfahrens zur Bestimmung der Zucker*

Die Parameter der Kalibrierung sind in Tab. 3.11 zusammengestellt. Exemplarisch sind die Kalibriergerade für Fructose und der zugehörige Residuenplot in Abb. 3.16 gezeigt. Ein Trend wird nicht beobachtet. Dies trifft in selbem Maße für Glucose, Saccharose und Lactose zu. Die Validierungsparameter der Zucker sind in Tab. 3.12 dargestellt. Die Systempräzision mit Standardsubstanz (0,64 % - 2,13 %) ist höher als die Systempräzision mit Extrakt (1,41 % - 3,04 %). Dies ist auf Störungen der Analytik durch nicht vollständig entfernte Begleitstoffe zurückzuführen. Die Wiederfindungsrate berücksichtigt alle bei der Probenaufbereitung entstehenden Verluste der Analyten, die vor allem auf die SPE-Reinigung der Probe zurückzuführen sind. Die Wiederfindungsrate der Zucker beträgt 81 % für Fructose bis 96,6 % für Saccharose und wird bei der Berechnung des Gehalts berücksichtigt.

*Tab. 3.11 Kalibrierparameter von Fructose, Glucose, Saccharose und Lactose*

<i>Parameter</i>	<i>Fructose</i>	<i>Glucose</i>
Meßbereich [mg/100 ml]	48,4 – 605,2	48,3 – 603,9
Anzahl der Kalibrierproben	36	36
Datenschwerpunkt	E[xc] = 311 mg/100 ml E[yc] = 664896 AUC	E[xc] = 310 mg/100 ml E[yc] = 705578 AUC
Korrelationskoeffizient (r)	0,9998	0,9997
Steigung/Empfindlichkeit (b1) [AUC / (mg/100 ml)]	2135,5	2294,2
Kalibrierfunktion (Fructose)	y(x) = 2135,5 [x-311] + 664896	
Kalibrierfunktion (Glucose)	y(x) = 2294,2 [x-310,1] + 705578,4	
<i>Parameter</i>	<i>Saccharose</i>	<i>Lactose</i>
Meßbereich [mg/100 ml]	48,7 – 609,3	48,8 – 607,1
Anzahl der Kalibrierproben	36	36
Datenschwerpunkt	E[xc] = 312,7 mg/100 ml E[yc] = 681981,8 AUC	E[xc] = 311,9 mg/100 ml E[yc] = 693243,1 AUC
Korrelationskoeffizient (r)	0,9997	0,9998
Steigung/Empfindlichkeit (b1) [AUC / (mg/100 ml)]	2193,1	2254,0
Kalibrierfunktion (Saccharose)	y(x) = 2193,1 [x-312,7] + 681981,8	
Kalibrierfunktion (Lactose)	y(x) = 2254,0 [x-311,9] + 693243,1	

*Tab. 3.12 Validierungsparameter der HPLC-Bestimmung von Fructose, Glucose, Saccharose und Lactose im Extrakt*

<i>Parameter</i>		<i>relsdv [%]</i>
<b>Fructose</b>		
Systempräzision (n=12)	Standard	0,64
	Extrakt	1,41
Methodenpräzision (n=6)		7,32
Erfassungsgrenze [mg/100 ml]		1,408
Bestimmungsgrenze [mg/100 ml]		4,577
Wiederfindung (n=3)		81,03
<b>Glucose</b>		
Systempräzision (n=12)	Standard	2,13
	Extrakt	2,71
Methodenpräzision (n=6)		4,05
Erfassungsgrenze [mg/100 ml]		1,640
Bestimmungsgrenze [mg/100 ml]		5,333
Wiederfindung (n=3)		88,83
<b>Saccharose</b>		
Systempräzision (n=12)	Standard	1,70
	Extrakt	3,04
Methodenpräzision (n=6)		3,73
Erfassungsgrenze [mg/100 ml]		1,557
Bestimmungsgrenze [mg/100 ml]		5,061
Wiederfindung (n=3)		96,59
<b>Lactose</b>		
Systempräzision (n=12)	Standard	0,94
	Extrakt	2,59
Methodenpräzision (n=6)		4,50
Erfassungsgrenze [mg/100 ml]		1,365
Bestimmungsgrenze [mg/100 ml]		4,437
Wiederfindung (n=3)		92,59

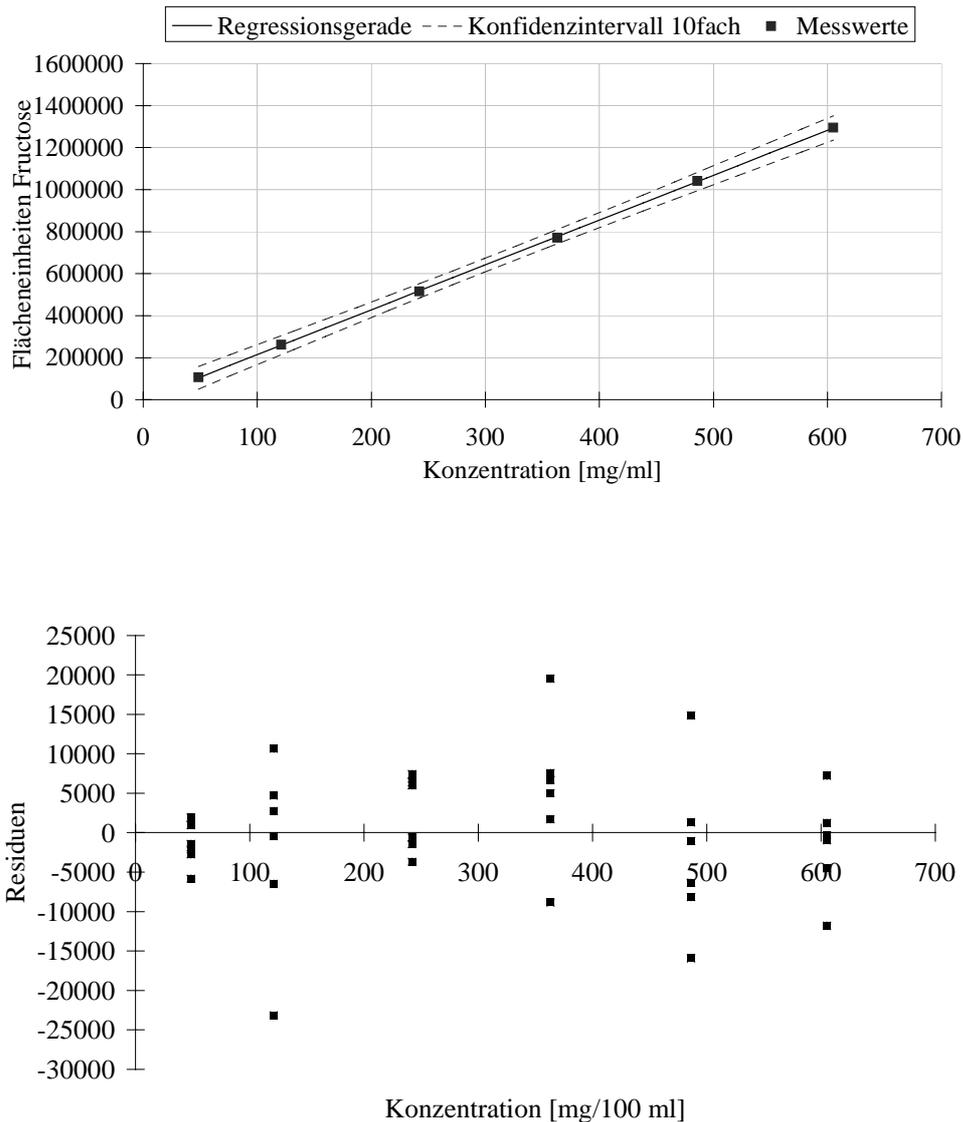


Abb. 3.16 Kalibriergerade für Fructose und zugehöriger Residuenplot.

### 3.5.2 Bestimmung der Gerbstoffe

*Hypericum perforatum* L. ist reich an Gerbstoffen des Catechin-Typs. Diese Gerbstoffe bestehen aus den kondensierten Flavan-3-olen (+)-Catechin und (-)-Epicatechin des Molekulargewichts 500 bis 5000. Die Monomere wirken nicht adstringierend. Hölzl et al. (1994) berichten von Di- und Oligomeren von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (Proanthocyanidinen) in Johanniskraut. Die Leitstrukturen der Gerbstoffe des Johanniskrauts sind in Abb. 3.17 dargestellt.

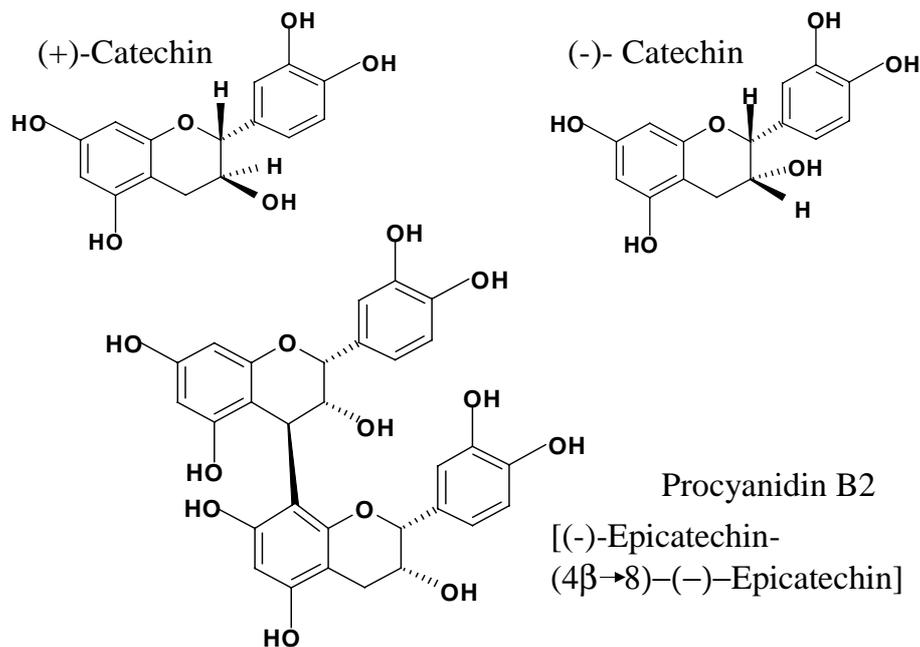


Abb. 3.17 Leitstrukturen von Gerbstoffen in *Hypericum perforatum L.*

Da die verschiedenen Methoden zur Analyse von Gerbstoffen unterschiedliche Ergebnisse liefern, können Literaturangaben über den Gerbstoffgehalt in Johanniskraut stark voneinander abweichen (Lang und Wilhelm 1996). In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Bestimmung des Gerbstoffgehalts nach Ph. Eur. Nachtrag 2000. Diese Methode kombiniert die lange bekannte Hautpulvermethode (Bindung der Gerbstoffe an getrocknete, geraspelte Haut) nach DAC mit der photometrischen Bestimmung der Polyphenole (Reduktion von Molybdät-Wolframat-Reagenz (Folins Reagenz) zu sogenanntem Wolframblau bzw. Molybdänblau). Als Referenzsubstanz wird Pyrogallol verwendet, weil Gerbstoffe stets heterogene Gemische sind. Es handelt sich um eine Konventionsmethode, die zwar keine absolut richtigen, wohl aber gut reproduzierbare Werte liefert (Kommentar zum DAB 1998). Der in Abb. 3.18 dargestellte Gerbstoffgehalt der Extrakte beträgt 6,2-9,0 %. Dies ist innerhalb des Gehaltsbereichs, der in der Literatur für die Johanniskraut-Droge berichtet wird.

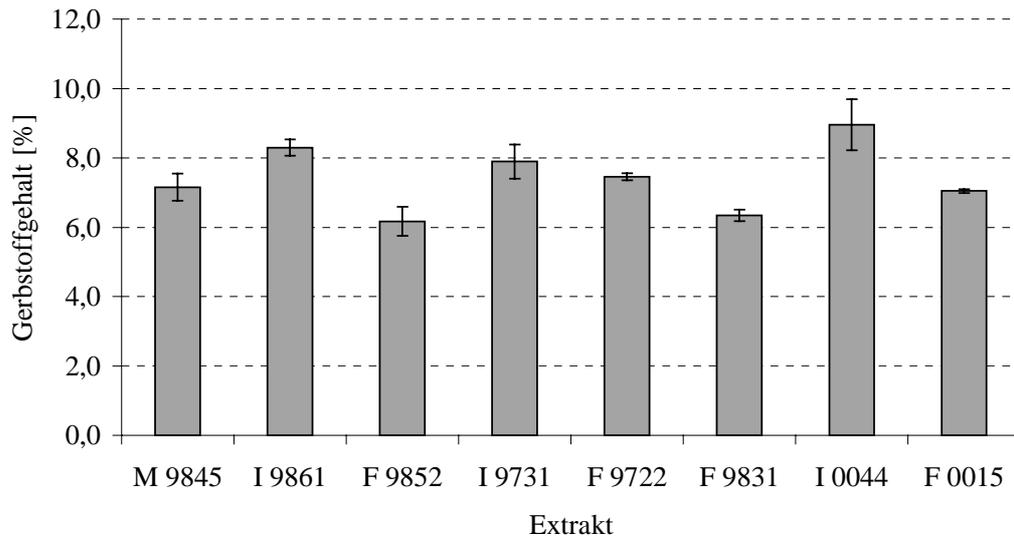


Abb.3.18 Gerbstoffgehalt der Extrakte bestimmt mit der Methode nach Ph. Eur.

### 3.5.3 Bestimmung von Asche, Gesamtprotein und organischen Säuren

#### *Aschegehalt*

Die Bestimmung des Aschegehaltes dient zur Bestimmung des Mineralstoffgehalts der Extrakte. Der Aschegehalt kann generell als Maß der Qualität eines Extraktes gesehen werden. Der Ph. Eur. bestimmte Aschegehalt der Extrakte beträgt 4,9-8,4 % (Abb 3.19). Hierbei sind auch 2 % kolloidales Siliciumdioxid erfasst, die bei der Extrakterstellung zugesetzt werden.

#### *Gesamtprotein*

Der Gesamtproteingehalt ist ein Maß für den Gehalt an stickstoffhaltigen Verbindungen wie freie Aminosäuren, Protein und sonstige stickstoffhaltige Verbindungen. Der mittels Elementaranalyse bestimmte Stickstoffgehalt von 0,76-1,36 % wird mit Hilfe eines Faktors (6,25; AOAC 1995) in den Gesamtproteingehalt von 3,9-8,4 % umgerechnet (Abb. 3.19). Die in der Literatur für Johanniskraut beschriebenen geringen Mengen an stickstoffhaltigen Verbindungen (siehe Punkt 2.2) können den ermittelten hohen Gesamtproteingehalt von bis zu 8,4 % nicht erklären. Weitergehende Untersuchungen diesbezüglich sind erforderlich.

### Organische Säuren

Die Bestimmung der organischen Säuren erfolgt nach einer von Schiller et al. (Publikation in Vorbereitung) beschriebenen HPLC-Methode unter Verwendung der Lichtstreu-Detektion. Es werden Citronensäure und Äpfelsäure anhand der Retentionszeiten identifiziert. Diese Befunde werden durch qualitative HPLC-NMR-Untersuchungen an Extrakt I 9861 bestätigt (Tseng 2000). In der Literatur sind Citronensäure und Äpfelsäure als Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L. bisher nicht beschrieben. Der Citronensäuregehalt beträgt 0,9-2,3 % und Äpfelsäuregehalt 2,3-3,1 % (Abb. 3.19). Die mittels Dünnschichtchromatographie in den Extrakten identifizierten organischen Säuren Chlorogensäure und Kaffeesäure (Punkt 3.2) werden mit der verwendeten HPLC-Methode nicht erfasst.

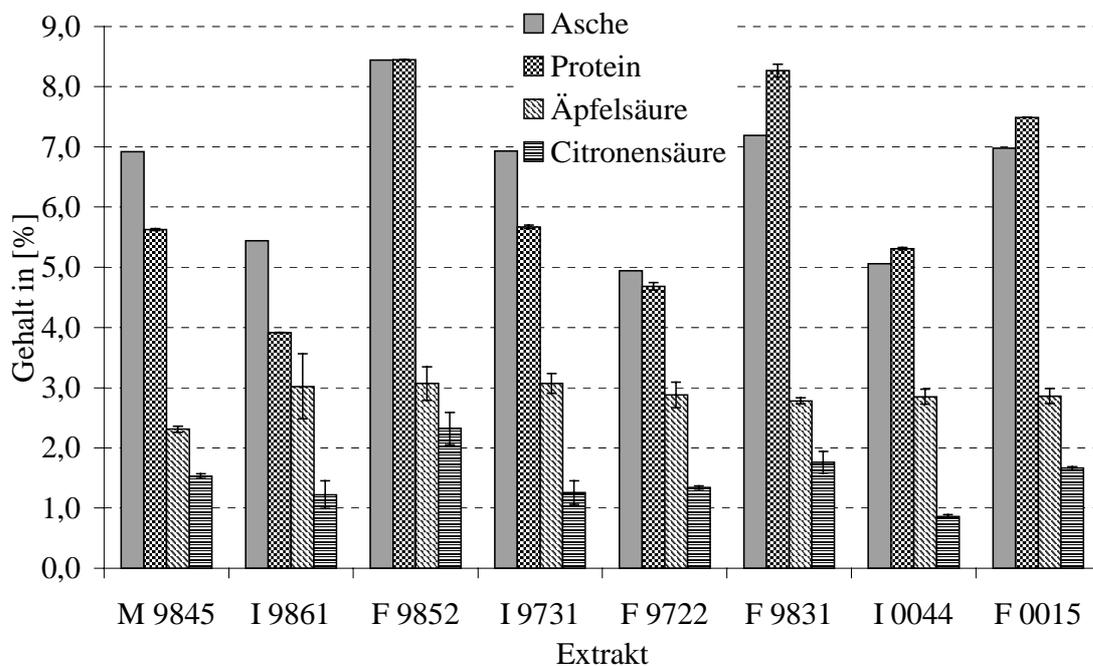


Abb. 3.19 Gehalt der Extrakte an Asche, Gesamtprotein, Äpfel- und Citronensäure.

#### 3.5.4 Bestimmung der lipophilen Inhaltsstoffe

Neben dem lipophilen Hyperforin werden in Johanniskraut als lipophile Inhaltsstoffe Fette, Wachse, Chlorophyll und Terpene beschrieben, die auch im Trockenextrakt enthalten sein können. Lipophile Begleitstoffe beeinflussen die Verarbeitbarkeit von Trockenextrakten (Rocksloh 1999a). Der Gehalt an lipophilen Inhaltsstoffen wird

mittels n-Hexan-Extraktion bestimmt wie unter Punkt 3.3 beschrieben und beträgt 10,0 bis 14,4 %.

### 3.5.5 Zusammenfassung der Untersuchung der Hauptbegleitstoffe

Die quantifizierten Hauptbegleitstoffe der Extrakte sind in Tab. 3.13 dargestellt. Es werden in allen Extrakten dieselben Begleitstoffe gefunden. Die Unterschiede im Gehalt an Gesamtzucker, Gerbstoffen, Asche und Äpfelsäure sind gering. Die Extraktchargen unterscheiden sich jedoch deutlich in der quantitativen Zusammensetzung der Zucker, wobei Saccharose mit 1,4 bis 10,4 % die größten Unterschiede aufweist. Mono- und Disaccharide haben möglicherweise einen Einfluss auf Hygroskopizität und Verarbeitbarkeit der Extrakte, insbesondere die Schwankungen im Saccharosegehalt könnten von Bedeutung sein. Auch der Gehalt an Gesamtprotein und Citronensäure zeigt deutliche Unterschiede. Lipophile Stoffe sind in den Extrakten zu 10,0 bis 14,4 % enthalten.

Tab. 3.13 Hauptbegleitstoffe der untersuchten Trockenextrakte von *Hypericum perforatum*

Extrakt	Gehalt [% vom Trockengewicht] ( $\pm$ sdv; n=3)						
	Gesamtzucker	Gerbstoffe	Asche	Gesamtprotein	Äpfelsäure	Citronensäure	lipophile Stoffe <sup>1)</sup>
M 9845	21,1 $\pm$ 0,6	7,2 $\pm$ 0,3	6,9	5,6 *	2,3 *	1,5 *	9,8 / 10,1
I 9861	21,0 $\pm$ 1,5	8,3 $\pm$ 0,2	5,4	3,9 *	3,0 *	1,2 $\pm$ 0,2	9,4 / 11,3
F 9852	20,6 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,6	8,4	8,4 *	3,1 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,2	10,7 / 15,0
I 9731	20,9 $\pm$ 1,0	7,9 $\pm$ 0,4	6,9	5,7 *	3,1 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	10,0 / 10,5
F 9722	25,4 $\pm$ 0,4	7,5 $\pm$ 0,1	4,9	4,7 *	2,9 $\pm$ 0,2	1,3 *	12,2 / 11,7
F 9831	23,4 $\pm$ 0,8	6,3 $\pm$ 0,1	7,2	8,3 $\pm$ 0,1	2,8 *	1,8 $\pm$ 0,1	12,4 / 15,4
I 0044	23,9 $\pm$ 0,7	9,0 $\pm$ 0,7	5,1	5,3 *	2,9 $\pm$ 0,1	0,9 *	12,3 / 13,6
F 0015	19,1 $\pm$ 0,4	7,0 $\pm$ 0,1	7,0	7,5 *	2,9 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	14,8 / 13,9

\* sdv < 0,1; \*\* sdv < 0,01; <sup>1)</sup> siehe n-Hexan-Phase Tab. 3.2

# KAPITEL 4

## PHYSIKALISCHE, PHYSIKALISCH-CHEMISCHE UND TABLETTIERTECHNISCHE CHARAKTERISIERUNG DER EXTRAKTE

Trockenextrakte können sich je nach der Herkunft der Droge und den Herstellungsbedingungen in physikalischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheiden, welche die Verarbeitbarkeit beeinflussen. Die Extrakte (im Folgenden als Extraktpulver bezeichnet) werden hinsichtlich ihrer für eine nachfolgende Tablettierung wesentlichen physikalischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften untersucht. Des Weiteren wird die Direkttablettierbarkeit der Extraktpulver beschrieben.

### 4.1 Physikalische und physikalisch-chemische Charakterisierung der Extrakte

#### *Wassergehalt nach Karl-Fischer*

Der nach Karl-Fischer bestimmte Wassergehalt der Extraktpulver beträgt 1,73-3,15 % (Tab. 4.1). Die unterschiedlichen Wassergehalte der Extraktpulver könnten von Bedeutung sein, da unterschiedliche Feuchten der Pressmischung ein unterschiedliches Verhalten bei der Tablettierung bedingen können.

*Tab. 4.1 Wassergehalt der Extraktpulver*

<i>Extraktchargen</i>	<i>Wassergehalt nach Karl-Fischer [%± sdv]; n=3</i>	
M 9845	2,09	± 0,04
I 9861	2,15	± 0,09
F 9852	2,35	± 0,04
I 9731	1,78	± 0,05
F 9722	2,50	± 0,06
F 9831	1,73	± 0,10
I 0044	3,15	± 0,09
F 0015	2,35	± 0,03

### *Kurzzeitwasseraufnahme*

Neben dem Ausgangswassergehalt des Extraktpulvers ist für die folgenden Verarbeitungsschritte das Wasser-Sorptionsverhalten von Bedeutung. Die Hygroskopizität ist eine wichtige Eigenschaft, welche von der Zusammensetzung der Begleitstoffe abhängig ist (Eder und Mehnert 1998). Die Messung der initialen Wasseraufnahme wird mit einem modifizierten Tensiometer bei verschiedenen relativen Feuchten (r. F.) durchgeführt (Braun 1995). Die Kurzzeitwasseraufnahme des Extraktpulvers F 0015 bei verschiedenen Feuchten ist beispielhaft in Abb. 4.1 dargestellt.

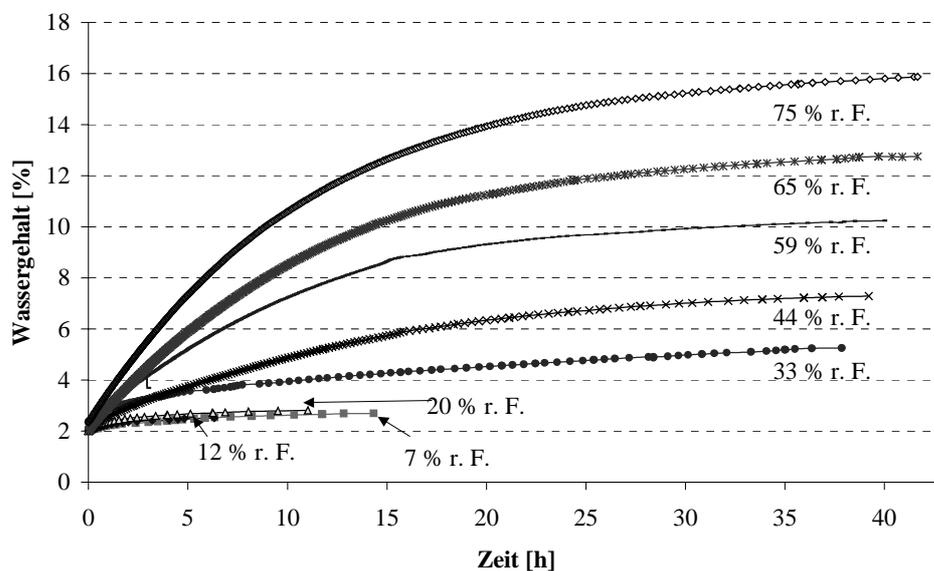


Abb. 4.1 Kurzzeitwasseraufnahme des Extraktpulvers F 0015 bei verschiedenen Feuchten.

Die Kurven, die den Wassergehalt der Proben zum Messzeitpunkt wiedergeben, steigen zunächst unterschiedlich steil an und flachen danach bis zur Sättigungsgrenze ab. Diese Sättigung geht bei höheren relativen Feuchten mit Verkleben und Zerfließen der Extraktpulver einher. Der Kurvenverlauf ist klar von der eingestellten relativen Luftfeuchte (r. F.) abhängig. Während bei einer r. F. bis 20 % sehr wenig Wasser sorbiert wird, steigt die Wasseraufnahme bei Feuchten über 33 % deutlich an. Dies ist für alle Extraktchargen gleichermaßen gegeben, wie der Vergleich der Sorptionsisothermen in Abb. 4.2 zeigt. Ein signifikanter Unterschied im Sorptionsverhalten der Extraktchargen ist nicht festzustellen, jedoch kommt die starke Hygroskopizität aller Extraktchargen klar zum Ausdruck. Die Extraktpulver nehmen bei 59 % r. F.

(Optimale Raumfeuchte bei der Tablettierung: 55-60 % r. F.) etwa 10 % Wasser auf. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, den Zutritt von Raumfeuchte während der Lagerung und Verarbeitung von Johanniskrauttrockenextrakt zu minimieren.

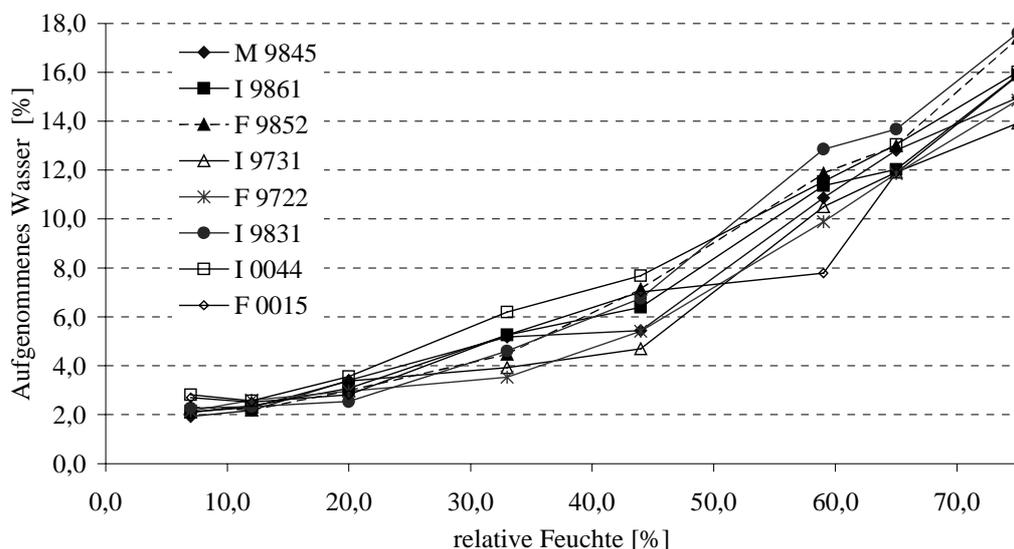


Abb. 4.2 Vergleichende Darstellung der Sorptionsisothermen der Extraktpulver.

### Partikelgrößenanalyse

Die Partikelgrößenanalyse wird mit einem Laserbeugungsspektrometer durchgeführt. Die Partikelgrößenverteilungen der Extraktpulver sind in Abb. 4.3 dargestellt. Da sich die Verteilungen sehr ähneln, sind die charakteristischen Partikelgrößen ( $d_{10}$ ,  $d_{50}$ ,  $d_{90}$ ) der Extraktchargen in Tab. 4.2 zusammengefasst.

Tab. 4.2 Charakteristische Partikelgrößen der Extraktchargen bestimmt mittels Laserbeugung

	Extraktcharge							
	M 9845	I 9861	F 9852	I 9731	F 9722	F 9831	I 0044	F 0015
$d_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	14	12	18	7	13	16	14	8
$d_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	60	54	79	39	51	78	60	34
$d_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )	149	154	234	174	167	266	182	107

Die mittlere Teilchengröße  $d_{50}$  der Extraktpulver beträgt 34 bis 79  $\mu\text{m}$ . Das Extraktpulver F 9831 ist mit  $d_{90} = 266$  das größte Extraktpulver. Es neigt allerdings sehr stark zu Agglomeratbildung, was die große gemessene Partikelgröße erklären könnte. Alle anderen Extraktpulver sind sehr feinkörnig. F 0015 ist das feinste Produkt ( $d_{10} = 8 \mu\text{m}$  und  $d_{90} = 107 \mu\text{m}$ ) und weist die engste Partikelgrößenverteilung auf.

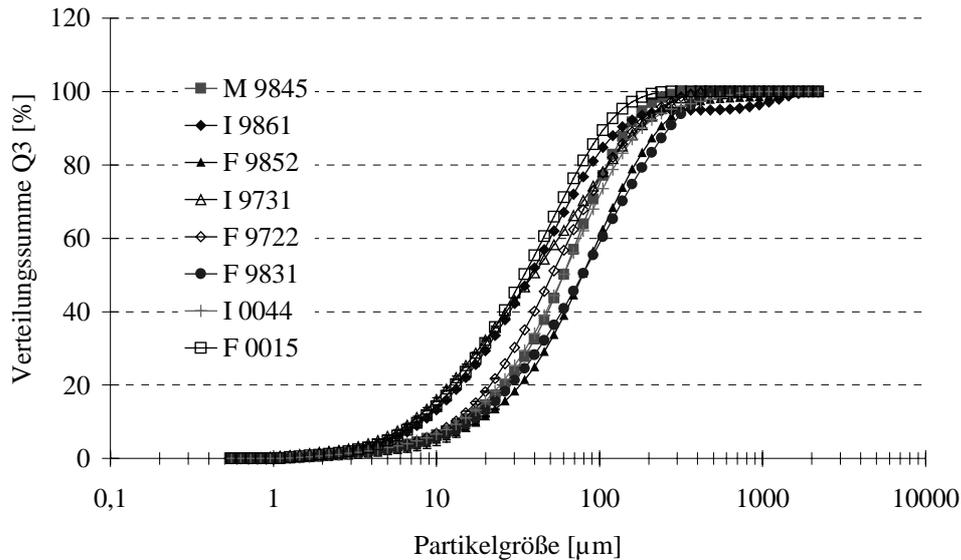


Abb. 4.3 Partikelgrößenverteilungen der untersuchten Extraktpulver.

#### **Bestimmung des Böschungswinkels und des Hausnerfaktors**

Der Böschungswinkel ist ein Maß für die Fließfähigkeit einer Pulverschüttung. Die mit der Sieb-Kegel-Methode bestimmten Böschungswinkel von etwa  $45^\circ$  weisen darauf hin, dass bei Pressmischungen mit hohem Extraktgehalt Probleme bezüglich des Fließverhaltens zu erwarten sind. Die schlechte Fließfähigkeit der Extraktpulver ist auf die geringe Partikelgröße zurückzuführen. Dies trifft in besonderem Maß für Extraktpulver F 0015 zu, das den größten Böschungswinkel und die kleinste Partikelgröße aufweist. Feine Pulver sind wesentlich kohäsiver als grobkörnige und fließen daher schlechter (Lantz und Schwartz 1990).

Der Hausnerfaktor errechnet sich als Quotient aus Stampf- und Schüttdichte und ist ein Maß für die Kompressibilität einer Pulverschüttung. Der Hausnerfaktor sollte nicht größer als 1 sein (List 1985). Die für die Extraktpulver ermittelten Hausnerfaktoren von etwa 1,2 deuten wiederum auf das schlechte Fließverhalten der Extraktpulver hin.

## **4.2 Direkttablettierung von Extraktpulver**

Die Ergebnisse der pulvertechnologischen Untersuchungen weisen bereits daraufhin, dass Schwierigkeiten bei der Herstellung von Tabletten mit hohem Extraktpulveranteil zu erwarten sind. Um die Direkttablettierbarkeit der Extraktpulver zu untersuchen, werden mit allen Extraktchargen Pressmischungen entsprechend der Rezeptur Nr. 1 in

Anhang 10 hergestellt. Rezeptur Nr. 1 enthält Cellactose und Tablettierhilfsmittel K als Füllstoff sowie Magnesiumstearat als Schmiermittel. Cellactose wird nach einem speziellen Verfahren aus 25 % Cellulosepulver und 75 %  $\alpha$ -Lactose-Monohydrat gewonnen und stellt einen Hilfsstoff dar, der neben der Plastizität und Kapillarwirkung der Cellulose durch den  $\alpha$ -Lactose-Anteil einen positiven Einfluss auf die Fließfähigkeit ausübt (York 1992). Tablettierhilfsmittel K ist eine mikrofeine Cellulose mit guter Fließfähigkeit. Diese Pressmischungen werden auf einer Rundlauftablettenpresse bei verschiedenen Presskräften zu Tabletten des Kerngewichtes 520 mg verpresst. Das Direkttablettierverhalten der Extraktpulver ist in Tab. 4.3 zusammengefasst. Tab. 4.3 enthält außerdem Informationen zur Direkttablettierbarkeit, die von der Fa. Lichtwer zur Verfügung gestellt werden.

*Tab. 4.3 Beurteilung der Extraktschargen nach ihrem Direkttablettierverhalten*

<i>Extraktchargen</i>	<i>Direkttablettierverhalten ermittelt in eigenen Versuchen</i>	<i>Direkttablettierverhalten gemäß Informationen der Fa. Lichtwer</i>
M 9845	+	+
I 9861	+ (klebt leicht an Stempeln)	+
F 9852	- (klebt stark)	+
I 9731	- (schlechtes Fließverhalten)	-
F 9722	Indifferent	-
F 9831	- (klebt stark)	-
I 0044	+	+
F 0015	- (schlechtes Fließverhalten)	-

+ = gut tablettierbar; - = schlecht tablettierbar

Die Extraktpulver M 9845, I 9861 und I 0044 zeigen eine gute Direkttablettierbarkeit, welche sich in gleichmäßiger Matrizenbefüllung und geringer Klebeneigung an den Stempeln äußert. Diese Beobachtungen stimmen mit Informationen der Fa. Lichtwer überein. Die Extraktpulver F 9852 und F 9831 lassen sich bedingt durch Kleben an den Stempeln nur schwer tablettieren. Dies wird nur für Extrakt F 9831 von Fa. Lichtwer bestätigt. Ein sehr schlechtes Direkttablettierverhalten bedingt durch ungenügende Matrizenfüllung wird für Extraktpulver I 9731 und F 0015 gefunden. Diese Beobachtungen stimmen überein mit Informationen der Fa. Lichtwer. Das sehr schlechte Fließverhalten der Tablettiermischungen mit Extraktpulver I 9731 und F 0015 ist mit der besonders kleinen Partikelgröße dieser Extraktpulver zu erklären (Punkt 4.1).

Abb. 4.4 zeigt die Presskraft-Bruchfestigkeits-Profile der extraktpulverhaltigen Tabletten gemäß Rezeptur 1. Die Bruchfestigkeit der Tabletten beträgt bei einer Presskraft von 8 kN für alle Extraktchargen 60-80 N mit Ausnahme der extraktpulverhaltigen Tabletten F 9722 (Bruchfestigkeit 105 N). Eine Bruchfestigkeit zwischen 60 N und 80 N wird angestrebt. Bei Presskräften über 10 kN sinkt die Bruchfestigkeit bei einigen Extrakten wieder ab, was auf Deckeln der Tabletten hinweist. Dies wird durch Beobachtungen während der Bruchfestigkeitstestung bestätigt.

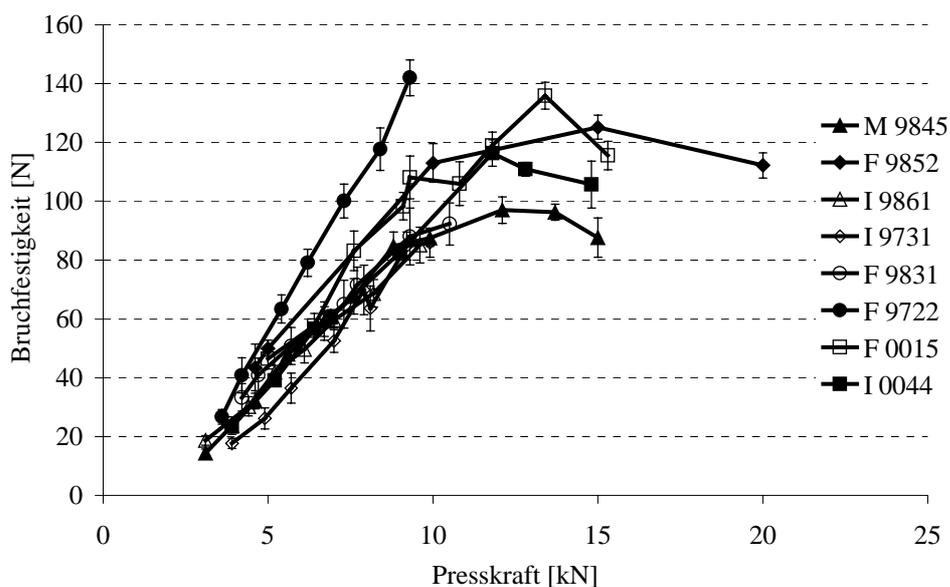


Abb. 4.4 Presskraft-Bruchfestigkeits-Profile der extraktpulverhaltigen Tabletten gemäß Rezeptur Nr. 1.

Die Presskraft-Zerfallszeit-Profile der extraktpulverhaltigen Tabletten entsprechend Rezeptur 1 sind in Abb. 4.5 dargestellt. Die Zerfallszeit ist für Tabletten des Extraktpulvers M 9845 am niedrigsten. Bei einer Presskraft von 8 kN zerfallen diese in etwa 30 min. Die Tabletten der anderen Extraktpulver weisen Zerfallszeiten von 45 min bis 50 min auf. Die Zerfallszeiten von Tabletten mit ausreichender Bruchfestigkeit sind somit sehr hoch.

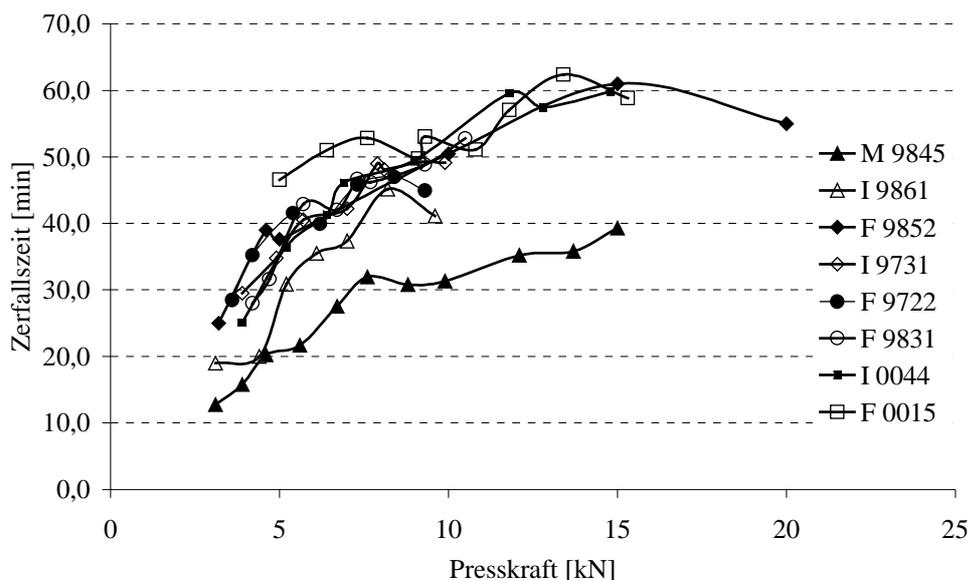


Abb. 4.5 Presskraft-Zerfallszeit-Profil der extraktpulverhaltigen Tabletten gemäß Rezeptur Nr. 1.

### 4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Versuche zur Kurzzeitwasseraufnahme zeigen, dass alle Extraktpulver stark hygroskopisch sind. Die Sorptionsisothermen der Extraktpulver unterscheiden sich nicht signifikant. Die Extraktpulver weisen geringe Partikelgrößen auf ( $d_{50} = 34\text{-}79 \mu\text{m}$ ), wobei die Extraktpulver I 9731 und F 0015 am feinsten sind ( $d_{50}$  (I 9731)=  $39 \mu\text{m}$ ;  $d_{50}$  (F 0015)=  $34 \mu\text{m}$ ). Alle Extraktpulver sind sehr schlecht fließfähig, mit Böschungswinkeln von  $45^\circ$  und Hausnerfaktoren von 1,2. Dies trifft in besonderem Maße für Extraktpulver F 0015 zu.

Versuche zur Direkttablettierbarkeit der Extraktpulver zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Extraktchargen auf. Extraktpulver M 9845 und I 0044 sind gut direkttablettierbar. Die schlechte Fließfähigkeit der Tablettiermischungen und Klebetendenz an den Stempeln erschweren die Tablettierung der meisten Extraktchargen erheblich. Die extraktpulverhaltigen Tabletten zeigen deutliche Deckelerscheinungen. Die Zerfallszeit der Tabletten ändert sich in Abhängigkeit von der verwendeten Extraktcharge. Die Tabletten weisen bei ausreichenden Bruchfestigkeiten über 60 N lange Zerfallszeiten bis zu 50 min auf.

# **KAPITEL 5**

## **KOMPAKTIERUNG DER EXTRAKTE MIT EINEM SPALT- UND KRAFTKONTROLLIERTEN LABORKOMPAKTOR UND TABLETTIERUNG DER KOMPAKTATE**

### **5.1 Einleitung**

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Direkttablettierung von Johanniskrautextrakten aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften und ihrer Hygroskopizität nicht möglich ist. Um unterschiedliche Extraktchargen zu tablettieren, ist eine Granulation erforderlich.

Zur Granulierung von Trockenextrakten werden verschiedene Methoden in der Literatur diskutiert: Feuchtgranulation mit organischen Lösungsmitteln (Diaz 1996), Direkttablettierung nach Sprühtrocknung der Extrakte (Plazier-Vercamen and Bruwier 1996) und Direkttablettierung nach Beladung von kolloidalem Kieselgel mit Extrakten (Palma et al. 1999). Da sich die wässrige Granulation aufgrund der hohen Hygroskopizität der Extrakte verbietet, wird eine Feuchtgranulierung mit organischen Lösungsmitteln häufig angewandt. Die Granulation mit organischen Lösungsmitteln birgt allerdings verfahrenstechnische Probleme und toxikologische Risiken. Eine alternative Methode des Korngrößenaufbaus stellt die Trockengranulierung dar. In der Literatur sind nur wenige Anwendungen der Trockengranulierung von Extrakten beschrieben (Keymer 1969, Rocksloh 1999a,b). Bei dieser „Pressagglomeration“ werden die Bindungen zwischen den Partikeln durch Anwendung hoher äußerer Kräfte erzeugt. Durch diese Kräfte werden die Teilchen so weit angenähert, dass hohe van-der-Waals-Kräfte wirksam werden und ein Agglomerat entsteht (Bakele 1992). Weiterhin können durch Sintervorgänge und formschlüssige Bindung Feststoffbrücken erzeugt werden (Kristensen und Schaefer 1993). Neben der Trockengranulierung durch „Brikkettieren“ des Pulvers auf einer Tablettenmaschine und anschließendem Zerkleinern der Brikketts stellt die Walzenkompaktierung eine elegante Methode der Trockengranulation dar.

Die Walzenkompaktierung ist ein kontinuierliches Verfahren. Dabei wird das zu verarbeitende Material zwischen zwei gegenläufigen Walzen verdichtet. Entsprechend der Walzenform können Briketts oder Schülpen hergestellt werden, die durch Brechen und Sieben zu einem Granulat (im weiteren als Kompaktat bezeichnet) abgebaut werden. Kompaktate weisen eine verbesserte Fließfähigkeit, höhere Schüttdichte, weniger Staubanteil und eine modifizierte Freisetzungsrate auf (Cohn et al. 1966, Inghelbrecht und Remon 1998). Mit diesem Verfahren können hitze- und feuchteempfindliche Güter verarbeitet werden. Es eignet sich daher gut zur Granulierung pflanzlicher Trockenextrakte.

Auf dem Markt befindliche Walzenkompaktoren unterscheiden sich in der Walzenform und der Positionierung der Walzen, der Produktzuführung und der Prozesskontrolle. Bei Walzenkompaktoren mit zwei fixierten Walzen wird der Spalt zwischen den Walzen vor Prozessbeginn eingestellt und bleibt während des Kompaktierprozesses unverändert. Die Produktzufuhr wird über eine Dosierschnecke gesteuert, um eine gleichbleibende Verdichtung des Materials zwischen den Walzen zu erreichen (Fa. Hosokawa Bepex; Fa. Alexanderwerk). Eine andere Kompaktorenbauweise verwendet eine fixierte und eine beweglich gelagerte Walze (Fa. Gerteis). Hierbei wird eine konstante Kompaktierkraft durch Steuerung der Spaltbreite und der Produktzufuhr erzielt. Die Walzen können in horizontaler Position (beispielsweise: Fa. Hosokawa Bepex, Fa. Fitzpatrick, Fa. Freund), in vertikaler Position (beispielsweise: Fa. Alexanderwerk) oder dazwischenliegenden Position zueinander angeordnet sein. Die Kompaktoren der Fa. Gerteis verfügen über in einem Winkel von  $30^\circ$  gegen die Horizontale angeordnete Walzen. Diese Bauweise hat einen positiven Einfluss auf die Produktzufuhr (Shlieout et al. 2000). Der Gestaltung der Produktzuführung kommt entscheidende Bedeutung zu (Johanson 1996). Eine ungleichmäßige Produktzufuhr hat eine schlechte Qualität des Kompaktats und eine starke Erhöhung des Feinanteils durch unkompaktiertes Produkt und Abrieb zur Folge (Miller 1997). Die Produktzuführung besteht aus einer (Fa. Freund, Fa. Hosokawa Bepex) oder zwei (Fa. Gerteis) Förderschnecken (Shlieout et al. 2000). Durch die Verwendung von Förderschnecken wird das Material unter Druck in den Einzugsbereich der Walzen gefördert. Bei der Verwendung von zwei Förderschnecken dient

eine horizontale Schnecke („Dosierschnecke“) zur Förderung, während eine vertikale Schnecke („Stopfschnecke“) das Material vorverdichtet und entlüftet (Miller 1994). Die Verwendung von zwei Förderschnecken ist eher geeignet, eine gleichmäßige Produktzufuhr zu gewährleisten (Shlieout et al. 2000). Eine angemessene Prozesskontrolle erfordert zumindest die Erfassung der Kompaktierkraft, der Spaltbreite und der Walzendrehgeschwindigkeit. Kompaktoren der Fa. Gerteis erfassen darüber hinaus u. a. auch Drehzahl und Drehmoment aller weiteren Motoren und ermöglichen eine umfassende Kontrolle und Steuerung des Kompaktierprozesses.

Eine Verbesserung der Verarbeitbarkeit von Johanniskrauttrockenextrakt durch Walzenkompaktierung wird erstmals von Rocksloh (1999a) beschrieben. Im Folgenden werden die pulvertechnologischen Eigenschaften der acht Trockenextraktchargen von *Hypericum perforatum* L. (im Weiteren als Extraktpulver bezeichnet) mit den Eigenschaften der bei verschiedenen Kompaktierkräften kompaktierten Extraktpulver (im Weiteren als Kompaktat bezeichnet) verglichen. Die Kompaktierung erfolgt mit einem kraft- und spaltkontrollierten Laborkompaktor (Fa. Gerteis), der eine optimale Prozesskontrolle gewährleistet. Es werden der Einfluss verschiedener Mengen an Magnesiumstearat auf den Kompaktierprozess und die Auswirkungen auf die Tablettenqualität untersucht. Des Weiteren wird die Qualität extraktpulver- und kompaktathaltiger Tabletten miteinander verglichen.

## 5.2 Kompaktierung der Extraktpulver

Die Kompaktierung der Extraktpulver erfolgt mit dem GMP Mini-Pactor (Fa. Gerteis). Dieser Laborkompaktor ist in Kapitel 7 (Punkt 7.6) ausführlich beschrieben. Die Extraktpulver werden mit 0,5 %, 2,0 % und 5,0 % Magnesiumstearat gemischt und bei Kompaktierkräften zwischen 4 und 20 kN/cm kompaktiert. Die Zerkleinerung der Schülpe erfolgt in einem Siebgranulator. Ein Zusatz von mindestens 0,5 % Magnesiumstearat ist erforderlich, um Kleben des Extrakts an den Walzen zu verringern. Magnesiumstearatzusätze von mindestens 2 % verhindern effizient ein Kleben von Extrakt an den Walzen. Für die Walzenkompaktierung von Johanniskrauttrockenextrakt ist folglich ein relativ großer Magnesiumstearatzusatz erforderlich. Die Walzenkompaktierung von definierten chemischen Stoffen dagegen erfordert

wesentlich geringere Schmiermittelzusätze. Nach Parrot (1981) ist die Walzenkompaktierung von Substanzen ohne Zusatz von Schmiermittel möglich. Arnaud et al. (1998) verwenden 0,3 % Magnesiumstearat für die Walzenkompaktierung von Nitrofurantoin. Wie die Ergebnisse zeigen, ist dies nicht auf die Walzenkompaktierung von pflanzlichen Trockenextrakten übertragbar.

### 5.3 Pulvertechnologische Untersuchungen an Kompaktaten

Die Kompaktate werden pulvertechnologisch untersucht und mit den pulvertechnologischen Daten der Extraktpulver verglichen.

#### *Partikelgrößenverteilung der Kompaktate*

Die Partikelgrößenanalyse wird mit einem Laserbeugungsspektrometer durchgeführt. Durch die Kompaktierung werden bei Verwendung eines Granuliersiebes von 1 mm Maschenweite  $d_{50}$ -Werte von bis zu 700  $\mu\text{m}$  erreicht, was eine 20-fache Vergrößerung des mittleren Teilchendurchmessers im Vergleich zum Extraktpulver bedeutet. Um dies zu verdeutlichen, sind die charakteristischen Partikelgrößen ( $d_{10}$ ,  $d_{50}$ ,  $d_{90}$ ) ausgewählter Kompaktate (2 % Magnesiumstearat, 8 kN/cm Kompaktierkraft) in Tab. 5.1 zusammengefasst.

Tab. 5.1 Charakteristische Partikelgrößen der Kompaktate bestimmt mittels Laserbeugung (2 % Magnesiumstearat, 8 kN/cm Kompaktierkraft, 1 mm Maschenweite des Granuliersiebes)

	Kompaktat							
	M 9845	I 9861	F 9852	I 9731	F 9722	F 9831	I 0044	F 0015
$d_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	60	48	88	30	52	63	57	83
$d_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	569	555	588	462	552	550	543	569
$d_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )	1223	1233	1238	1144	1213	1205	1188	1150

Abb. 5.1 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Kompaktate I 0044, die bei 4, 8, 12 und 20 kN/cm Kompaktierkraft und mit 2 % Magnesiumstearat kompaktiert wurden. Mit steigender Kompaktierkraft nimmt die Menge an Feinanteil ( $<90 \mu\text{m}$ ) ab. Während bei 4 kN/cm Kompaktierkraft viel Feinanteil entsteht, wird bei Kompaktierkräften  $\geq 8$  kN/cm deutlich weniger Feinanteil erhalten, wobei keine Unterschiede bezüglich des Feinanteils und der  $d_{50}$ -Werte der Partikelgrößenverteilung bestehen. Dies dürfte auf eine erhöhte Friabilität des bei 4 kN/cm hergestellten Kompaktats und auf ver-

mehrten Abrieb bei der Siebgranulation zurückzuführen sein. Diese Beobachtungen wurden für alle Extraktchargen bestätigt.

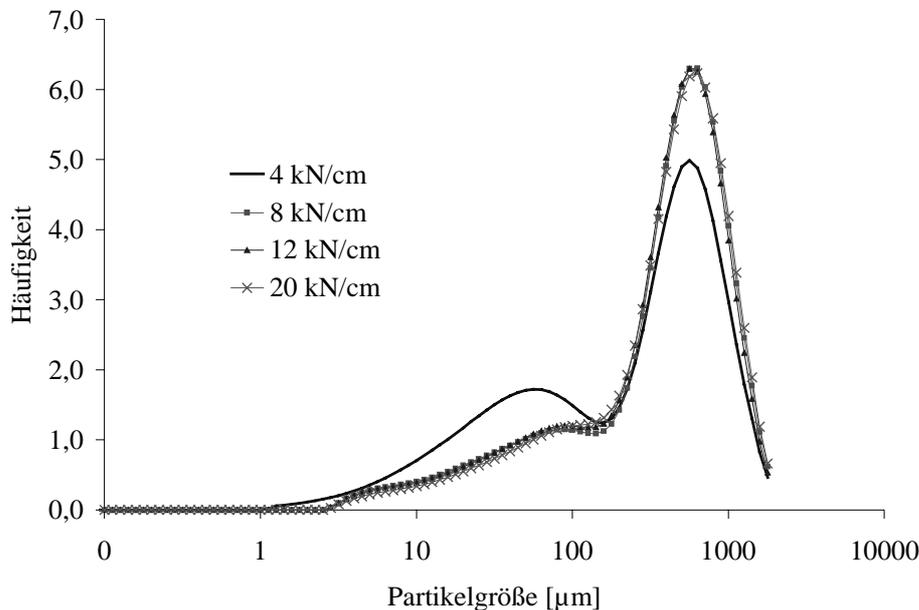


Abb. 5.1 Häufigkeitsverteilung der Kompaktate des Extraktpulvers I 0044 bei vier verschiedenen Kompaktierkräften (2 % Magnesiumstearat im Kompaktat).

Die Menge an Feinanteil ist ein generelles Problem der Walzenkompaktierung aufgrund unkompaktierten Materials im Kompaktat (Miller 1997). Ein hoher Feinanteil kann durch den Kompaktierprozess selbst hervorgerufen werden oder während der nachfolgenden Granulation der Schülpe entstehen. Abhängig von der Gestaltung der Walzenabdichtung kann ein gewisser Pulveranteil unkompaktiert zwischen den Walzen hindurchfließen. Zur Reduzierung des Feinanteils werden diverse technische Veränderungen der Kompaktoren diskutiert. Sheskey et al. (1994) erläutern die Verwendung von Systemen zur Pulverrückführung. Funakoshi et al. (1977) und Parrot (1981) berichten vom Einsatz konkav-konvex geformter Walzen, die am Rand einen erhabenen Ring zur Abdichtung aufweisen. Dadurch wird eine homogenere Kraftverteilung über die gesamte Walzenbreite erreicht. Die Masterwalze des GMP Mini-Factors ist aus diesen Gründen mit einer Kragenabdichtung versehen.

### ***Böschungswinkel und Hausnerfaktor***

Der Böschungswinkel der Kompaktate wird mit der Trichter-Methode gemäß DIN 53916 bestimmt. In Abb. 5.2 sind die Böschungswinkel der Extraktpulver und der

Kompaktate, hergestellt bei 8 kN/cm Kompaktierkraft und mit 0,5 % Magnesiumstearat, vergleichend dargestellt. Der Böschungswinkel der Extraktpulver beträgt 35° bis 48° (Punkt 4.1). Die Kompaktate weisen hingegen Böschungswinkel im Bereich von 28° bis 32° auf. Dies zeigt, dass Kompaktierung den Böschungswinkel wesentlich verbessert und Unterschiede zwischen den Extraktchargen bezüglich der Fließfähigkeit ausgleicht.

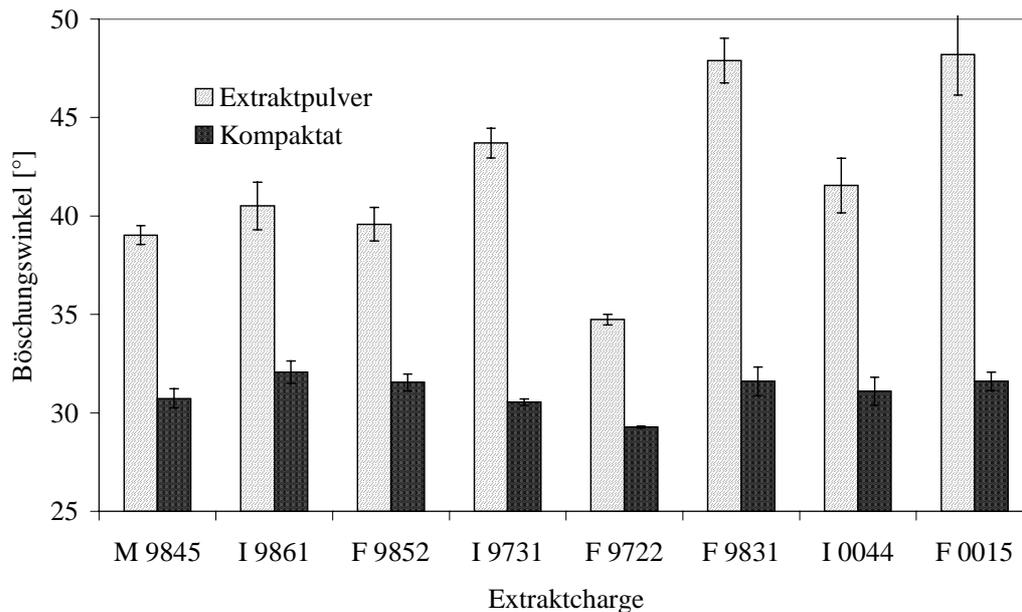


Abb. 5.2 Vergleich der Böschungswinkel von Extraktpulver und Kompaktat (8 kN/cm Kompaktierkraft, 0,5 % Magnesiumstearat im Kompaktat).

Des weiteren wird durch Kompaktierung der Hausnerfaktor verbessert, wie aus Abb. 5.3 ersichtlich ist. In Abb. 5.3 sind die Hausnerfaktoren der Extraktpulver I 0044 und F 0015 (gemischt mit 0,5 % Magnesiumstearat) mit Kompaktaten I 0044 und F 0015 (0,5 % Magnesiumstearat im Kompaktat) für verschiedene Kompaktierkräfte dargestellt. Extrakt I 0044 wurde in Punkt 4.2 als gut tablettierbar und Extrakt F 0015 als schlecht tablettierbar charakterisiert. Dies stimmt gut mit den Hausnerfaktoren überein. Die Verbesserung des Hausnerfaktors ist von der Kompaktierkraft unabhängig. Unterschiede zwischen den Extraktchargen werden durch die Kompaktierung wiederum ausgeglichen.

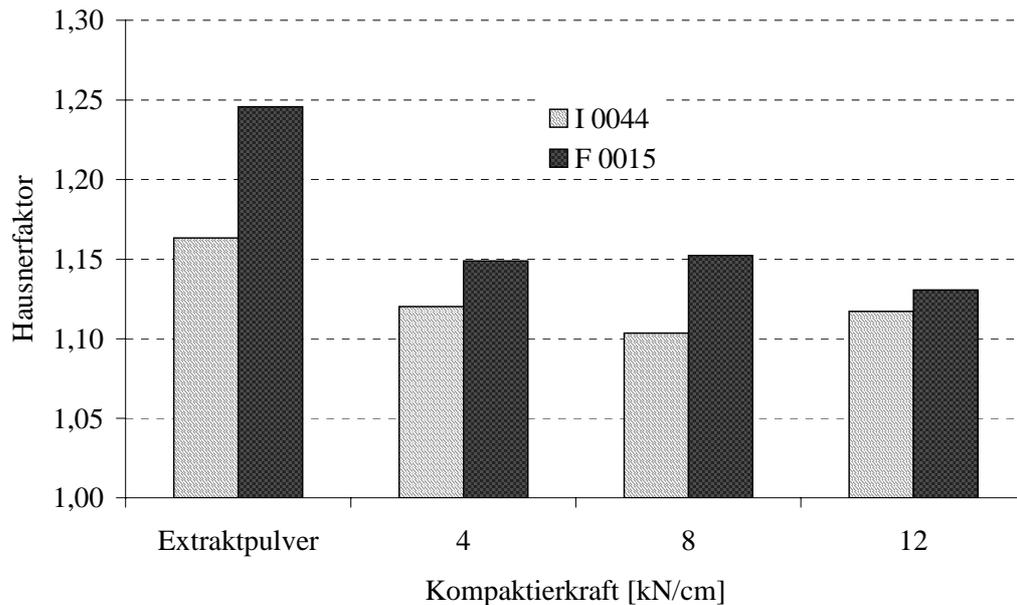


Abb. 5.3 Vergleich des Hausnerfaktors der Extraktpulver I 0044 und F 0015 (gemischt mit 0,5 % Magnesiumstearat) mit Kompaktaten I 0044 und F 0015 hergestellt bei verschiedenen Kompaktierkräften (0,5 % Magnesiumstearat im Kompaktat).

## 5.4 Tablettierung der Kompaktate

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, kann Extraktpulver durch Kompaktierung und anschließende Zerkleinerung in ein Granulat (Kompaktat) überführt werden, das wesentlich verbesserte pulvertechnologische Eigenschaften aufweist. Im Folgenden wird dargestellt, welchen Einfluss die Verwendung von Kompaktat auf die Tablettierung von Johanniskrauttrockenextrakt und die resultierende Tablettenqualität hat. Ziel ist die Herstellung von Tabletten, die bei kleinstmöglicher Zerfallszeit eine Bruchfestigkeit im Bereich von 60-80 N und Friabilitätswerte unter 0,2 % aufweisen.

### 5.4.1 Rezepturentwicklung

Ausgehend von der in Kapitel 4.2 zur Direkttablettierung verwendeten extraktpulverhaltigen Formulierung (Rezeptur Nr. 1 im Anhang Kapitel 10) wird eine Rezeptur entwickelt, mit der Extraktpulver und Kompaktat gleichermaßen tablettiert werden können. Die Rezepturentwicklung erfolgt mit Kompaktaten I 0044 und F 0015, die mit 2 % Magnesiumstearat bei 8 kN/cm Kompaktierkraft hergestellt wurden.

Zunächst wird die Tablettierung von Kompaktat in einer Formulierung vorgenommen, die analog Rezeptur Nr. 1 Cellactose, Tablettierhilfsmittel K, Magnesiumstearat und zusätzlich die quervernetzte Natriumcarboxymethylcellulose Ac-Di-Sol als Sprengmittel enthält (Rezeptur Nr. 2). Diese Formulierung zeigt während des Tablettierprozesses eine starke Entmischungstendenz. Die geforderte Mindestbruchfestigkeit von 60 N wird für Kompaktat F 0015 bei einer Presskraft von 7 kN und für Kompaktat I 0044 bei 10 kN erreicht. Bei hohen Presskräften ist ein Abfall der Bruchfestigkeit zu verzeichnen, der auf Deckeln der Tabletten hinweist. Die Zerfallszeit der kompaktathaltigen Tabletten ist geringer als bei extraktpulverhaltigen Tabletten (Kapitel 4.2). Bei 10 kN Presskraft zerfallen kompaktathaltige Tabletten I 0044 und F 0015 in 30 min bzw. 35 min, extraktpulverhaltige Tabletten hingegen zerfallen in etwa 50 min (Kapitel 4.2).

Die Ergebnisse mit Rezeptur Nr. 2 weisen bereits auf die Vorzüge der Walzenkompaktierung hin. Aufgrund der Entmischungstendenz und einer weiterhin hohen Zerfallszeit wird die Weiterentwicklung einer von Rocksloh (1999a) beschriebenen Formulierung angestrebt. Als Füllstoff wird mikrokristalline Cellulose, Avicel PH 101, mit einer mittleren Teilchengröße von 44  $\mu\text{m}$  verwendet. Zunächst wird Kompaktat zusammen mit Avicel PH 101 als Füllstoff und Ac-Di-Sol als Sprengmittel verarbeitet (Rezeptur Nr. 3, Rezeptur nach Rocksloh (1999a)). Rezeptur Nr. 3 scheidet aufgrund sehr schlechter Fließeigenschaften aus. Eine Formulierung, die nur ein Gemisch aus Kompaktat und Avicel PH 101 darstellt, lässt sich gut tablettieren (Rezeptur Nr. 4). Bei einer Presskraft von 10 kN werden mit Rezeptur Nr. 4 Tabletten mit einer Bruchfestigkeit von 70 N erhalten, die innerhalb von 30 min zerfallen. Es ist keine Deckeltendenz festzustellen. Die Fließfähigkeit von Rezeptur Nr. 3 (Kompaktat, Avicel PH 101 und Ac-Di-Sol) lässt sich durch Zusatz von 1 % kolloidaler Kieselsäure (Cab-O-Sil M 5) verbessern (Rezeptur Nr. 5). Bei Presskräften von 7,3 bzw. 9,4 kN werden mit Kompaktat F 0015 Tabletten erhalten, die eine Bruchfestigkeit von 67 bzw. 85 N aufweisen und innerhalb von 13 min zerfallen. Die geringen Zerfallszeiten im Vergleich zu Tabletten der Rezeptur Nr. 4 verdeutlichen den Vorteil eines Sprengmittelzusatzes. Diese Rezeptur ist gut verarbeitbar. Es tritt jedoch vereinzelt Kleben an den Stempeln auf. Aus diesem Grund wird der Formulierung 0,5 %

Magnesiumstearat in der äußeren Phase zugesetzt. Die resultierenden Rezepturen werden unter Punkt 5.4.2 diskutiert.

Die Verarbeitbarkeit von Extraktpulver in einer Formulierung mit Avicel PH 101, Ac-Di-Sol und Cab-O-Sil analog Rezeptur Nr. 5 wird überprüft (Rezeptur Nr. 6). Da diese Rezeptur kein Schmiermittel enthält, treten bei der Tablettierung große Schwierigkeiten auf. Dieser Versuch wird dennoch durchgeführt, um die Vergleichbarkeit mit Rezeptur Nr. 5 gewährleisten zu können. Des Weiteren wird eine Formulierung tablettiert, die einen Magnesiumstearatzusatz von 0,5 % enthält (Rezeptur Nr. 7). Die Tablettierung von Extraktpulver nach Rezepturen Nr. 6 und 7 ergibt bei Presskräften über 7 kN Tabletten mit Bruchfestigkeiten über 60 N und Zerfallszeiten von 30 min. Ein negativer Einfluss von 0,5 % Magnesiumstearat in extrakthaltigen Tabletten auf die Zerfallszeit ist nicht festzustellen.

Eine Formulierung auf der Basis von Avicel PH 101, Ac-Di-Sol, Cab-O-Sil M 5 und Magnesiumstearat eignet sich folglich zur vergleichenden Tablettierung von Extraktpulver und Kompaktat.

#### **5.4.2 Tablettierbarkeit extrakt- und kompaktathaltiger Mischungen**

Die bereits unter Punkt 4.2 beschriebenen Tablettierprobleme zeigen sich auch bei der Tablettierung der Extraktpulver gemäß Rezeptur Nr. 7, wobei die unregelmäßige Befüllung der Matrize das Hauptproblem darstellt. Trotz Verwendung eines Rührflügel-füllschuhs erfordert die Tablettierung von extraktpulverhaltigen Mischungen häufig Manipulationen an der Produktzuführung der Tablettenmaschine. Dies ist mit der schlechten Fließfähigkeit der extraktpulverhaltigen Mischungen zu erklären, die Böschungswinkel im Bereich von 39° bis 43° aufweisen. Bei der Tablettierung von Extraktpulver treten vermehrt Klebeeffekte der Tabletten an der Unterstempeloberfläche auf, was zur Beschädigung der Tabletten führt (Kraterbildung). Des Weiteren wird die Tablettierung extraktpulverhaltiger Mischungen durch Staubentwicklung während des Prozesses erschwert.

Die Walzenkompaktierung verbessert die Handhabung und Verarbeitbarkeit von Johanniskrauttrockenextrakt wesentlich. Die Rezepturen Nr. 8 bis 11 basieren auf Rezeptur Nr. 7, enthalten jedoch an Stelle von Extraktpulver kompaktierten Extrakt

mit unterschiedlichen Mengen an Magnesiumstearat. Mit Kompaktat treten weder Probleme in der Produktzuführung noch Klebeeffekte an den Stempeln auf. Die Staubentwicklung während des Prozesses wird durch Verwendung von Kompaktat reduziert. Formulierungen mit Kompaktat, welche 0,5 % (Rezeptur Nr. 8) und 2 % (Rezeptur Nr. 9) Magnesiumstearat in der inneren Phase enthalten, benötigen 0,5 % Magnesiumstearatzusatz in der äußeren Phase, um Klebetendenzen zu verringern. Bei Tabletten gemäß Rezeptur Nr. 8 treten noch leichte Klebetendenzen auf. Bei 5 % Magnesiumstearat in der inneren Phase kann auf einen Magnesiumstearatzusatz in der äußeren Phase verzichtet werden, da keinerlei Klebetendenzen auftreten (Rezepturen Nr. 10 und Nr. 11).

## **5.5 Eigenschaften der kompaktathaltigen Tabletten**

Im Folgenden werden die Eigenschaften kompaktathaltiger Tabletten, die auf Basis der Rezepturen Nr. 8-11 hergestellt werden, dargestellt und mit den Eigenschaften extrakthaltiger Tabletten (Rezeptur Nr. 7) verglichen.

### **5.5.1 Bruchfestigkeit und Friabilität**

Abb. 5.4 zeigt die Presskraft-Bruchfestigkeits-Profile extraktpulver- und kompaktathaltiger Tabletten I 0044 und F 0015, die gemäß Rezepturen Nr. 7 und Nr. 9 hergestellt werden. Die Kompaktate enthalten 2 % Magnesiumstearat und wurden bei 8 kN/cm kompaktiert. Die Bruchfestigkeit steigt mit steigender Presskraft, wobei sich extraktpulver- und kompaktathaltige Tabletten sehr ähnlich verhalten. Extraktpulverhaltige Tabletten zeigen bei Presskräften über 13 kN eine Deckelneigung, was an der abfallenden Bruchfestigkeitskurve erkennbar ist und durch Beobachtungen während der Bruchfestigkeitsprüfung im Bruchfestigkeitstester bestätigt wird. Diese Tendenz wurde bereits unter Punkt 4.2 für die Direkttablettierung von Extraktpulver festgestellt. Deckeln wird meist durch Luft hervorgerufen, die während des Tablettierprozesses in der Tablette eingeschlossen wird. Bei kompaktathaltigen Tabletten ist keine Deckeltendenz festzustellen.

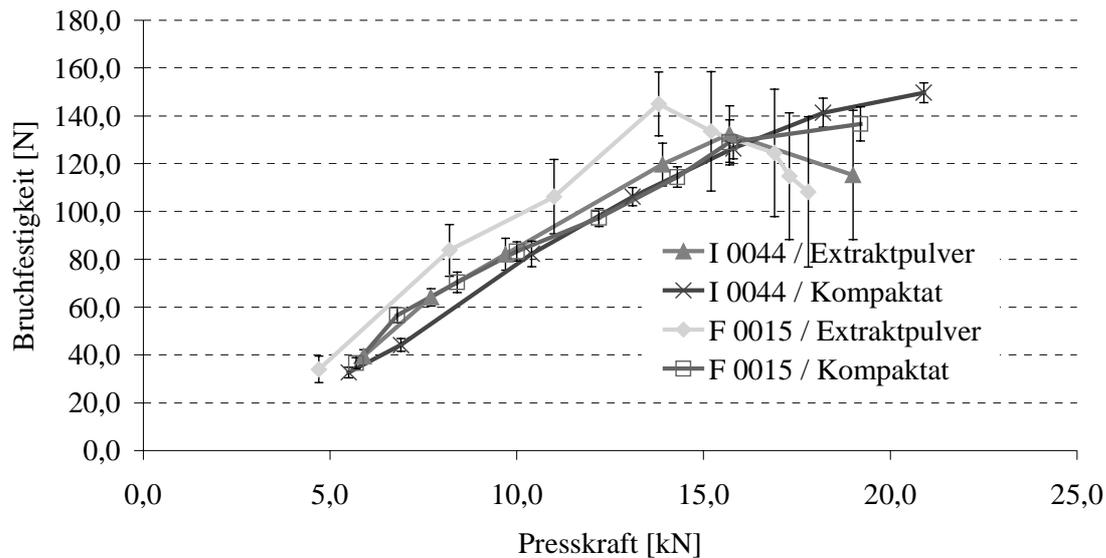


Abb. 5.4 Presskraft-Bruchfestigkeits-Profile extraktpulver- und kompaktathaltiger Tabletten I 0044 und F 0015 gemäß Rezepturen Nr. 7 und Nr. 9 (2 % Magnesiumstearat im Kompaktat, 8 kN/cm Kompaktierkraft).

Um Zerfallszeiten kompaktathaltiger Tabletten im Bereich von 10 min zu erreichen, wird für die weitere Tablettierung kompaktathaltiger Formulierungen gemäß Rezepturen Nr. 8-11 auf der Basis vorhergehender Tablettiersversuche eine Presskraft im Bereich von 7,0 bis 8,5 kN eingestellt. Als Beispiel sind in Tab. 5.2 die Presskräfte und die resultierenden Bruchfestigkeiten der extrakt- und kompaktathaltigen Tabletten aufgelistet, die gemäß Rezepturen Nr. 7 und 8 hergestellt werden.

Tab. 5.2 Presskraft und Bruchfestigkeit von Tabletten, die Extraktpulver und Kompaktat (0,5 % Magnesiumstearat in der inneren Phase) enthalten

Extraktcharge	Rezeptur 7 (Extraktpulver)		Rezeptur 8 (Kompaktat)	
	Presskraft [kN] ( $\pm$ sdv)	Bruchfestigkeit [N] ( $\pm$ sdv)	Presskraft [kN] ( $\pm$ sdv)	Bruchfestigkeit [N] ( $\pm$ sdv)
M 9845	8,5 $\pm$ 0,8	101 $\pm$ 9	7,8 $\pm$ 0,5	71 $\pm$ 6
I 9861	8,1 $\pm$ 0,5	89 $\pm$ 7	8,5 $\pm$ 0,5	74 $\pm$ 5
F 9852	6,7 $\pm$ 0,4	85 $\pm$ 5	8,1 $\pm$ 0,8	84 $\pm$ 10
I 9731	8,0 $\pm$ 0,5	74 $\pm$ 6	8,2 $\pm$ 0,7	67 $\pm$ 8
F 9722	7,5 $\pm$ 0,6	92 $\pm$ 8	7,8 $\pm$ 0,5	74 $\pm$ 6
F 9831	8,4 $\pm$ 0,5	78 $\pm$ 6	8,2 $\pm$ 0,4	72 $\pm$ 5
I 0044	7,2 $\pm$ 0,5	76 $\pm$ 6	8,5 $\pm$ 0,6	76 $\pm$ 7
F 0015	8,7 $\pm$ 1,2	115 $\pm$ 14	8,7 $\pm$ 0,5	84 $\pm$ 5
Mittelwert	7,9 $\pm$ 0,7	89 $\pm$ 14	8,2 $\pm$ 0,3	75 $\pm$ 6

Ein parametrischer einfacher ANOVA-Test zeigt, dass zwischen den für extraktpulver- und kompaktathaltige Tabletten verwendeten mittleren Presskräften kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) besteht. Daher können die mittleren Presskräfte von

7,9 kN für extraktpulverhaltige Tabletten und 8,2 kN für kompaktathaltige Tabletten als gleich angesehen werden. Extraktpulverhaltige Tabletten weisen jedoch mit 89 N gegenüber kompaktathaltigen Tabletten (75 N) eine statistisch signifikant höhere ( $p > 0,05$ ) mittlere Bruchfestigkeit auf.

Bei Tabletten mit einer Bruchfestigkeit über 60 N ist keine Friabilität feststellbar. Die Tablettierung von Extraktpulver und Kompaktat gemäß Rezepturen Nr. 7-11 zu Tabletten mit guter mechanischer Festigkeit ist also möglich. Da pflanzenextrakt-haltige Tabletten zumeist mit einem Überzug versehen werden, kommt der mechanischen Festigkeit der Tabletten besondere Bedeutung zu und muss bei der galenischen Entwicklung berücksichtigt werden.

### 5.5.2 Zerfallszeit

Abb. 5.5 vergleicht die Presskraft-Zerfallszeit-Profile von extraktpulver- und kompaktathaltigen Tabletten I 0044 und F 0015 (Rezepturen Nr. 7 und Nr. 9). Die Kompaktate enthalten 2 % Magnesiumstearat und wurden bei 8 kN/cm kompaktiert.

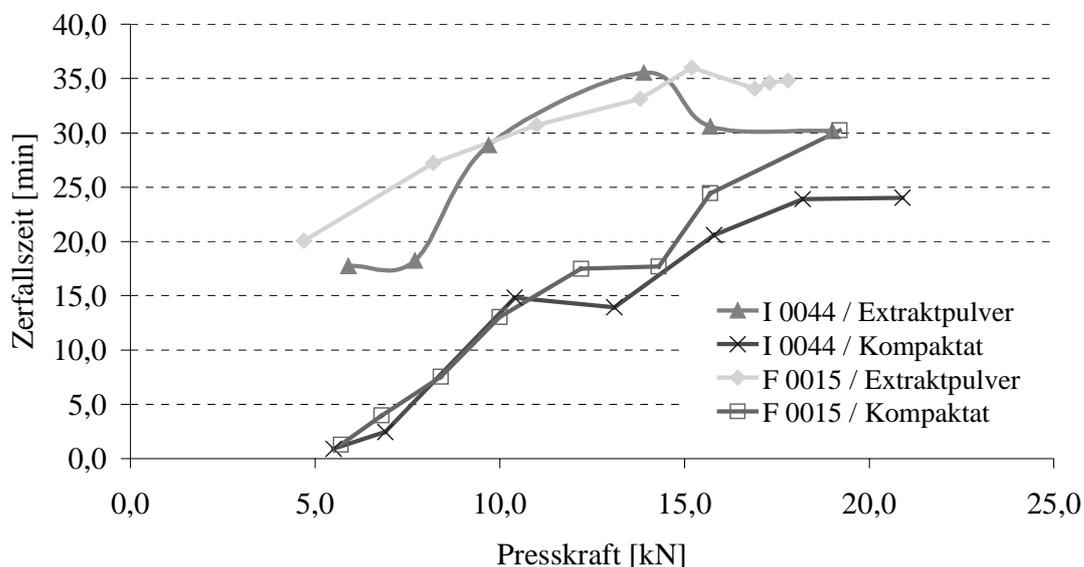


Abb. 5.5 Presskraft-Zerfallszeit-Profile extraktpulver- und kompaktathaltiger Tabletten I 0044 und F 0015, gemäß Rezepturen Nr. 7 und Nr. 9 (2 % Magnesiumstearat im Kompaktat, 8 kN/cm Kompaktierkraft).

Wie Abb. 5.5 zeigt, steigt die Zerfallszeit aller Tabletten mit zunehmender Presskraft stark an. Die Zerfallszeit der extraktpulverhaltigen Tabletten ist viel höher als die kompaktathaltiger Tabletten. Kompaktathaltige Tabletten, die bei Presskräften unter

10 kN hergestellt wurden, zerfallen innerhalb von 10 min, während unter denselben Bedingungen hergestellte extraktpulverhaltige Tabletten Zerfallszeiten von mehr als 20 min aufweisen. Diese Beobachtung wurde für extraktpulver- und kompaktathaltige Tabletten aller Extraktchargen bestätigt. Abb. 5.6 zeigt die Zerfallszeiten von allen nach Rezepturen Nr. 7-11 hergestellten extraktpulver- und kompaktathaltigen Tabletten der acht Extraktchargen. Die Kompaktierkraft bei Herstellung der Kompaktate beträgt 8 kN/cm.

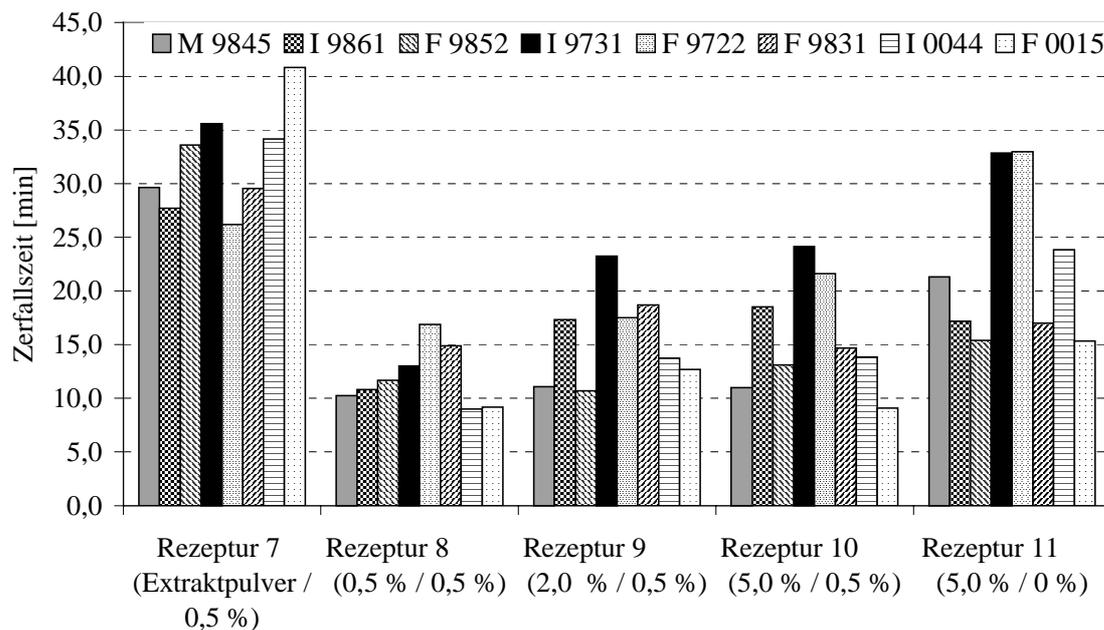


Abb. 5.6 Zerfallszeit von Tabletten mit Extraktpulver (Rezeptur Nr. 7) und Kompaktat (Rezepturen Nr. 8 – 11). Das Kompaktat wurde mit einer Kompaktierkraft von 8 kN/cm hergestellt. Die Zahlen in Klammern zeigen den Anteil von Magnesiumstearat in der inneren Phase / Anteil Magnesiumstearat in der äußeren Phase.

Die extraktpulverhaltigen Tabletten (Rezeptur Nr. 7) zeigen im Durchschnitt Zerfallszeiten von 32 min, wobei die längste Zerfallszeit (Extraktpulver F 0015) 41 min beträgt. Im Gegensatz dazu weisen Tabletten, die Kompaktat mit 0,5 % Magnesiumstearat enthalten (Rezeptur Nr. 8), eine deutlich verringerte mittlere Zerfallszeit von 12 min auf. Die kompaktathaltigen Tabletten M 9845 und F 9722 zerfallen in weniger als 10 min. Dies bedeutet eine drei- bis vierfache Verringerung der Zerfallszeit, verglichen mit extraktpulverhaltigen Tabletten, wobei die längeren Zerfallszeiten extraktpulverhaltiger Tabletten mit den Eigenschaften von Johannes-

kraut-Extraktpulver erklärt werden können. Das stark hygroskopische Extraktpulver bildet bei Kontakt mit Wasser eine Quellschicht an der Tablettenoberfläche, die weiteren Wasserzutritt verhindert. Dies wird durch Zerschneiden von teilweise zerfallenen extraktpulverhaltigen Tabletten bestätigt, deren Tabletteninneres völlig trocken vorgefunden wurde. Andererseits zerfallen kompaktathaltige Tabletten schnell und setzen die Kompaktatpartikel frei.

Bei kompaktathaltigen Tabletten mit 2 % und 5 % Magnesiumstearat in der äußeren Phase (Rezepturen Nr. 9 und 10) ist ein leichter Anstieg der mittleren Zerfallszeit auf 16 min erkennbar (Abb. 5.6). Dies könnte auf den hydrophobisierenden Einfluss von Magnesiumstearat zurückzuführen sein. Die kompaktathaltigen Tabletten der Rezeptur Nr. 11 weisen eine mittlere Zerfallszeit von 21 min auf. Rezeptur Nr. 11 enthält Kompaktat mit 5 % Magnesiumstearat in der inneren Phase und wird im Gegensatz zu Rezepturen Nr. 7-10 ohne Magnesiumstearat in der äußeren Phase verarbeitet. Kompaktathaltige Tabletten F 9852 und I 9731 nach Rezeptur Nr. 11 zerfallen erst in 33 min. Dieser Effekt ist bisher ungeklärt.

Die Ergebnisse lassen keinen Einfluss der zur Herstellung der Kompaktate eingesetzten Kompaktierkraft auf die Bruchfestigkeit und die Zerfallszeit der kompaktathaltigen Tabletten erkennen.

### **5.5.3 Freisetzung von Hyperforin, Hypericin und Rutin**

Eine ausreichende Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes ist wesentliche Voraussetzung für die Wirksamkeit eines Arzneimittels. Orale Bioverfügbarkeitsstudien von Hyperforin aus Hypericum-Extrakten an Tier und Mensch von Biber et al. (1998) zeigen, dass maximale Hyperforinplasmaspiegel nach 3,5 h erreicht werden. Generell sind Freigabeuntersuchungen geeignet, um die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes aus einer Zubereitung abzuschätzen, wenn der Arzneistoff gut resorbiert wird. Die Wirkstofffreigabe aus pflanzenextrakthaltigen Beruhigungsdragees wird von Burger und Dialer (1981) mittels photometrischer Methoden untersucht. Westerhoff et al. (2000) vergleichen die Freisetzung von Hyperforin und Hypericin aus johanniskraut-trockenextrakthaltigen Fertigarzneimitteln in verschiedenen Freisetzungsmedien unter Verwendung von HPLC-Methoden.

Freigabeuntersuchungen an im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Tabletten werden durchgeführt, um die Freisetzungsraten von Hyperforin, Hypericin und Rutin als Leitflavonoid aus extraktpulver- und kompaktathaltigen Tabletten zu vergleichen. Diese Substanzen werden aufgrund ihrer potentiellen pharmakologischen Bedeutung ausgewählt (Kapitel 2). Die Freigabeuntersuchungen erfolgen in einer Paddleapparatur gemäß USP 24 (Apparat 2) in Phosphatpuffer pH 6,4 R Ph. Eur. bei 37°C, dem 2 % Natriumlaurylsulfat zugesetzt sind. Natriumlaurylsulfat senkt die Oberflächenspannung des Freisetzungsmediums und fördert die Benetzbarkeit. Hyperforin, Hypericin und Rutin werden nach in Kapitel 3 beschriebenen HPLC-Methoden bestimmt. Die Detektion von Hypericin erfolgt mittels Fluoreszenzdetektion (Gray et al. 2000). Abb. 5.7 zeigt die Freisetzungsprofile von Hyperforin, Hypericin und Rutin.

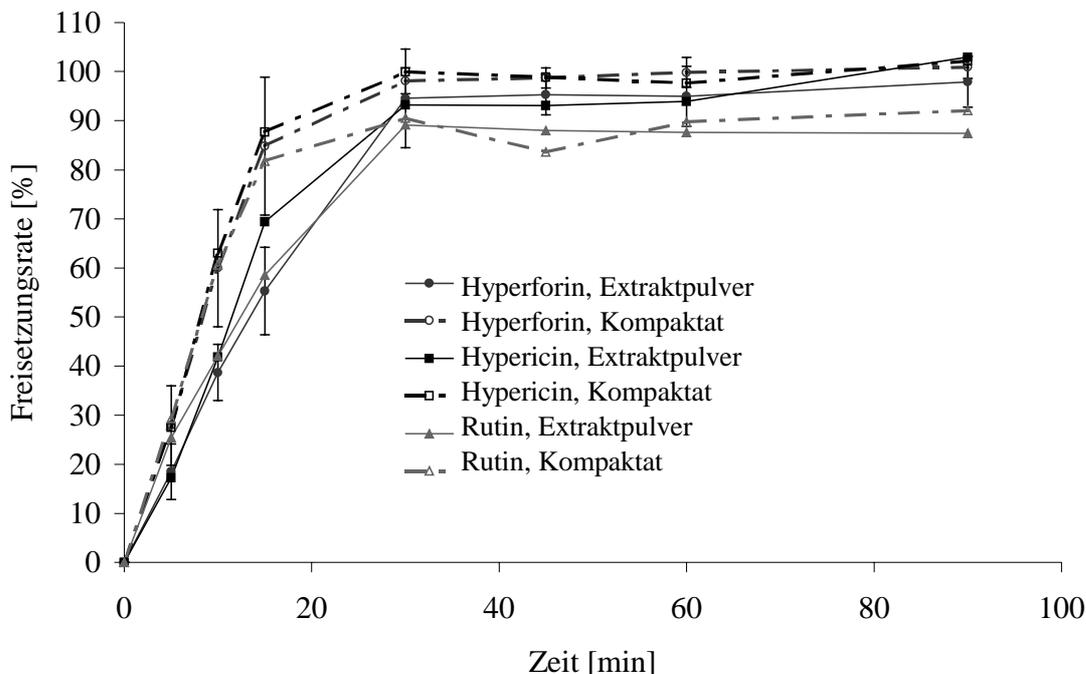


Abb. 5.7 Freisetzung von Hyperforin, Hypericin und Rutin aus extraktpulverhaltigen und kompaktathaltigen Tabletten F 0015.

Die Freisetzung aller drei Inhaltsstoffe erfolgt aus kompaktathaltigen Tabletten deutlich schneller als aus extraktpulverhaltigen Tabletten. Dieser Unterschied der Freisetzungsraten von Hyperforin, Hypericin und Rutin könnte auf Unterschieden in der Zerfallszeit beruhen. Die Gesamtoberfläche der Granulatpartikel ist wesentlich größer als die Tablettenoberfläche, was die Freisetzung beschleunigt. Ein parametrischer einfacher ANOVA-Test zeigt, dass zwischen den Freisetzungsraten aus

extraktpulver- und kompaktathaltigen Tabletten nach 10 min und 15 min ein statistisch signifikanter Unterschied besteht, wie in Tab. 5.3 aufgeführt ist. Nach 30 min Freisetzung weisen jedoch extraktpulver- und kompaktathaltige Tabletten dieselbe Freisetzungsrate auf. Die Verwendung einer geringeren Rührerdrehzahl könnte die Freisetzungsdifferenzen zwischen den Tabletten deutlicher darstellen (Galia et al. 1998).

Tab. 5.3 Statistische Untersuchung der Freisetzungsraten nach 10 und 15 min aus extraktpulver- und kompaktathaltigen Tabletten F 0015

Zeit [min]	Hyperforin (% freigesetzt)		Hypericin (% freigesetzt)		Rutin (% freigesetzt)	
	Extraktpulver (n=6)	Kompaktat (n=6)	Extraktpulver (n=6)	Kompaktat (n=6)	Extraktpulver (n=3)	Kompaktat (n=6)
	10	39 ± 5	60 ± 11**	42 ± 2	63 ± 11***	42 ± 2
15	55 ± 8	85 ± 12***	69 ± 16	88 ± 10*	59 ± 3	82 ± 12*

\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

## 5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Kompaktierung verbessert deutlich die Fließfähigkeit der Extraktchargen und der daraus hergestellten Tablettiermischungen, sowie deren Verpressbarkeit und die Tablettenqualität. Unterschiede zwischen den Extraktchargen bezüglich der physikalischen Eigenschaften und der Verarbeitbarkeit werden ausgeglichen. Die Walzenkompaktierung von Johanniskrauttrockenextrakt erfordert einen Zusatz von wenigstens 0,5 % Magnesiumstearat. Die Tablettierung von kompaktathaltigen Tablettiermischungen reduziert die Staubentwicklung während des Prozesses und verhindert ein Deckeln der Tabletten. Die Klebeneigung an den Stempeln ist bei Formulierungen mit 2 % und 5 % Magnesiumstearat in der inneren Phase stark verringert. Kompaktathaltige Tabletten haben wesentlich kürzere Zerfallszeiten von ungefähr 12 min. Ein hoher Magnesiumstearatzusatz in der inneren Phase beeinträchtigt weder die Zerfallszeit noch die Bruchfestigkeit der Tabletten. Die Freisetzung von Hyperforin, Hypericin und Rutin erfolgt aus kompaktathaltigen Tabletten schneller als aus extraktpulverhaltigen Tabletten.

# KAPITEL 6

## OPTIMIERUNG DER KOMPAKTAT- UND TABLETTEN- EIGENSCHAFTEN MITTELS EINES 3<sup>3</sup>-FAKTORENEXPERIMENTES

### 6.1 Einleitung

Um den Einfluss verschiedener Prozessparameter der Walzenkompaktierung auf die Eigenschaften von Kompaktat und kompaktathaltiger Tabletten zu untersuchen und die optimalen Prozessparameter festzustellen, wird ein Faktorenexperiment durchgeführt. Die Methodologie der Systemantwort-Flächen (Response surface) in Kombination mit einem Faktorenexperiment stellt ein effektives Instrument zur Vorhersage und Optimierung von Prozessen dar. Hierbei wird die Zielgröße in einem bestimmten Bereich der Einflussgrößen durch ein Polynom angenähert. Die hergeleitete Gleichung dient zur Vorhersage der Zielgröße bei neuen Versuchsbedingungen. Ziel ist das Auffinden eines Bereichs, in dem die Zielgröße maximiert oder minimiert wird. Die Zielgröße wird in Abhängigkeit von den Einflussgrößen als Systemantwort-Fläche dargestellt (Lewis 1999). Zahlreiche Autoren untersuchen Granulier- und Tablettierprozesse unter Verwendung der Regressionsanalyse. Mercku et al. (1993, a, b, 1994) betrachten die Granulation in der Wirbelschicht und untersuchen den Einfluss von Variablen des Granulier- und Tablettierprozesses auf die Granulat- und Tabletteneigenschaften. Lindberg et al. (1985) wenden die Regressionsanalyse zur Untersuchung des Einflusses von Prozessvariablen und der Tablettenformulierung auf die Zerfallszeit und die Bruchfestigkeit von Tabletten an. Die Regressionsanalyse wird von Bos et al. (1991, a, b) erfolgreich auf ein 3<sup>4</sup>-Faktorenexperiment zur Untersuchung des Einflusses der Sprengmittelkonzentration, der Lagertemperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit auf die physikalische Stabilität direkt verpresster Tabletten angewendet.

Im Folgenden wird der Einfluss von drei unabhängigen Prozessvariablen der Walzenkompaktierung auf die mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  der Kompaktate I 0044 und F 0015 sowie auf die Zerfallszeit kompaktathaltiger Tabletten I 0044 und F 0015 untersucht

und verglichen. Hierbei sind Einflüsse höherer Ordnung zu erwarten, die prinzipiell mit Hilfe eines Central Composite Designs einfach erfasst werden können. Ein Central Composite Design setzt jedoch die Möglichkeit voraus, die Niveaus der Prozessvariablen nach den Vorgaben eines einem Central Composite Design entsprechenden Versuchsplanes wählen zu können. Da jedoch in den folgenden Untersuchungen die Maschenweite des Granuliersiebes (Granuliersiebgröße) als unabhängige Prozessvariable nicht beliebig wählbar ist, kommt ein Central Composite Design nicht in Betracht. Aus diesem Grund erfolgt die Kompaktierung gemäß dem statistischen Versuchsplan eines  $3^3$ -Faktorenexperimentes.

## 6.2 Versuchsplanung und Theorie

Statistische Versuchspläne ermöglichen es, lineare und höhere Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Einflussgrößen zu erkennen, wenn die Parameter auf mindestens drei Niveaus untersucht werden. Der statistische Versuchsplan eines  $3^3$ -Faktorenexperimentes ist schematisch in Abb. 6.1 dargestellt.

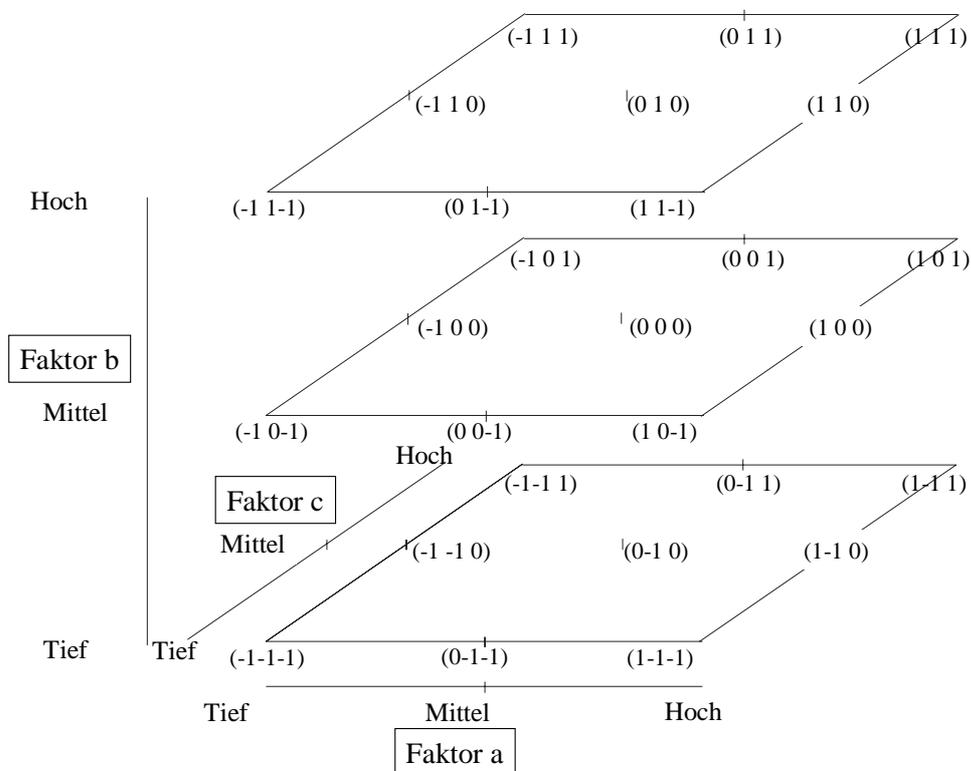


Abb. 6.1 Schema eines  $3^3$  Faktorenexperimentes.

Ein 3<sup>3</sup>-Faktorexperiment untersucht den Einfluss von drei unabhängigen Faktoren auf jeweils drei unterschiedlichen Niveaus (Armstrong 1990). Niedriges, mittleres und hohes Niveau werden mit -1, 0 und +1 bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wird ein 3<sup>3</sup>-Faktorexperiment mit den Extraktchargen I 0044 und F 0015 durchgeführt. Die drei unabhängigen Variablen sind die Magnesiumstearatkonzentration im Kompaktat M, die Kompaktierkraft K und die Granuliersiebgröße S. Die normalisierten Niveaus der unabhängigen Einflussgrößen (Faktoren) sind in Tab. 6.1 dargestellt. Die Niveaus von S sind nicht absolut äquidistant verteilt, da ein Granuliersieb mit Maschenweite 1,20 mm nicht erhältlich ist. Pro Extraktcharge werden 27 Versuche durchgeführt.

Tab. 6.1 Unabhängige Faktoren und deren experimentelle Niveaus des 3<sup>3</sup> Faktorexperiments

Unabhängiger Faktor	Faktorenniveau			Einheit
	-1	0	+1	
Magnesiumstearat M	0,50	2,00	3,50	[%]
Kompaktierkraft K	4,00	8,00	12,00	[kN/cm]
Siebgröße S	0,80	1,00	1,25	[mm]

Durch Varianzanalyse und multiple, lineare, schrittweise Regression wird der Zusammenhang zwischen Zielgröße und unabhängigen Faktoren untersucht (Juslin et al. 1995). Die Regressionskoeffizienten der Ergebnisfunktion (Gl. 6.1) werden mit dem Statistikprogramm Statgraphics (Fa. Manugistics) berechnet. Für die weitere Auswertung und Interpretation werden in die Ergebnisfunktionen der mittleren Partikelgröße  $d_{50}$  und der Tablettenzerfallszeit nur Terme mit statistisch signifikanten Regressionskoeffizienten ( $p=0,1$ ) berücksichtigt. Die allgemeine Gleichung lautet:

$$Y(M, K, S) = \beta_0 + \beta_1 M + \beta_2 K + \beta_3 S \quad \text{lineare Terme} \quad \text{Gl. 6.1}$$

$$+ \beta_4 MK + \beta_5 MS + \beta_6 KS \quad \text{Wechselwirkungen}$$

$$+ \beta_7 M^2 + \beta_8 K^2 + \beta_9 S^2 + \quad \text{quadratische Terme}$$

Y = Zielgröße

M, K, S = unabhängige Faktoren

$\beta_{i,j}$  = Regressionskoeffizienten

### 6.3 Experimentelle Ergebnisse

Die Ergebnisse der mit den Extraktpulvern I 0044 und F 0015 durchgeführten Versuchsreihen sind für die Zielgrößen mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  des Granulats und

Zerfallszeit der Tabletten in Tab. 6.2 dargestellt. Eine Zusammenfassung der statistischen Parameter der 3<sup>3</sup> Faktorenexperimente befindet sich im Anhang Kapitel 10.

*Tab. 6.2 Experimentelle Ergebnisse des 3<sup>3</sup>-Faktorenexperiments: Mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  und Zerfallszeit der Kompaktate I 0044 und F 0015 (M Magnesiumstearat, K Kompaktierkraft, S Siebgröße)*

<i>Versuch</i>	<i>M</i>	<i>K</i>	<i>S</i>	$d_{50}$ I 0044 [ $\mu\text{m}$ ]	Zerfallszeit I 0044 [s]	$d_{50}$ F 0015 [ $\mu\text{m}$ ]	Zerfallszeit F 0015 [s]
1	-1	-1	-1	201	572	375	784
2	0	-1	-1	317	479	491	512
3	1	-1	-1	236	1203	391	951
4	-1	0	-1	416	800	449	500
5	0	0	-1	445	540	451	496
6	1	0	-1	419	939	456	925
7	-1	1	-1	467	380	473	270
8	0	1	-1	455	345	384	614
9	1	1	-1	428	855	438	963
10	-1	-1	0	345	540	538	433
11	0	-1	0	346	909	445	713
12	1	-1	0	324	1019	478	864
13	-1	0	0	451	540	584	551
14	0	0	0	486	823	569	760
15	1	0	0	468	675	535	753
16	-1	1	0	450	374	601	334
17	0	1	0	471	560	587	676
18	1	1	0	501	667	528	416
19	-1	-1	1	467	725	656	569
20	0	-1	1	490	834	686	514
21	1	-1	1	484	565	671	763
22	-1	0	1	682	587	687	549
23	0	0	1	660	704	785	550
24	1	0	1	628	827	752	461
25	-1	1	1	672	511	717	388
26	0	1	1	676	788	789	389
27	1	1	1	767	696	714	835

#### 6.4 Mittlere Partikelgröße $d_{50}$

Die Kompaktierkraft K und die Granuliersiebgröße S haben großen Einfluss auf die mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  beider Kompaktate, wie aus den Signifikanzen (Tab. 6.3) und den berechneten Haupteffekten (Anhang Kapitel 10, Tab. 10.34 und 10.35) ersichtlich ist.

Tab. 6.3 Zusammenfassung der Varianzanalyse des Einflusses der unabhängigen Faktoren auf die Zielgrößen des 3<sup>3</sup>-Faktorenexperimentes

Effekte und Wechselwirkungen	Zielgrößen			
	$d_{50}$ Kompaktat I 0044	$d_{50}$ Kompaktat F 0015	Zerfallszeit I 0044	Zerfallszeit F 0015
M: Magnesiumstearate	-	-	***	***
K: Kompaktierkraft	****	***	**	*
S: Granuliersiebgröße	****	****	-	-
MM	-	-	-	-
MK	-	-	-	-
MS	-	-	-	-
KK	****	*	-	-
KS	-	-	-	-
SS	****	**	-	-

\*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$

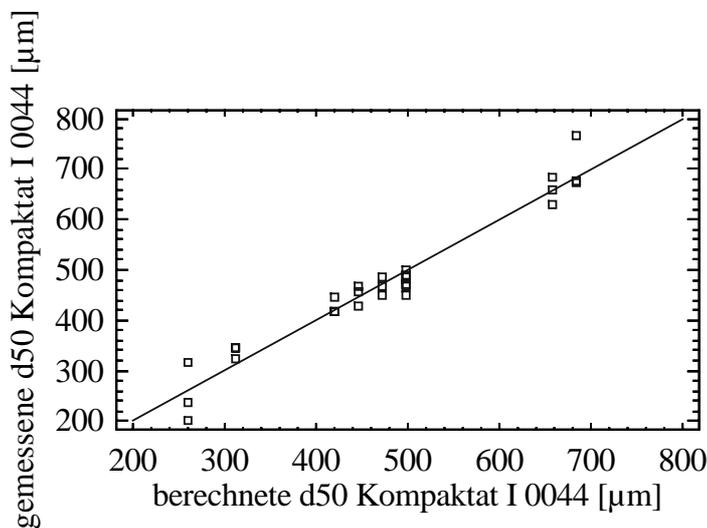
Die Effekte werden hier beispielhaft für die mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  von Kompaktat I 0044 diskutiert (Tab. 10.34). Der große Einfluss der Variablen K und S auf die mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  von Kompaktat I 0044 wird in den hohen berechneten Effekten von 186,33 für K und 238,00 für S deutlich. Beide Effekte weisen ein positives Vorzeichen auf, d.h. eine Erhöhung der Kompaktierkraft und eine größere Siebmaschenweite beim Zerkleinern der Schülpe führen zu einer Erhöhung des mittleren Partikeldurchmessers des Granulats. Weiterhin sind die quadratischen Terme der Kompaktierkraft K und der Siebmaschenweite S signifikant, wobei ersterer einen negativen und letzterer einen positiven, die Granulatkorngröße erhöhenden Einfluss ausübt. Auch beim zweiten Extrakt F 0015 führt eine Erhöhung der Kompaktierkraft K und der Siebmaschenweite des Granuliersiebes S zu einer Erhöhung der mittleren Granulatkorngröße der Kompaktate. Der Einfluss der quadratischen Glieder ist signifikant, aber weniger ausgeprägt als beim Extrakt I 0044. Wechselwirkungen zwischen den Faktoren werden nicht gefunden. Bei der Erstellung von Ergebnis-

funktionen für die Zielgröße  $d_{50}$  der Kompaktate I 0044 und F 0015 werden die Haupteffekte K und S, sowie die Wechselwirkungen KK und SS als statistisch signifikante Terme ( $p < 0,1$ ) berücksichtigt. Die Ergebnisfunktionen für die Zielgröße  $d_{50}$  lauten:

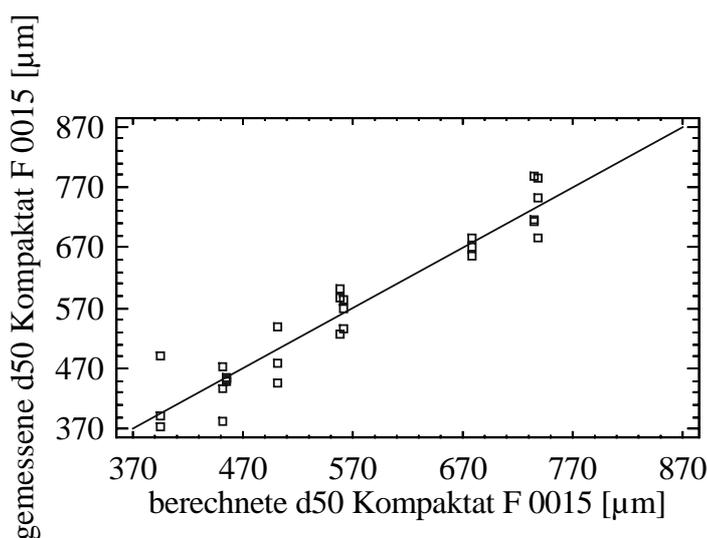
$$Y_{d_{50} \text{ Kompaktat I 0044}}(K, S) = 471,82 + 93,17K + 119,0S - 67,39K^2 + 68,11S^2 \quad \text{Gl. 6.2}$$

$$Y_{d_{50} \text{ Kompaktat F 0015}}(K, S) = 561,82 + 27,78K + 141,61S - 31,89K^2 + 35,28S^2 \quad \text{Gl. 6.3}$$

Die Korrelationskoeffizienten für  $Y_{d_{50} \text{ Kompaktat I 0044}}$  und  $Y_{d_{50} \text{ Kompaktat F 0015}}$  betragen 0,92 und 0,95. In Abb. 6.2 sind die gemessenen Werte für  $d_{50}$  gegen die nach Gl. 6.2 und 6.3 berechneten Werte aufgetragen.



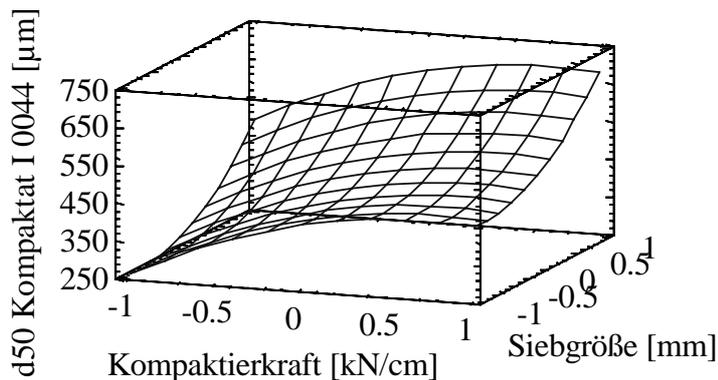
(a)



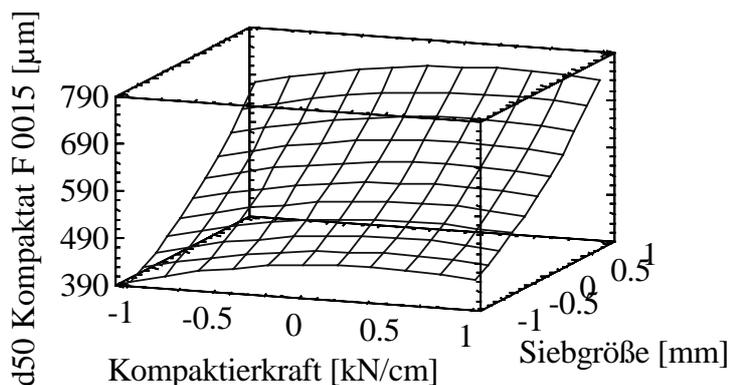
(b)

Abb. 6.2 Gemessene  $d_{50}$ -Werte der Kompaktate (a) I 0044 und (b) F 0015 aufgetragen gegen berechnete  $d_{50}$ -Werte.

Im günstigsten Fall liegen alle Werte auf einer Geraden der Steigung 1. Die Grafik zeigt, dass die Gleichungen die Versuchsergebnisse sehr gut beschreiben. Die mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  der Kompaktate I 0044 und F 0015 ist unabhängig von  $M$  und nicht-linear abhängig von  $K$  und  $S$ . Die Systemantwort-Flächen erstellt für  $M = 2\%$  (Niveau 0) auf der Basis von Gl. 6.2 und 6.3 zeigen, dass die mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  mit steigender Kompaktierkraft  $K$  und Granuliersiebgröße  $S$  zunimmt (Abb. 6.3).



(a)



(b)

Abb. 6.3 Einfluss der Kompaktierkraft und der Siebgröße auf die mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  der Kompaktate (a) I 0044 und (b) F 0015 bei 2 % Magnesiumstearat im Kompaktat (Niveau 0).

Die Systemantwort-Flächen sind aufgrund der quadratischen Terme von  $K$  und  $S$  stark gekrümmt. Obwohl die Kompaktierkraft  $K$  auf die mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  von Kompaktat I 0015 einen größeren Einfluss ausübt als auf die  $d_{50}$ -Werte von Kompaktat

F 0015, beeinflusst die Granuliersiebgröße S die  $d_{50}$ -Werte von Kompaktaten I 0015 und F 0015 am meisten. Die  $d_{50}$ -Werte von Kompaktaten I 0015 und F 0015 nimmt mit steigender Granuliersiebgröße S zu, was selbstverständlich ist und die Richtigkeit des Modells unterstützt. Die  $d_{50}$ -Werte nehmen auch mit steigender Kompaktierkraft K zu. Dies könnte darauf beruhen, dass die Festigkeit der Schülpe mit steigendem K zunimmt, was die Entstehung größerer Partikel beim Zerkleinerungsprozess begünstigt. Gemäß der Modelle  $Y_{d_{50} \text{ Kompaktat I 0044}}$  und  $Y_{d_{50} \text{ Kompaktat F 0015}}$  errechnet sich als Maximum für  $d_{50}$  bei einer Kompaktierkraft F von 10 kN/cm und einer Granuliersiebgröße von 1,25 mm eine mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  von 691  $\mu\text{m}$  bzw. 745  $\mu\text{m}$ . Als Minimum errechnen sich mittlere Partikelgrößen von 691  $\mu\text{m}$  bzw. 745  $\mu\text{m}$  für Kompaktat I 0044 bzw. F 0015 bei  $F = 4 \text{ kN/cm}$  und  $S = 0,8 \text{ mm}$ .

## 6.5 Zerfallszeit

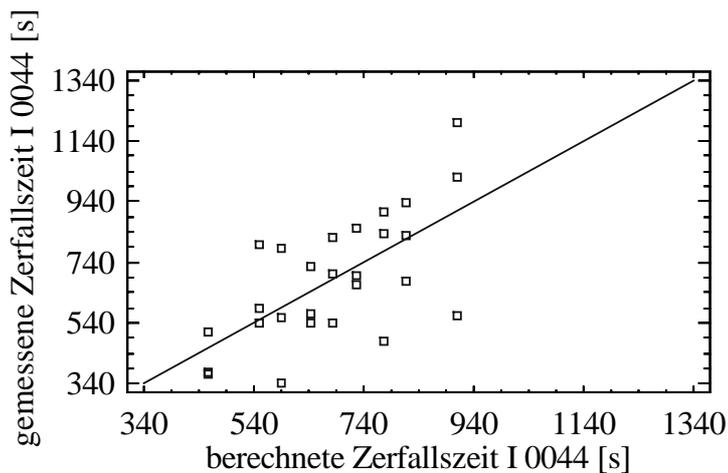
Die Kompaktate werden gemäß Rezepturen Nr. 8, 9 und 12 (Anhang Kapitel 10) zu kompaktathaltigen Tabletten verarbeitet. Wie Tab. 6.3 auf Seite 66 zeigt, hat die Magnesiumstearatkonzentration M den signifikantesten Einfluss ( $p < 0,01$ ) auf die Zerfallszeit der Tabletten I 0044 und F 0015, während die Kompaktierkraft K die Zerfallszeit nur wenig beeinflusst. Der Einfluss der Kompaktierkraft K auf die Zerfallszeit der Tabletten I 0044 ist statistisch signifikant auf dem 5 % Niveau, während ihr Einfluss auf die Zerfallszeit der Tabletten F 0015 nur statistische Signifikanz auf dem 10 % Niveau zeigt.

Die folgenden Ergebnisfunktionen zeigen den Einfluss der unabhängigen Faktoren auf die Zerfallszeit kompaktathaltiger Tabletten I 0044 (Gl. 6.4) und F 0015 (Gl. 6.5). Nur statistisch signifikante Terme ( $p < 0,10$ ) werden berücksichtigt.

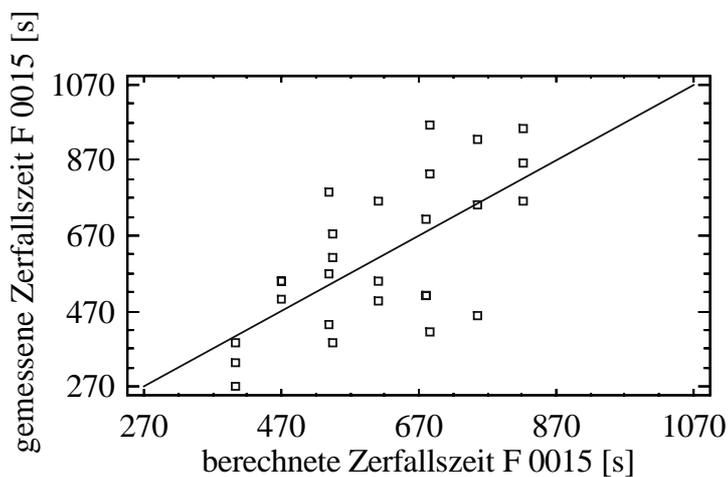
$$Y_{\text{Zerfallszeit Tabletten I 0044}}(M, K) = 683,59 + 134,28M - 92,78F \quad (6.4)$$

$$Y_{\text{Zerfallszeit Tabletten F 0015}}(M, K) = 612,33 + 141,83M - 67,67F \quad (6.5)$$

Die Korrelationskoeffizienten für  $Y_{\text{Zerfallszeit Tabletten I 0044}}$  bzw.  $Y_{\text{Zerfallszeit Tabletten F 0015}}$  betragen 0,43 bzw. 0,44. In Abb. 6.4 sind die gemessenen Zerfallszeiten gegen die nach Gl. 6.4 und 6.5 berechneten Werte aufgetragen.



(a)



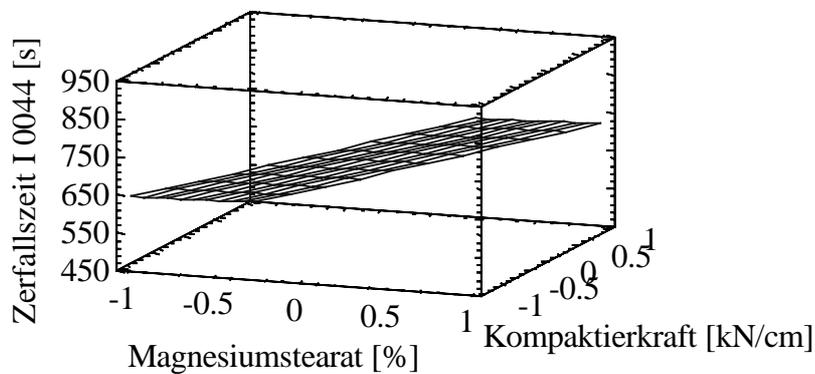
(b)

Abb. 6.4 Gemessene Zerfallszeiten der Tabletten (a) I 0044 und (b) F 0015 aufgetragen gegen berechnete Zerfallszeiten.

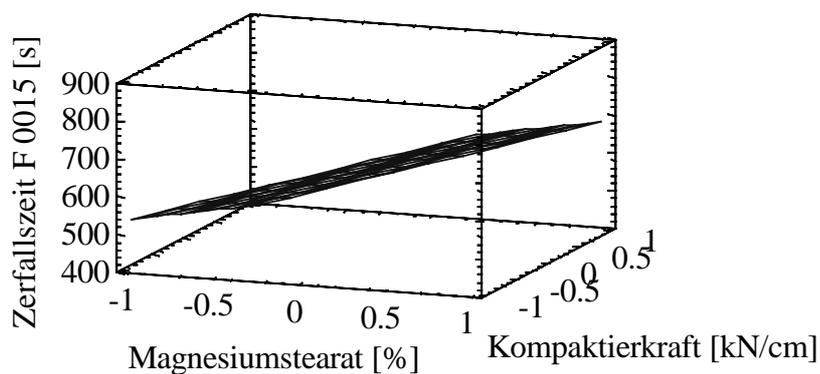
Wie den Graphiken und den Korrelationskoeffizienten zu entnehmen ist, beschreiben Gl. 6.4 und 6.5 die gemessenen Ergebnisse nur ungenügend. Dies ist auf die Vielzahl von Faktoren zurückzuführen, welche die Zerfallszeit beeinflussen, wie die Art des Füllmittels (wasserlöslich oder wasserunlöslich), Art und Konzentration des Sprengmittels und die Presskraft. In der Literatur werden verschiedene Mechanismen des Zerfalls diskutiert, wie Quellung der Partikeln des Sprengmittels, Kapillareffekte in der porösen Tablettenmatrix und die Entwicklung von Sprengkraft durch das Sprengmittel (Gebre-Mariam et al. 1996, Shangraw et al. 1980). Daher können die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren die Zerfallszeit nur ungenügend beschreiben. Des weiteren ist die Messung der Zerfallszeit nach Ph. Eur. bei johanniskrautextrakt-

haltigen Tabletten aufgrund der starken Färbung des Zerfallsmediums mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet.

In Gl. 6.4 und 6.5 ist der Term  $S$  nicht enthalten. Dies zeigt, dass die Zerfallszeit von der Granuliersiebgröße  $S$  unabhängig ist. Die Magnesiumstearatkonzentration  $M$  hat den größten Einfluss auf die Zerfallszeit der Tabletten I 0044 und F 0015. Kompaktierkraft  $K$  beeinflusst die Zerfallszeit ebenfalls, jedoch weniger bei Tabletten F 0015 als bei Tabletten I 0044. Die Systemantwort-Flächen sind auf der Basis von Gl. 6.4 und 6.5 für  $S = 1,00$  mm (Niveau 0) erstellt (Abb. 6.5).



(a)



(b)

Abb. 6.5 Einfluss der Kompaktierkraft und der Siebgröße auf die Zerfallszeit der Tabletten (a) I 0044 und (b) F 0015 bei einer Granuliersiebgröße von 1 mm (Niveau 0).

Abb. 6.5 zeigt, dass die Systemantwort-Flächen ohne lokale Maxima und Minima sind. Die Zerfallszeit ist von der Magnesiumstearatkonzentration  $M$  und der Kompaktierkraft  $K$  linear abhängig, da keine quadratischen Terme in Gl. 6.4 und 6.5 vorliegen. Die Zerfallszeit steigt für Tabletten I 0044 und F 0015 mit zunehmender Magnesiumstearatkonzentration  $M$  und abnehmender Kompaktierkraft  $K$ . Gemäß den Modellen  $Y_{\text{Zerfallszeit Tabletten I 0044}}$  und  $Y_{\text{Zerfallszeit Tabletten F 0015}}$  ergeben sich minimale Zerfallszeiten von 457 s für Tabletten I 0044 und von 402 s für Tabletten F 0015 bei einer Magnesiumstearatkonzentration von 0,5 % und einer Kompaktierkraft  $F$  von 12 kN/cm. Als Maxima werden bei  $M = 3,5$  % und  $F = 4$  kN/cm Zerfallszeiten von 822 s für Tabletten I 0044 und 754 s für Tabletten F 0015 ermittelt. Der Einfluss der Magnesiumstearatkonzentration  $M$  beruht auf dessen physikalisch-chemischen Eigenschaften. Die Hauptaufgabe des Schmiermittels in einer Tablettenrezeptur ist es, die Reibung zwischen Tablettenoberfläche und Matrizenwand während des Kompressions- und Auswurfprozesses zu verringern. In der Tablettiermischung umhüllt das Schmiermittel die einzelnen Partikel mit einem Film, der auch während des Tablettierprozesses weitgehend intakt bleibt (Strickland et al. 1956). Dieser Umhüllungseffekt kann auch die Tablettenoberfläche miteinbeziehen. Strickland et al. (1956) finden des weiteren, dass die Zugabe von Magnesiumstearat zu Granulaten die Zerfallszeit der Tabletten auch bei einer gebräuchlichen Schmiermittelkonzentration von einem 1 % signifikant verlängert. Diese Zunahme der Zerfallszeit könnte auf der Hydrophobizität von Magnesiumstearat beruhen.

Auch für die Zerfallszeit der Tabletten I 0044 und F 0015 wird ein signifikanter Einfluss der Magnesiumstearatkonzentration in der inneren Phase ermittelt. Diese Erhöhung der Zerfallszeit ist jedoch weit geringer als bei einer hohen Magnesiumstearatkonzentration in der äußeren Phase. Rocksloh (1999a) findet bei steigender Magnesiumstearatkonzentration von 0,5 % auf 1 % und von 1 % auf 2 % in der äußeren Phase johanniskrauttrockenextrakthaltiger Tabletten jeweils eine Erhöhung der Zerfallszeit um 10 min. Im Gegensatz dazu ändert sich die Zerfallszeit bei Erhöhung der Magnesiumstearatkonzentration von 0,5 % auf 5,0 % in der inneren Phase der Tabletten nur um 4 min, wie in Kapitel 5 gezeigt wird (Rezepturen Nr. 8 und 11, Anhang Kapitel 10).

Der Einfluss der Kompaktierkraft  $K$  auf die Zerfallszeit könnte darauf beruhen, dass bei geringen Kompaktierkräften vermehrt Feinanteil im Kompaktat vorliegt. Der Feinanteil bildet wie unkompaktiertes Extraktpulver eine Quellungsschicht an der Tablettenoberfläche, die weiteren Wasserzutritt erschwert. Dies könnte zu einer Erhöhung der Zerfallszeit führen, wie es für Extraktpulver in Kapitel 5 beschrieben wird.

## 6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ein 3<sup>3</sup>-Faktorenexperiment wird verwendet, um den Einfluss der drei unabhängigen Prozessvariablen Magnesiumstearatkonzentration, Kompaktierkraft und Granuliersiebgröße auf die mittlere Partikelgröße der Kompaktate I 0044 und F 0015 und die Zerfallszeit der kompaktathaltigen Tabletten I 0044 und F 0015 zu untersuchen.

Die mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  der Kompaktate I 0044 bzw. F 0015 wird durch die unabhängigen Variablen mit Korrelationskoeffizienten von 0,95 bzw. 0,92 gut erklärt. Die  $d_{50}$ -Werte der Kompaktate I 0015 und F 0015 steigen mit zunehmender Granuliersiebgröße, was die Richtigkeit der Modelle unterstützt. Die  $d_{50}$ -Werte nehmen auch mit steigender Kompaktierkraft zu.

Die Ergebnisfunktionen der Zerfallzeit erklären die gemessenen Ergebnisse nur ungenügend. Dies ist auf die Vielzahl von Einflussfaktoren auf die Zerfallszeit zurückzuführen. Die Korrelationskoeffizienten der Ergebnisfunktionen für die Zerfallszeit der Tabletten I 0044 bzw. F 0015 sind mit 0,43 bzw. 0,44 gering. Die Zerfallszeiten der Tabletten betragen nur 5 bis 15 min und steigen nur gering mit zunehmender Magnesiumstearatkonzentration in der inneren Phase und mit steigender Kompaktierkraft. Folglich verringert ein Magnesiumstearatzusatz in der inneren Phase den negativen Einfluss auf die Zerfallszeit im Vergleich zu Magnesiumstearatzusatz in der äußeren Phase erheblich. Zugleich bleibt die Funktionalität von Magnesiumstearat als Schmiermittel erhalten.

# KAPITEL 7

## EXPERIMENTELLER TEIL

### 7.1 Materialien

*Tab. 7.1 Extrakte (94 % Nativanteil / 4 % Lactose D 80 / 2 % Aerosil 200)*

<i>Chargenbezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>	<i>Kurzbezeichnung</i>
Ch.-B.: 98040500	Fa. Müggenburg	M 9845
Ch.-B.: 98060100	Fa. Indena	I 9861
Ch.-B.: 98050200	Fa. Finzelberg	F 9852
Ch.-B.: 97030100	Fa. Indena	I 9731
Ch.-B.: 97020200	Fa. Finzelberg	F 9722
Ch.-B.: 98030100	Fa. Finzelberg	F 9831
Ch.-B.: 00040400	Fa. Indena	I 0044
Ch.-B.: 00010500	Fa. Finzelberg	F 0015

*Tab. 7.2 Standardsubstanzen*

<i>Substanz</i>	<i>Chargenbezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Chlorogensäure TLC		Pharm. Techn. Uni Tübingen
Fructose	Art.-Nr.: 53211 Ch.-B.: K20889221	Fa. Merck
Glucose	Art.-Nr.: 1083375 Ch.-B.: K23442937	Fa. Merck
Hyperforin	95,8 %	Orth (1999)
Hyperforin/Adhyperforin (Sekundärstandard I)	80% / 20%	Fa. Schwabe
Extrakt I 9861 (Sekundärstandard II)	Ch.-B.: 98060100	Fa. Indena
Hypericin HPLC	Ch.-B.: ANT001/4	Fa. Schwabe
Hypericin TLC	Ch.-B.: 06939135	Fa. Roth
Hyperosid CHR	Art.-Nr.: 42151 Ch.-B.: 0601768	Fa. Roth
Hyperosid HPLC	Ch.-B.: 46940549	Fa. Roth

Isoquercitrin HPLC	Ch.-B.: 5092119	Fa. Extrasynthese
Isoquercitrin CHR		Pharm. Techn. Uni Tübingen
Kaffeesäure CHR		Pharm. Techn. Uni Tübingen
Kämpferol CHR		Pharm. Techn. Uni Tübingen
Lactose-Monohydrat	Ch.-B.: 107660	Fa. Merck
Quercetin-Dihydrat purum	Art.-Nr.: 71381 Ch.-B.: 283370	Fa. Roth
Quercetin-Dihydrat HPLC	Ch.-B.: 35939574	Fa. Roth
Quercitrin TLC	Ch.-B.: 74H0210	Fa Sigma
Quercitrin HPLC	Ch.-B.: 14939900	Fa. Roth
Rutin Rotichrom CHR	Ch.-B.: 19523235	Fa. Roth
Rutin-Trihydrat HPLC	Ch.-B.: 45942502	Fa. Roth
Saccharose	Ch.-B.: 107687	Fa. Merck

Tab. 7.3 Lösungsmittel und Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Chargenbezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Blaugel	Ch.-B.: 101925	Fa. Merck
Ethanol	Ch.-B.: 100971	Fa. Merck
Ethylacetat LiChrosolv gradient grade	Art.-Nr.: 100868	Fa. Merck
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Art.-Nr.: 109001 Ch.-B.: 90379983	Fa. Merck
Formamid	Art.-Nr.: 109684	Fa. Merck
Harnstoff	Art.-Nr.: 108487	Fa. Merck
Hautpulver	Ch.-B.: 306 VK	Fa. Filk
Helium 4.6	Art.-Nr.: 0385	Fa. Messer Griesheim
Hydranal-Composite 2	Art.-Nr.: 34806	Fa. Riedel-de Haen
Hydranal-Standard-Natriumtartrat-2- hydrat	Art.-Nr.: 34803	Fa. Riedel-de Haen
Kaliumacetat	Art.-Nr.: 104820	Fa. Merck
Kaliumcarbonat	Art.-Nr.: 104928	Fa. Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Art.-Nr.: 104871 Ch.-B.: A127771918	Fa. Merck
Lithiumchlorid	Art.-Nr.: 56751 Ch.-B.: A675675	Fa. Merck
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Art.-Nr.: 105833	Fa. Merck

Methanol LiChrosolv gradient grade	Art.-Nr.: 106007	Fa. Merck
Natriumhydroxid Rotuli, p. a.	Art.-Nr.: 106498 Ch.-B.: 235C216698	Fa. Merck
Natriumbromid	Art.-Nr.: 106360	Fa. Merck
Natriumchlorid	Art.-Nr.: 1064005 Ch.-B.: K26744400932	Fa. Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Art.-Nr.: 1063455 Ch.-B.: K22700745611	Fa. Merck
Natriumdodecylsulfat	Art.-Nr.: 159717	Fa. Merck
Natriummonohydrogen-phosphat- Dihydrat	Art.-Nr.: 106576 Ch.-B.: K 2149 1376 529	Fa. Merck
Natriumnitrit	Art.-Nr.: 106549	Fa. Merck
Natriumsulfat	Art.-Nr.: 13464 Ch.-B.: 60220	Fa. Riedel-de Haën
Naturstoffreagenz A (2-(Diphenylboryloxy)-ethylamin)	Ch.-B.:159626	Fa. Merck
n-Heptan	Art.-Nr.: 159703	Fa. Merck
n-Hexan	Art.-Nr.: 159635	Fa. Merck
Petroleumbenzin	Art.-Nr.: 101772	Fa. Merck
Phosphorsäure 85%	Art.-Nr.: 159382	Fa. Merck
Polyethylenglycol 4000	Art.-Nr.: 807490 Ch.-B.: 0167119	Fa. Merck
Pufferlösung gebrauchsfertig pH 4,00	Art.-Nr.: 109435	Fa. Merck
Pufferlösung gebrauchsfertig pH 7,00	Art.-Nr.: 109477	Fa. Merck
Pufferlösung gebrauchsfertig pH 9,00	Art.-Nr.: 109461	Fa. Merck
Pyrogallol	Art.-Nr.: 100612 Ch.-B.: K25670112937	Fa. Merck
Salzsäure 37 %, p. a.	Art.-Nr.: 113386	Fa. Merck
Toluol	Art.-Nr.: 159458	Fa. Merck

*Tab. 7.4 Hilfsstoffe zur Tablettierung*

<i>Substanz</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Ac-Di-Sol	Ch.-B.: Ti 46	Fa. FMC Corp./Lehmann & Voss & Co.
Aerosil 200	Ch.-B.: S326030	Fa. Degussa
Avicel PH 101	Ch.-B.: 6629C	Fa. FMC Corp./Lehmann & Voss & Co.

Cab-O-Sil M 5	Ch.-B.: 98080100	Fa. Cabot
Cellactose 80	Ch.-B.: 065	Fa. Meggle
Magnesiumstearat	Ch.-B.: 190151	Fa. Bärlocher
Tablettierhilfsmittel K	Ch.-B.: 94041800	Fa. Merck

Tab. 7.5 *Sonstige Materialien*

<i>Material</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Membranfilter Durapore GV, hydrophil, 0,22 µm Porengröße Ø 47 mm	Art.-Nr.: GVWP 04700	Fa. Millipore
Celluloseacetat- Membranfilter, 0,22 µm Porengröße Ø 25 mm	Art.-Nr.: 11107-25-N	Fa. Sartorius
Celluloseacetat- Membranfilter, 0,45 µm Porengröße Ø 25 mm	Art.-Nr.: 11102-25-N	Fa. Sartorius
Glasfaservorfilter	Art.-Nr.: 13400-25	Fa. Sartorius
Rundfilter (Sorte 595)	Art.-Nr.: 311610	Fa. Schleicher & Schuell
Soxhlet-Hülsen (Sorte 603)	Art.-Nr.: 350242	Fa. Schleicher & Schuell
Vials (für HPLC-Proben)	Art.-Nr.: 218A1103	Fa. Bender & Hobein
Septen (HPLC)	Art.-Nr.: 275A1361	Fa. Bender & Hobein
Schraubkappen mit Loch	Art.-Nr.: 218A1172	Fa. Bender & Hobein
Vials (für Gefriertrocknung)	Art.-Nr.: 24020	Fa. Zscheile & Klinger
Lyophilisationsstopfen	Art.-Nr.: 58695A	Fa. West-Company
Bördelkappen	Art.-Nr.: 73102	Fa. Zscheile & Klinger
Schraubdeckelgefäße 150 ml, Deckel innen aluminiumbeschichtet	-	Fa. Heumann
lipophile Festphasenkartusche Oasis HLB-Plus 225 mg	Art.-Nr.:	Fa. Waters
Anionenaustauscherkartusche Accell Plus QMA 360 mg	Art.-Nr.:	Fa. Waters
Kationenaustauscherkartusche Bond Elut SCX 500 mg	Art.-Nr.:	Fa. Varian

## 7.2 Allgemein verwendete Geräte

Tab. 7.6 Liste der allgemein verwendeten Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Laborwaage Mettler AE 200	Fa. Mettler
Laborwaage Mettler AT 261 Delta Range	Fa. Mettler
Laborwaage Mettler P 1210	Fa. Mettler
Laborwaage Mettler PC 1616	Fa. Mettler
Sonorex Super RK 510 H	Fa. Bandelin
Ultra-Turrax T25	Fa. Janke & Kunkel
Heizbarer Magnetrührer, IKA Combimag RCT	Jahnke & Kunkel, IKA-Labortechnik
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Fa. Heraeus
UV-VIS Spektrometer Lambda 16	Fa. Perkin Elmer
Analysenlampe Fluotest Universal	Fa. Quarzlampengesellschaft
LiChrolut-System	Fa. Merck
Turbula-Mischer T2C	Fa. Bachofen

## 7.3 Datenverarbeitung

Rechner (Fa. Schmelz), Pentium 166 MHz, 32 MB RAM, 2 GB Festplatte.

Tab. 7.7 Liste der allgemein verwendeten Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Beam für Spider 8 (Vers. 3.7a1)	Fa. AMS
Microsoft Word 2000	Fa. Microsoft
Microsoft Excel 2000	Fa. Microsoft
Microsoft Power Point 2000	Fa. Microsoft
Statgraphics plus Version 5 (Testversion)	Fa. Manugistics
UVDM 1.16	Fa. Perkin Elmer
VCH Biblio für Windows, 32 bit-Version	VCH Verlagsgesellschaft
Workstation CLASS-CR10	Fa. Shimadzu

## 7.4 Analytische Verfahren

### 7.4.1 Dünnschichtchromatographie

Die folgende dünnschichtchromatographische Methode wird zur Untersuchung der Extrakte und der Extraktfraktionen eingesetzt.

Gerät:	Glaskammer mit Schliffdeckel (10 x 6 x 15 cm, Fa. Desaga)
Fließmittel:	Ethylacetat/Ameisensäure 98%/Wasser (90/7/9)(V/V)
DC-Platten:	Kieselgel 60 F <sub>254</sub> -HPTLC Fertigplatten, Art.-Nr.: 105642, Fa. Merck
Laufstrecke:	9 cm
Auftragsmenge:	2 µl, Handauftrag, strichförmig
Detektion:	
UV 254:	Fluoreszenzlöschung
Besprühen mit NST- und PEG-Lösung:	Fluoreszenz bei UV 365 nm.

NST: Diphenylborsäure-β-aminoethylester, 1%ig in Methanol (Naturstoffreagenz A)

PEG: Polyethylenglykol 4000, 5%ig in Ethanol 80%.

### 7.4.2 Extraktfraktionierung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Fraktionierung erfolgt in Anlehnung an einen Trennungsgang von Merfort (1990) nach dem in Abb. 7.1 angegebenen Schema.

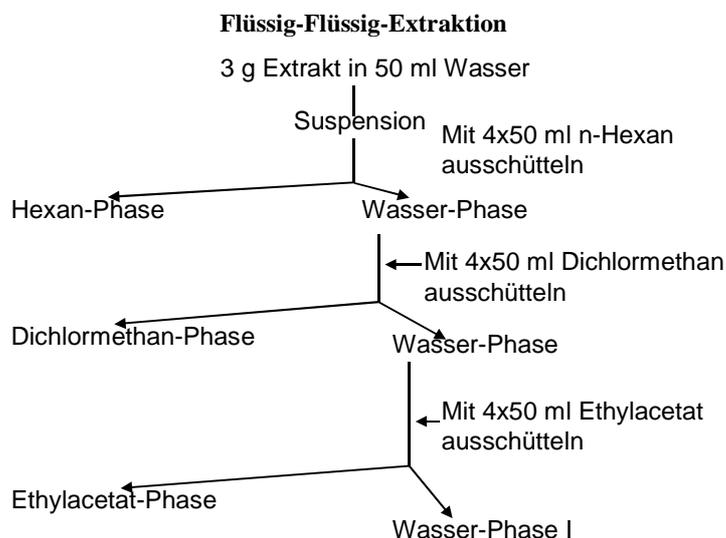


Abb. 7.1 Schematische Darstellung der Extraktfraktionierung durch Ausschütteln.

Ca. 3,0 g Johanniskraut-Trockenextrakt, genau gewogen, werden in 50 ml bidestilliertem Wasser suspendiert. Das Ausschütteln mit den organischen Lösungsmitteln erfolgt in einem 250 ml Scheidetrichter. Jede **organische Phase** wird über

Natriumsulfat getrocknet und über eine Nutsche (Papierfilter) filtriert. Das Natriumsulfat wird jeweils zweimal mit 50 ml Lösungsmittel nachgewaschen. Die Phasen werden im tarierten Rundkolben am Rotavapor eingengt. Nach Trocknung im Exsikkator über Blaugel bis zur Gewichtskonstanz wird die Trockensubstanz gewogen. Die Wasserphase wird durch Stehenlassen bei 60 °C im Trockenschrank drei Tage eingengt und anschließend in 8 ml Wasser mit Ultraschall suspendiert und die Suspension bei 2000 U/min 5 min zentrifugiert. Der Rückstand wird zweimal mit 3 ml Wasser gewaschen und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Die Überstände werden vereinigt und bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach Trocknung im Exsikkator über Blaugel bis zur Gewichtskonstanz wird die Trockensubstanz gewogen.

### 7.4.3 HPLC-Methode zur Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt

Die Bestimmung erfolgt in Anlehnung an ein USP-NF proposal (In-process revision 1998) und Brolis et al. (2000).

#### *Methodenbeschreibung*

Geräte: HPLC-Pumpe 616 mit 600S Controller, Fa. Waters  
 UV-Detektor SPD-6A, Fa. Shimadzu  
 Auto Injector SIL-9A, Fa. Shimadzu  
 Software zur Datenauswertung LC10, Fa Shimadzu

Analytische Säule: 5 µm Vydac C18 (Art.-Nr. 201TP54), Fa. Vydac

Vorsäule: 5 µm Cartridges C18 (Art.-Nr. 201GD54T), Fa. Vydac

Mobile Phase: Gradient aus Wasser-Phosphorsäure 85 %-Gemisch (99,7:0,3 V/V), Acetonitril und Methanol.

Der Gradient ist in Tab. 7.8 dargestellt.

Tab. 7.8 HPLC-Gradient zur Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt

Zeit [min]	Fließmittel		
	Wasser / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> [%]	Acetonitril [%]	Methanol [%]
Äquibrierung	100	0	0
0 - 10	85	15	0
10 - 20	70	20	10
20 - 30	10	75	15
30 - 35	5	80	15
35 - 44	5	80	15
44 - 45	100	0	0
45 - 55	100	0	0

Acetonitril, Ethanol und Wasser-Phosphorsäure 85 %-Gemisch werden einzeln in einen Druckbehälter (Art.-Nr.: SM 1753, Fa. Sartorius) überführt und mit Stickstoffgas unter Druck (2,0 bar) durch eine Edelstahlfiltrationseinheit (Art.-Nr.: SM 15254, Fa. Sartorius) mit Membranfilter (Filtertyp GV, 0,22 µm Porenweite, Fa. Millipore) filtriert. Die Komponenten werden einzeln gewogen und gemischt. Vor und während der Analyse werden die drei Gefäße der Mobilen Phase mit Helium begast.

Flussrate: 1,0 ml/min  
Einspritzvolumen: 20 µl  
Detektion: UV 270 nm (Absorbance 0,08)

### ***Berechnung der relativen Responsefaktoren der Flavonoide und Berechnung des Gesamtflavonoidgehalts***

1,37 mg Hyperosid, 1,56 mg Isoquercitrin, 2,26 mg Quercitrin und 0,91 mg Quercetin werden in 25,0 ml Methanol gelöst und in drei Einzelbestimmungen untersucht. Die relativen Responsefaktoren (RRF) von Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin und Quercetin werden auf Rutin bezogen, welches hier definitionsgemäß den RRF = 1 erhält.

$$\text{RRF} = \frac{\text{AUC}_{\text{Flavonoid}} * \text{Einwaage}_{\text{Rutin}}}{\text{Einwaage}_{\text{Flavonoid}} * \text{AUC}_{\text{Rutin}}} \quad (\text{Gl. 7.1})$$

Nach Gleichung 7.1 wird für die einzelnen Flavonoide der RRF aus je drei Einzelbestimmungen bestimmt und der Mittelwert berechnet. Die Flächenwerte (AUC) des jeweiligen Flavonoids werden durch den RRF dividiert (Berechnung der Rutin-Äquivalente). Der Gesamtflavonoidgehalt eines Extraktes, berechnet als Rutin, ist die Summe aller Rutin-Äquivalente und des bestimmten Rutin-Gehalts.

### ***Standardlösungen und Probenvorbereitung***

#### ***Herstellung der externen Standardlösung (Stammlösung Rutin)***

51,49 mg Rutin-Trihydrat werden in einem 100,0 ml Messkolben in Methanol gelöst (Stammlösung).

#### ***Probenvorbereitung Extrakte***

Ca. 300,0 mg Extrakt, genau gewogen, werden in 100,0 ml Methanol suspendiert, je 3 x 5 min im Ultraschallbad extrahiert, durch einen Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite 0,22 µm, Fa. Sartorius) filtriert und direkt als Probenlösung eingesetzt.

## ***Kalibrierung und Validierung***

### *Linearität Rutin*

0,25, 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 ml Stammlösung Rutin werden mit Methanol ad 25,0 ml aufgefüllt und als Analysenlösungen verwendet. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

### *Linearität Extrakt I 9861*

111,1 mg, 203,3 mg, 307,5 mg, 406,2 mg, 505,8 mg und 600,1 mg Extrakt werden in 100,0 ml Methanol mit Ultraschall 3 x 5 min extrahiert. Nach Filtration durch einen Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite 0,22 µm, Fa. Sartorius) werden je Verdünnung sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

### *Systempräzision Rutin*

41,2 mg Rutin-Trihydrat werden in Methanol gelöst und zwölfmal eingespritzt. Mittelwert und relative Standardabweichung werden berechnet.

### *Systempräzision Extrakt I 9861*

307,5 mg Extrakt werden wie beschrieben vorbereitet und sechsmal eingespritzt. Mittelwert und relative Standardabweichung werden berechnet.

### *Methodenpräzision*

Aus jeweils 300,0 mg Extrakt I 9861 werden dreimal unabhängig voneinander unter identischer Vorgehensweise eine Probe hergestellt, filtriert und in je sechs Einzelbestimmungen analysiert. Aus den Messwerten werden Mittelwert und relative Standardabweichung berechnet.

### *Bestimmungsgrenze*

Es wird das Rauschen des Messverfahrens durch Aufnahme der Basislinie bei der Dämpfung „-2“ (größte Empfindlichkeit des Ausgangssignals) bestimmt. Die mittlere Höhe dieses Signals wird mit 10 multipliziert und über die Kalibriergerade in einen Konzentrationswert umgerechnet (Renger et al. 1994).

### *Erfassungsgrenze*

Es wird das Rauschen des Messverfahrens durch Aufnahme der Basislinie bei der Dämpfung „-2“ (größte Empfindlichkeit des Ausgangssignals) bestimmt. Die mittlere Höhe dieses Signals wird mit 3 multipliziert und über die Kalibriergerade in einen Konzentrationswert umgerechnet (Renger et al. 1994).

#### 7.4.4 HPLC-Methode zur Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeit von Rutin im Freisetzungsmedium

##### *Methodenbeschreibung*

Die Bestimmung erfolgt, wenn nicht anders angegeben, nach der HPLC-Methode zur Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt (siehe 7.4.3).

Geräte: UV-Detektor SPD-6A, Fa. Shimadzu  
 Detektion: UV 270 nm (Absorbance 0,01)  
 Mobile Phase: Gradient aus Wasser-Phosphorsäure 85 %-Gemisch (99,7:0,3 V/V), Acetonitril und Methanol.

Der Gradient ist in Tab. 7.9 dargestellt.

Tab. 7.9 HPLC-Gradient zur Bestimmung von Rutin im Freisetzungsmedium

Zeit [min]	Fließmittel		
	Wasser / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> [%]	Acetonitril [%]	Methanol [%]
Äquilibrierung	100	0	0
0 - 10	85	15	0
10 - 20	70	20	10
20 - 22	10	75	15
22 - 23	100	0	0
23 - 33	100	0	0

Auswertung:

Die Berechnung der Konzentration erfolgt aus dem arithmetischen Mittel dreier Einzelbestimmungen nach der Methode des externen Standards über die Peakfläche von Rutin. Als externer Standard wird Rutin HPLC-grade verwendet.

##### *Standardlösungen und Probenvorbereitung*

###### *Herstellung der externen Standardlösung (Stammlösung Rutin)*

3,1 mg Rutin-Trihydrat werden in einem 250,0 ml Messkolben in Methanol gelöst (Stammlösung).

###### *Probenvorbereitung Auflösungsgeschwindigkeit*

Die dem Freisetzungsmedium entnommenen Proben werden durch einen Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite 0,22 µm, Fa. Sartorius) filtriert und direkt als Probenlösung eingesetzt.

### ***Kalibrierung und Validierung***

#### *Linearität Rutin*

5,0, 10,0, 25,0, 50,0 und 75,0 ml Stammlösung Rutin werden mit Methanol ad 100,0 ml aufgefüllt. Diese Verdünnungen und die Stammlösung werden als Analysenlösungen verwendet. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

#### *Systempräzision Endwert der Auflösung von Extrakt F 0015*

Der Endwert der Auflösung wird zwölfmal bestimmt. Mittelwert und relative Standardabweichung werden berechnet.

#### *Bestimmungsgrenze und Erfassungsgrenze*

Die Bestimmung erfolgt wie für die Bestimmung von Flavonoiden in Extrakten unter Punkt 7.4.3 beschrieben.

### **7.4.5 HPLC-Methode zur Bestimmung von Hyperforin im Extrakt**

#### ***Methodenbeschreibung***

Die Bestimmung von Hyperforin erfolgt nach der von Orth et al. (1999c) beschriebenen Methode.

Geräte:	HPLC-Pumpe LC-6A, Fa. Shimadzu UV-Detektor SPD-6A, Fa. Shimadzu Auto Injector SIL-9A, Fa. Shimadzu Software zur Datenauswertung LC10, Fa Shimadzu
Analytische Säule:	Nucleosil 100/5 RP 18, 250 x 4 mm Art.-Nr.: 721662, Fa. Macherey & Nagel
Vorsäule:	Nucleosil 100/5 RP 18, 4x4 mm Art.-Nr : 721602, Fa. Macherey & Nagel
Mobile Phase	Acetonitril/Wasser (89,5/10,5 [V/V]), mit Phosphorsäure 85 % auf pH 4,5 eingestellt

Acetonitril und Wasser werden einzeln filtriert, gewogen und gemischt, wie für die Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt unter Punkt 7.4.3 beschrieben. Die fertige Mischung wird mit Phosphorsäure 85 % auf pH 4,5 eingestellt.

Flussrate:	1,2 ml/min
Einspritzvolumen:	20 µl
Detektion:	UV 272 nm (Absorbance 0,08)

Auswertung:

Die Berechnung der Konzentration erfolgt aus dem arithmetischen Mittel dreier Einzelbestimmungen nach der Methode des externen Standards über die Peakfläche von Hyperforin. Als externer Standard wird Hyperforin 95,8 % verwendet.

### ***Standardlösungen und Probenvorbereitung***

Wegen der Lichtempfindlichkeit des Hyperforins erfolgt die Analytik unter Lichtschutz (Nahrstedt et al. 1997).

#### *Herstellung der externen Standardlösung (Stammlösung Hyperforin 95,8 %)*

15,45 mg Hyperforin 95,8 % werden in einem 100,0 ml Messkolben in Methanol gelöst und sofort eingesetzt (Stammlösung).

#### *Probenvorbereitung Extrakte*

Ca. 250,0 mg Extrakt, genau gewogen, werden in 100,0 ml Methanol suspendiert, je 3 x 5 min im Ultraschallbad extrahiert, durch einen Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite 0,22 µm, Fa. Sartorius) filtriert und direkt als Probenlösung eingesetzt.

### ***Kalibrierung und Validierung***

#### *Linearität Hyperforin 95,8 %*

0,5, 2,0, 5,0, 10,0 und 20,0 ml Stammlösung Hyperforin 95,8 % werden mit Methanol ad 25,0 ml aufgefüllt und als Analysenlösungen verwendet. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

#### *Linearität Hyperforin/Adhyperforin 80 % / 20% (Sekundärstandard I)*

31,1 mg Hyperforin/Adhyperforin 80/20 werden in einem 100,0 ml Messkolben in Methanol gelöst und sofort eingesetzt (Stammlösung). 0,5, 2,0, 5,0, 10,0 und 20,0 ml Stammlösung Hyperforin werden mit Methanol ad 25,0 ml aufgefüllt. Sechs Einzelbestimmungen werden in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

#### *Linearität Extrakt I 9861 (Sekundärstandard II)*

667,5 mg Extrakt werden in 100,0 ml Methanol mit Ultraschall 3 x 5 min extrahiert. 0,5, 2,0, 5,0, 10,0 und 20,0 ml werden mit Methanol ad 25,0 ml aufgefüllt. Nach Filtration durch einen Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite 0,22 µm, Fa. Sartorius) werden je Verdünnung sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

### *Systempräzision Hyperforin*

Eine Hyperforin-Standardlösung (7,6 mg / 100,0 ml) wird zwölfmal eingespritzt. Es werden Mittelwert und relative Standardabweichung berechnet.

### *Systempräzision Extrakt I 9861*

261,3 mg Extrakt werden wie beschrieben vorbereitet und zwölfmal eingespritzt. Es werden Mittelwert und relative Standardabweichung berechnet.

### *Methodenpräzision*

Aus jeweils ca. 250,0 mg Extrakt I 9861, genau gewogen, werden sechsmal unabhängig voneinander unter identischer Vorgehensweise eine Probe hergestellt, filtriert und in je sechs Einzelbestimmungen analysiert. Aus den Messwerten werden Mittelwert und relative Standardabweichung berechnet.

### *Bestimmungsgrenze und Erfassungsgrenze*

Die Bestimmung erfolgt wie für die Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt unter Punkt 7.4.3 beschrieben.

## **7.4.6 HPLC-Methode zur Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeit von Hyperforin in Freisetzungsmedium**

### ***Methodenbeschreibung***

Die Bestimmung erfolgt, wenn nicht anders angegeben, nach der HPLC-Methode zur Bestimmung von Hyperforin im Extrakt (siehe 7.4.5) mit folgenden Änderungen:

Geräte: UV-Detektor SPD-6A, Fa. Shimadzu

Detektion: UV 272 nm (Absorbance 0,005)

### ***Probenvorbereitung***

#### *Probenvorbereitung Auflösungsgeschwindigkeit*

Die dem Freisetzungsmedium entnommenen Proben werden durch einen Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite 0,22 µm, Fa. Sartorius) filtriert und direkt als Probenlösung eingesetzt.

#### *Probenvorbereitung Extrakte*

225,0 mg Extrakt werden in 100,0 ml Methanol suspendiert, je 3 x 5 min im Ultraschallbad extrahiert, durch einen Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite 0,22 µm, Fa. Sartorius) filtriert und direkt als Probenlösung eingesetzt.

### ***Kalibrierung und Validierung***

#### *Linearität der externen Standardlösung*

62,5, 186,9, 383,3, 563,2, 751,0, 937,4 und 1125,2 mg Sekundärstandard II (Extrakt I 9861, gelagert bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Hyperforingehalt 3,8 %) werden in je 100,0 ml Methanol suspendiert und mit Ultraschall 3 x 5 min extrahiert. Nach Filtration durch einen Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ , Fa. Sartorius) werden je Verdünnung sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

#### *Bestimmungsgrenze und Erfassungsgrenze*

Die Bestimmung erfolgt wie für die Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt unter Punkt 7.4.3 beschrieben.

### **7.4.7 HPLC-Methode zur Bestimmung von Gesamthypericin im Extrakt**

#### ***Methodenbeschreibung***

Geräte:	HPLC-Pumpe 616 mit 600S Controller, Fa. Waters UV-Detektor SPD-6A, Fa. Shimadzu Auto Injector SIL-9A, Fa. Shimadzu Software zur Datenauswertung LC10, Fa Shimadzu
Analytische Säule:	Nucleosil 100/5 RP 18, 125 x 4 mm Art.-Nr.: 402003D, Fa. Macherey & Nagel
Vorsäule:	Nucleosil 100/5 RP 18, 4x4 mm Art.-Nr.: 721602, Fa. Macherey & Nagel
Mobile Phase:	MeOH/EtOAc/ Phosphatpuffer pH 2,1 (36/10/12 [V/V]) (Anlehnung an die Methode nach Schütt et al. 1994)

Phosphatpufferherstellung: 6,9 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  ad 500,0 ml bidestilliertes Wasser, mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% auf pH 2,1 eingestellt.

Methanol, Ethylacetat und die Phosphatpufferlösung werden einzeln filtriert, gewogen und gemischt, wie für die Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt unter Punkt 7.4.3 beschrieben.

Flussrate:	1,2 ml/min
Einspritzvolumen:	20 $\mu\text{l}$
Detektion:	UV 590 nm (Absorbance 0,04)

Auswertung: Die Berechnung der Konzentration erfolgt aus dem arithmetischen Mittel dreier Einzelbestimmungen nach der Methode des externen Standards

über die Peakfläche von Hypericin und Pseudohypericin. Als externer Standard wird Hypericin HPLC-grade verwendet.

### ***Standardlösungen und Probenvorbereitung***

#### *Herstellung der externen Standardlösung (Stammlösung Hypericin HPLC-grade)*

5,25 mg Hypericin HPLC-grade werden in einem 100,0 ml Messkolben in Methanol gelöst (Stammlösung).

#### *Probenvorbereitung Extrakte*

Ca. 250,0 mg Extrakt, genau gewogen, werden in 100,0 ml Methanol suspendiert, je 3 x 5 min im Ultraschallbad extrahiert, durch einen Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite 0,22 µm, Fa. Sartorius) filtriert und direkt als Probenlösung eingesetzt. Die Probenlösungen werden vor der Analyse 15 min dem Tageslicht ausgesetzt.

### ***Kalibrierung und Validierung***

#### *Linearität Hypericin*

1,0, 2,0, 5,0, 10,0, und 25,0 und 50,0 ml Stammlösung Hypericin HPLC-grade werden mit Methanol ad 100,0 ml aufgefüllt. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

#### *Systempräzision Hypericin*

Eine Hypericin-Standardlösung (0,52 mg / 100,0 ml) wird zwölfmal eingespritzt. Mittelwert und relative Standardabweichung werden berechnet.

#### *Systempräzision Extrakt I 0044*

501,6 mg Extrakt werden wie beschrieben vorbereitet und zwölfmal eingespritzt. Mittelwert und relative Standardabweichung werden berechnet

#### *Methodenpräzision*

Aus jeweils ca. 500,0 mg Extrakt F 0015, genau gewogen, werden dreimal unabhängig voneinander unter identischer Vorgehensweise eine Probe hergestellt, filtriert und in je sechs Einzelbestimmungen analysiert. Aus den Messwerten werden Mittelwert und relative Standardabweichung berechnet.

#### *Bestimmungsgrenze und Erfassungsgrenze*

Die Bestimmung erfolgt wie für die Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt unter Punkt 7.4.3 beschrieben.

#### **7.4.8 HPLC-Methode zur Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeit von Hypericin im Freisetzungsmedium**

##### ***Methodenbeschreibung***

Die Bestimmung erfolgt, wenn nicht anders angegeben, nach der HPLC-Methode zur Bestimmung von Gesamthypericin im Extrakt (siehe 7.4.5) mit folgenden Änderungen:

Geräte: Fluoreszenzdetektor RF-530, Fa. Shimadzu

Detektion: Anregungswellenlänge: 470 nm  
Emissionswellenlänge: 590 nm

Auswertung:

Die Berechnung der Konzentration erfolgt aus dem arithmetischen Mittel dreier Einzelbestimmungen nach der Methode des externen Standards über die Peakfläche von Hypericin. Als externer Standard wird Hypericin HPLC-grade verwendet.

##### ***Standardlösungen und Probenvorbereitung***

*Herstellung der externen Standardlösung (Stammlösung Hypericin HPLC-grade)*

1,3 mg Hypericin HPLC-grade werden in einem 100,0 ml Messkolben in Methanol gelöst. 25,0 ml dieser Stammlösung werden mit Methanol ad 250,0 ml aufgefüllt (Stammlösung).

*Probenvorbereitung Extrakt*

Ca. 75,0 mg Extrakt, genau gewogen, werden in 100,0 ml Methanol suspendiert und aufbereitet wie unter Punkt 7.4.5 beschrieben.

##### ***Kalibrierung und Validierung***

*Linearität Hypericin*

3,0, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0 und 75,0 ml der Stammlösung Hypericin werden mit Methanol ad 100,0 ml aufgefüllt. Von der Verdünnung „3,0 ml ad 100,0 ml“ werden 25,0 und 50,0 ml mit Methanol je ad 100,0 ml aufgefüllt. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

*Systempräzision Endwert der Auflösung von Extrakt F 0015*

Der Endwert der Auflösung wird zwölfmal bestimmt. Mittelwert und relative Standardabweichung werden berechnet.

*Bestimmungsgrenze und Erfassungsgrenze*

Die Bestimmung erfolgt wie für die Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt unter Punkt 7.4.3 beschrieben.

**7.4.9 HPLC-Methode zur Bestimmung der Zucker***Methodenbeschreibung*

Geräte:	HPLC-Pumpe 616 mit 600S Controller, Fa. Waters Brechungsindex-Detektor RID-10 A, Fa. Shimadzu Temperatur der Messzelle 40°C Auto Injector SIL-9A, Fa. Shimadzu Software zur Datenauswertung LC10, Fa Shimadzu
Analytische Säule:	CC 250/4 Nucleosil 100-3 NH <sub>2</sub> , 250 x 4 mm Art.-Nr.: 721120, Fa. Macherey & Nagel
Vorsäule:	CC 8/4 Nucleosil 100-3 NH <sub>2</sub> , 8x4 mm Art.-Nr.: 721122, Fa. Macherey & Nagel
Säulenofen:	BFO-04svnlf, Fa. W.O.Electronics
Mobile Phase	Acetonitril/Wasser (75/25 [V/V]), mit Phosphorsäure 85% auf pH 3,5 eingestellt

Acetonitril und Wasser werden einzeln filtriert, gewogen und gemischt, wie für die Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt unter Punkt 7.4.3 beschrieben. Die fertige Mischung wird mit Phosphorsäure 85% auf pH 3,5 eingestellt.

Flussrate:	0,7 ml/min
Einspritzvolumen:	20 µl
Detektion:	refraktometrisch
Auswertung:	

Die Berechnung der Konzentration erfolgt aus dem arithmetischen Mittel dreier Einzelbestimmungen nach der Methode des externen Standards über die Peakfläche der entsprechenden Zucker.

*Standardlösungen und Probenvorbereitung**Herstellung der externen Standardlösungen*

605,2 mg Fructose, 603,9 mg Glucose, 609,3 mg Saccharose und 639,1 mg Lactose-Monohydrat werden in einem 100,0 ml Messkolben in Wasser frisch gelöst (Stammlösung).

### *Probenvorbereitung Extrakte*

Ca. 250,0 mg Extrakt, genau gewogen, werden in 10,0 ml Wasser suspendiert und in einem 100 ml Becherglas für 2 min mit einem Ultraturrax bei 8000 U/min extrahiert und danach für 5 min auf einem Magnetrührer gerührt. Die Suspension wird 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird durch einen Glasfaservorfilter filtriert. Das Filtrat wird mittels Festphasenextraktion wie folgt gereinigt.

Eine lipophile Festphasenkartusche Oasis HLB-Plus 225 mg (Fa. Waters) wird mit 5 ml Methanol und 5 ml Wasser konditioniert. Eine Anionenaustauscherkartusche Accell Plus QMA 360 mg (Fa. Waters) und zwei Kationenaustauscherkartuschen Bond Elut SCX 500 mg (Fa. Varian) werden in Serie geschaltet und mit 5 ml Wasser konditioniert. Die Oasis HLB-Plus wird auf das oben genannte Kartuschensystem gesteckt. Die Probe wird mit Hilfe einer 10 ml Spritze und eines LiChrolut-Systems (Fa. Merck) durch die vier Kartuschen gegeben. Die Kartuschen werden mit 2 ml Wasser gewaschen. Die gereinigte Probe wird mit 1N NaOH neutralisiert und gefriergetrocknet. Die getrocknete Probe wird in 2,0 ml Wasser gelöst, durch einen Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite 0,22 µm, Fa. Sartorius) filtriert und als Probenlösung eingesetzt.

### ***Kalibrierung und Validierung***

#### *Linearität*

2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 ml Stammlösung werden mit Wasser ad 25,0 ml aufgefüllt und als Analysenlösungen verwendet. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

#### *Systempräzision*

Je 370 mg Fructose, Glucose, Saccharose und Lactose-Monohydrat, genau gewogen, werden in 100,0 ml Wasser gelöst und zwölfmal eingespritzt.

#### *Systempräzision Extrakt I 9731*

250 mg Extrakt, genau gewogen, werden wie beschrieben vorbereitet und zwölfmal eingespritzt.

### *Methodenpräzision*

Aus jeweils 200,0 mg Extrakt M 9845 werden sechsmal unabhängig voneinander unter identischer Vorgehensweise eine Probe hergestellt, filtriert und in je sechs Einzelbestimmungen analysiert. Aus den Messwerten werden Mittelwert und relative Standardabweichung berechnet.

### *Wiederfindung*

501,9 mg Fructose, 502,6 mg Glucose, 504,2 mg Saccharose und 500,3 mg Lactose-Monohydrat werden mit Wasser ad 100,0 ml aufgefüllt. Je 1,0 ml dieser Lösung wird zu 100,2 mg, 100,1 mg und 100,2 mg Extrakt M 9845 gegeben. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie die Probenvorbereitung der Extrakte. Es werden drei Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt und Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

### *Bestimmungsgrenze und Erfassungsgrenze*

Die Bestimmung erfolgt wie für die Bestimmung von Flavonoiden im Extrakt unter Punkt 7.4.3 beschrieben.

#### **7.4.10 Bestimmung der Gerbstoffe**

Die Bestimmung der Gerbstoffe erfolgt nach Ph. Eur. Nachtrag 2001. Es werden 250,0 mg Extrakt eingesetzt und der Mittelwert aus drei Einzelbestimmungen gebildet.

#### **7.4.11 Bestimmung des Aschegehaltes**

Die Bestimmung des Aschegehaltes erfolgt nach Ph. Eur. 1997.

#### **7.4.12 Bestimmung von Gesamtprotein**

Der Stickstoffgehalt der Extrakte wird durch Elementaranalyse (Vario EL 2, Fa. Elementar Analysensysteme) bestimmt. Zur Abschätzung des Gesamtproteingehaltes dient gemäß den Angaben der Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995) ein Umrechnungsfaktor von 6,25.

#### **7.4.13 Bestimmung der organischen Säuren**

Citronensäure und Äpfelsäure werden mittels HPLC bestimmt (Schiller et al., in Vorbereitung). Nach Trennung an einer Kationenaustauscher-Phase (Aminex HPX-87

H, Fa. Bio-Rad Labs) erfolgt die Detektion mittels Lichtstreuendetektion (ELSD 2000, Fa. Alltech).

#### 7.4.14 Bestimmung der lipophilen Inhaltsstoffe

Der Gehalt an lipophilen Inhaltsstoffen wird mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit n-Hexan bestimmt wie unter Punkt 7.4.2 beschrieben.

#### 7.4.15 Wassergehalt nach Karl-Fischer

##### *Geräte und Reagenzien*

Zentraleinheit:	SM-Titrino 702, Fa. Metrohm
Titrierstand:	03 Ti Stand, Fa. Metrohm
Solvens:	Methanol gradient grade / Formamid 2:1 [V/V])
Titrans:	Hydranal Composite 2
Standard:	Hydranal-Standard Natriumtartrat-2-hydrat, Fa. Riedel-de Haen
Einstellungen	Titrationendpunkt: 210 mV Beginn des Regelbereiches: 250 mV Maximaldosierrate: 3,0 ml/min Stopkriterium: Drift Arbeitstemperatur: 23°C I (pol): 40 µA

##### *Titerbestimmung und Titrationen:*

Vor Titrationsbeginn werden ca. 20,0 mg Natriumtartrat-2-hydrat (enthält 15,66% Kristallwasser) eingewogen und der Titer des Hydranal-Composite 2 durch Dreifachbestimmung ermittelt. Die Extrakteinwaage (ca. 70,0 mg Extraktzubereitung) wird so gewählt, dass eine ausreichende Menge Titrans verbraucht wird. Vor Titrationsbeginn wird der Extrakt 60 s mit einem Ultra-Turrax bei ca. 13500 U/min dispergiert. Mittelwert und Standardabweichung werden aus jeweils drei Einzelbestimmungen ermittelt.

#### 7.4.16 pH-Wert

Gerät: pH-Meter 632 (temperaturkompensiert), Fa. Metrohm

##### *Kalibrierung:*

Die Kalibrierung erfolgt nach der Methode der 2-Punkt Kalibrierung. Das Gerät wird vor jeder Messung, je nach erwartetem pH-Wert, mit Pufferlösungen von pH 4,00, pH 7,00 oder pH 9,00, alle Fa. Merck, kalibriert.

*Probenlösungen:*

Es werden die in Tab. 7.3 beschriebenen, auf einen definierten pH-Wert eingestellten bzw. gepufferten Lösungen direkt vermessen.

**7.4.17 Kurzzeitwasseraufnahme und Sorptionsisothermen der Extrakte**

Die Messungen werden bei definierter relativer Feuchtigkeit und einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Als Hygrostatenflüssigkeiten werden gesättigte Lösungen der folgenden Salze (Hygrostatenflüssigkeiten) verwendet: Natriumhydroxid (7 % r. F.), Lithiumchlorid (12 % r. F.), Kaliumacetat (20 % r. F.), Magnesiumchlorid (33 % r. F.), Kaliumcarbonat (44 % r. F.), Natriumbromid (59 % r. F.), Natriumnitrit (65 % r. F.), Natriumchlorid (75 % r. F.). Die Salze werden unter ständigem Rühren in 250 g demineralisiertem Wasser von 50 °C solange gelöst, bis sich ein Bodensatz bildet. Nach ca. acht Stunden wird die Salzsuspension unter leichtem Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt. Vor jeder Verwendung wird die Hygrostatenflüssigkeit kurz durchgerührt und die über der Flüssigkeitsoberfläche herrschende relative Luftfeuchte mit einem Feuchtemessgerät (Ventilatorsonde DK 159, Anzeigeeinheit HMI 32 (Fa. Vaisala)) kontrolliert.

Die Messung der Kurzzeitwasseraufnahme der Extrakte erfolgt mit einem Prozess-Tensiometer K12 (Fa. Krüss). Die Probe wird auf eine runde Teflonscheibe aufgebracht, die an der Wägeeinrichtung des Tensiometers befestigt ist. Diese Teflonscheibe taucht in einen abgeschlossenen auf 20 °C thermostatisierten Probenraum ein, in dem zuvor mit der Hygrostatenflüssigkeit die gewünschte relative Feuchte eingestellt wurde. Die automatische Messwerverfassung erfolgt mit einem Computer (IBM PS II/Modell 50). Dabei wird ein Makroprogramm innerhalb der Messwerverfassungssoftware K 121 verwendet. Eine genaue Beschreibung der Messeinrichtung und der Auswertung gibt Braun (1995).

**7.5 Gefriertrocknung**

Gerät: Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT 2, Fa. Finn Aqua  
Julabo Kälte-Umwälzthermostat FP 50-MH, Fa. Julabo  
Leybold Vakuumpumpe Trivac D8B, Fa. Leybold  
Trocknungsparameter: Einfrieren bei -70°C (extern), Kälteanlage Typ 6385, Fa. GFL

Kondensatortemperatur:  $-50^{\circ}\text{C}$

Temperaturprogramm:

Zeit [h]	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Druck [hPa]
0-5	-30	$3,5 \times 10^{-2}$
5-10	-25	$3,5 \times 10^{-2}$
10-15	-20	$3,5 \times 10^{-2}$
15-20	-15	$3,5 \times 10^{-2}$
20-24	-10	$3,5 \times 10^{-2}$
24-38	-5	$3,5 \times 10^{-2}$
38-43	10	$2,0 \times 10^{-1}$
43-48	20	$2,0 \times 10^{-1}$

## 7.6 Kompaktierung

### 7.6.1 Funktionsweise des GMP Mini-Pactor

Der GMP Mini-Pactor der Firma Gerteis (Jona, Schweiz) ist eine automatische Trockengranulieranlage für den Labormaßstab. Er ist aus der Produktzuführung, der Kompaktier- und der Granuliereinheit aufgebaut (Abb. 7.2 und 7.3).

Die nachfolgende Tab. 7.10 gibt die für den Betrieb typischen Leistungsdaten sowie deren Grenzwerte an:

Tab. 7.10 *Typische Leistungsdaten und Grenzwerte des GMP Mini-Pactors*

<i>Parameter:</i>	<i>Min./Max.</i>	<i>Typisch<sup>*)</sup></i>
Drehzahl Dosierschnecke	0 / 750 U/min	60 U/min
Drehzahl Stopfschnecke	0 / 750 U/min	80 U/min
Kraft	0.5 / 20 kN/cm	10 kN/cm
Spaltbreite	0.8 / 6 mm	3 mm
Drehzahl Presswalzen	0 / 30 U/min	10 U/min
Drehzahl Granulator im Uhrzeiger- sowie im Gegenuhrzeigersinn	0 / 180 U/min	60 U/min
Drehwinkel Granulator im Uhrzeiger- sowie im Gegenuhrzeigersinn	0 / 720	CW 120 CCW 125
Anzahl Zusatzumdrehungen des Granulator im Uhrzeiger- sowie im Gegenuhrzeigersinn	0 / 999	0
Kapazität: (Lactose)	15...100 kg/Std	50 kg/Std

\*) Angaben des Herstellers

## 7.6.2 Kompaktierung mit dem GMP Mini-Pactor

### *Herstellung der Kompaktiermischung*

Der Extrakt wird vorgelegt und das Schmiermittel wird durch ein Sieb der Maschenweite 300  $\mu\text{m}$  aufgedudert. Anschließend wird die Mischung 5 min im Turbula-Mischer (Fa. Bachofen) bei 42 U/min gemischt.

### *Kompaktierung*

Die Mischung wird in den Dosiertrichter gefüllt und der Kompaktor entsprechend der am PLC (Programmable Logic Controller) vorgenommenen Einstellungen gestartet. Das zu granulierende Material wird aus dem Dosiertrichter ((1) in Abb. 7.2 und 7.3) mit Hilfe der Dosierschnecke (2) zur Stopfschnecke (3) gefördert. Der Dosiertrichter ist mit einem Auflockerer versehen, um eine konstante Füllung der Dosierschnecke zu gewährleisten. Die Stopfschnecke fördert das Material in den Einzugsbereich der Presswalzen (4) und (5) in Abb. 7.2 – 7.4. Hierbei erfolgt eine Verteilung des Pulvers über die gesamte Walzenbreite unter kontrollierter Vorverdichtung des Materials. Die Entlüftung des verdichteten Materials wird dabei über Sintermetallfilter (enthalten im Herzstück (6)) gewährleistet, die das Pulver zurückhalten.

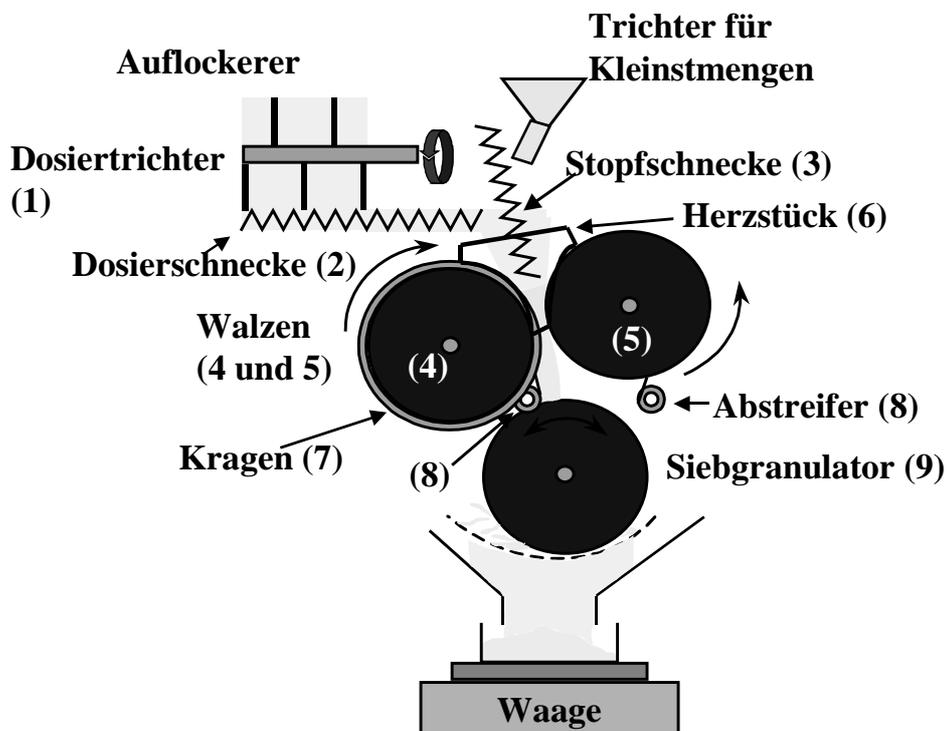


Abb. 7.2 Skizze des GMP Mini-Pactor.

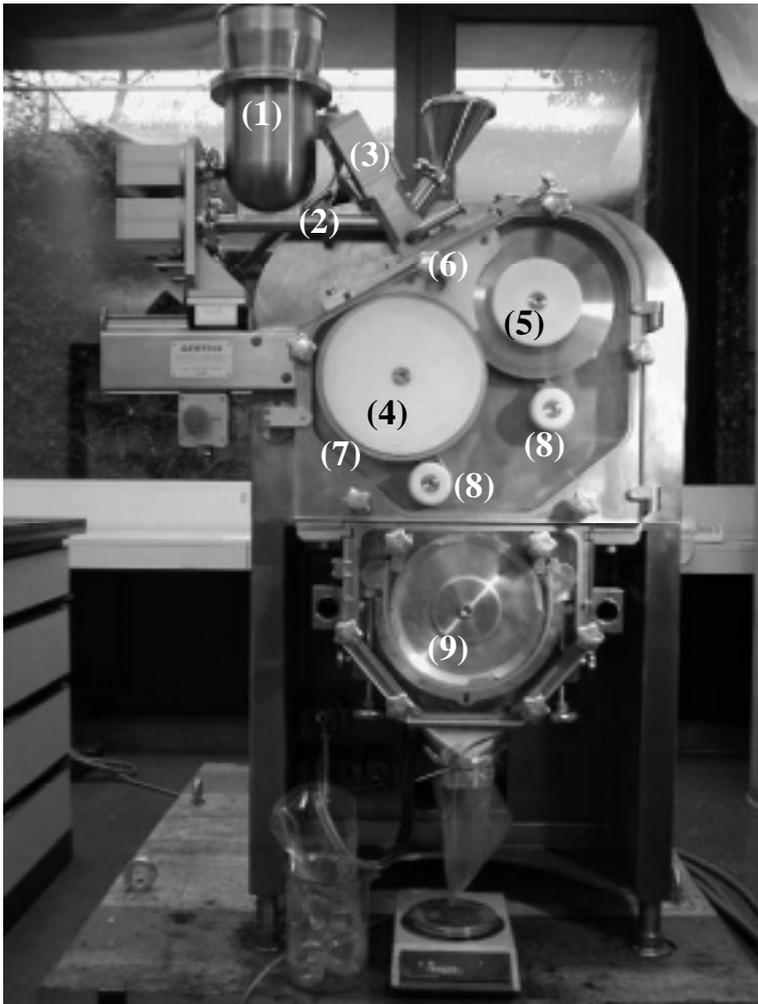


Abb. 7.3. Frontansicht des GMP Mini-Pactor.

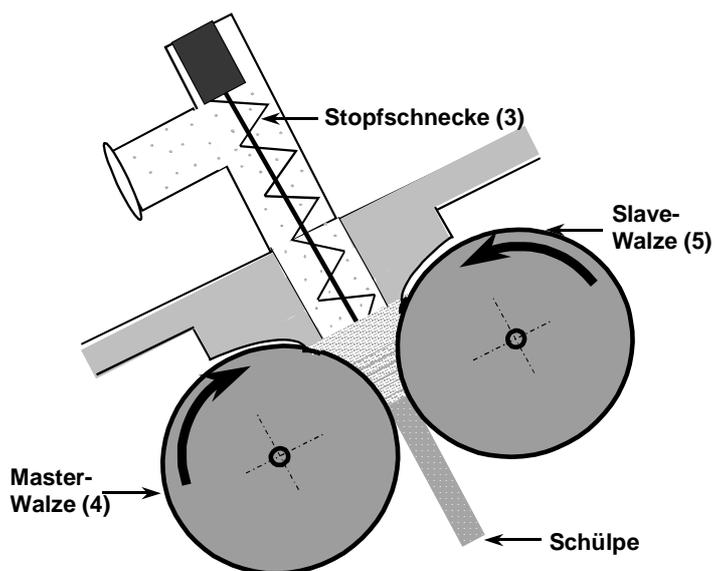


Abb. 4 Detail der Kompaktierzone.

Die Spaltbreite wird durch die Förderleistung der drehzahlgeregelten Stopfschnecke konstant gehalten. Diese sorgt auch bei ungleichmäßiger Produktzufuhr für einen konstanten Materialfluss. Die Drehzahl der Dosierschnecke wird über ein wählbares Verhältnis zur Drehzahl der Stopfschnecke kontrolliert. Die Regelung der gewünschten Spaltbreite über die Stopfschneckendrehzahl erfolgt mittels PID-Regler. Die endgültige Entlüftung und Kompaktierung findet zwischen den Walzen statt. Die Presswalzen sind unabhängig voneinander angetrieben und drehen mit derselben Geschwindigkeit gegeneinander. Eine Walze, die Masterwalze (4), ist fixiert, während die zweite Walze, die Slavewalze (5), beweglich gelagert ist. Dies gestattet eine Anpassung des Spaltes während des Kompaktierprozesses. Eine Hydraulik presst die bewegliche Walze gegen die fixierte Walze. Die eingestellte Kraft wird durch die Hydraulik geregelt. Seitenplatten aus Delrin decken die Zone über den Walzen bis zur Kompaktierzone ab (Herzstück (6)). Auf diese Weise kann das Pulver bei der Vorverdichtung nicht ausweichen. Die Menge an Pulver, die unkompaktiert an den Walzen vorbei rieselt, wird reduziert. Zwei seitlich an der Masterwalze (4) befindliche Kragen (7) sorgen für eine gleichmäßige Kraftverteilung (Funakoshi 1977) und somit eine homogene Porosität der Schülpe (Shlieout 2000). Das kompaktierte Material (Schülpe) wird durch Abstreifer (8) von Master- und Slavewalze getrennt und der Granuliereinheit zugeführt. Die Granulation erfolgt durch einen Siebgranulator (9). Der Granulator besteht aus zwei Statorleisten, einem austauschbaren Rotor, einem austauschbaren Granuliersieb und dem Granulatausfluss. Die Maschineneinstellungen und Prozessparameter der Kompaktierung sind in Tab. 7.11 dargestellt.

*Tab. 7.11 Maschineneinstellungen und Prozessparameter der Kompaktierung*

<i>Parameter</i>	<i>Einstellungen</i>
Presskraft	4, 8, 12, 16, 20 kN/cm
Spaltbreite	2 mm
Walzen	geriffelte Oberfläche; 2 U/min
Granulator	Taschenmuldenrotor; oszillierender Betrieb, (90 U/min, 180° im Uhrzeigersinn, 150° entgegen Uhrzeigersinn)
Siebgröße	0,8, 1,0, 1,25 mm

## 7.7 Pulvertechnologische Methoden

### 7.7.1 Extraktcharakterisierung

#### *Partikelgrößenanalyse der Extraktpulver*

Zur Ermittlung der Korngrößenverteilung wird ein Laserbeugungsspektrometer Mastersizer 2000 (Fa. Malvern) verwendet, das nach dem Prinzip der Mie-Streuung arbeitet (verwendeter Brechungsindex 1,52, Absorption 0,1). Das integrierte optische System umfasst den Partikelgrößenbereich zwischen 0,02  $\mu\text{m}$  und 2000  $\mu\text{m}$ . Die Datenerfassung erfolgt mit der mitgelieferten Erfassungssoftware auf einem Computer. Vor Beginn jeder Messung mit einer Messdauer von 60 s wird eine Hintergrundmessung von 65 s durchgeführt. Dazu wird eine Messung ohne Produkt bei eingeschalteter Absaugung durchgeführt. Die ermittelte Intensität wird nach dem Vermessen der Proben rechnerisch eliminiert.

Die Probenaufgabe erfolgt mit der Trockendispergiereinheit Scirocco 2000 (Fa. Malvern). Die Messungen werden bei einem Dispersionsluftdruck von 1 bar und einer Vibrationszufuhr rate der Rüttelrinne von 40 % durchgeführt.

#### *Böschungswinkel der Extraktpulver*

Der Böschungswinkel der Extraktpulver wird mit der Sieb-Kegel-Methode bestimmt und berechnet sich nach der Formel  $\tan \alpha = h/r$ . Dazu werden 50 g Extrakt durch ein quadratisches Sieb der Maschenweite 1,0 mm auf einen massiven Zylinder ( $r$  25 mm) aufgesiebt, bis die Höhe des Schüttkegels konstant bleibt. Das Sieb wird 30 mm über der Kegelspitze befestigt und der Vorgang dreimal wiederholt. Der Mittelwert der Schüttkegelhöhe ( $h$ ) wird in die oben genannte Formel eingesetzt.

#### *Hausnerfaktor der Extraktpulver*

Der Hausnerfaktor (HF) wird nach der Formel  $\text{HF} = \text{Stampfdichte} / \text{Schüttdichte}$  errechnet. Die Bestimmung von Stampfdichte und Schüttdichte erfolgt mit 50 g Einwaage gemäß Ph. Eur. 1997 (V 2.9.15) mit einem Stampfvolumeter JET ST 2 (Fa. Engelsmann). Es wird der Mittelwert aus drei Bestimmungen gebildet.

### **7.7.2 Charakterisierung der Kompaktate**

#### ***Probenteilung***

Die Probenteilung der Kompaktate erfolgt mit einem Riffelteiler der Abmessungen 160 mm x 47 mm und einer Riffelbreite von 6 mm (Werkstatt des Pharmazeutischen Institutes Tübingen, Herr K.-H. Geiger).

#### ***Partikelgrößenanalyse der Kompaktate***

Die Partikelgrößenanalyse erfolgt gemäß Punkt 7.7.1 bei einem Dispersionsluftdruck von 1 bar und einer Vibrationszufuhr rate der Rüttelrinne von 85 % - 95 %.

#### ***Böschungswinkel der Kompaktate***

Der Böschungswinkel der Kompaktate wird gemäß DIN 53916 mit dem Auslauftrichter nach Dr. Pfrengle bestimmt.

#### ***Hausnerfaktor der Kompaktate***

Die Bestimmung des Hausnerfaktors erfolgt gemäß Punkt 7.7.1.

### **7.7.3 Charakterisierung der Pressmischungen**

#### ***Bestimmung der Entmischungstendenz***

50 g der kompaktathaltigen Pressmischung werden in einen 250 ml-Messzylinder eingefüllt. Der Messzylinder wird auf einem Stampfvolumeter JET ST 2 (Fa. Engelsmann) angebracht und insgesamt 5000 Hüben ausgesetzt. In Abständen von 1250 Hüben wird die Pressmischung optisch auf Entmischungstendenz untersucht.

#### ***Böschungswinkel der Pressmischungen***

Der Böschungswinkel kompaktathaltiger Pressmischungen wird gemäß Punkt 7.7.2 bestimmt. Die Böschungswinkel von Mischungen mit Extraktpulver werden gemäß Punkt 7.7.1 mit der Sieb-Kegel-Methode bestimmt.

## **7.8 Tablettierung**

Die Tablettierung erfolgt auf einer Rundlauftablettenpresse Korsch PH 103 (Fa. Korsch) mit Rührflügelfüllschuh.

### 7.8.1 Herstellung der Pressmischungen

Das Extraktpulver oder das Kompaktat und die Hilfsstoffe, mit Ausnahme des Schmiermittels, werden in einer Schüssel grob von Hand vorgemischt. Enthält die Rezeptur Extraktpulver, wird die Mischung anschließend durch Sieb 4 (Maschenweite 0,80 mm) gegeben. Falls in der Rezeptur ein Sprengmittel vorgesehen, wird Ac-Di-Sol durch Sieb 4 aufgesiebt. Die Mischung wird 10 Minuten im Turbula-Mischer bei 42 U/min gemischt. Magnesiumstearat wird durch Sieb 5 (Maschenweite 0,315 mm) aufgedudert und durch fünfminütiges Mischen im Turbula-Mischer bei 42 U/min aufgezogen.

### 7.8.2 Tablettierung und Messwerterfassung

#### *Instrumentierung und Messwerterfassung*

Die Presskraft wird über eine temperaturkompensierte Dehnungsmessstreifen-Vollbrücke erfasst. Die vier Dehnungsmessstreifen (DMS) sind an der Druckspindel der unteren Druckrollenabstützung angebracht. Eine genaue Beschreibung der Instrumentierung gibt Herzog (1991). Das Messsignal wird auf den Kompaktverstärker Spider 8 (Fa. HBM) übertragen. Dieser Verstärker beinhaltet einen Trägerfrequenzmessverstärker sowie einen Analog-Digital-Wandler und wird direkt an einen Computer angeschlossen. Der Trägerfrequenzmessverstärker versorgt die DMS mit einer Speisespannung von 2,5 V. Die Empfindlichkeit beträgt 3 mV/V. Signalrauschen und Störanteile werden intern durch einen Butterworthfilter 75 Hz herausgefiltert. Die mitgelieferte Software erlaubt eine automatische Datenerfassung mit 800 Messwerten pro Sekunde, sowie eine automatische Berechnung der Presskraftmaxima. Die Messwertaufnahme wird durch eine Triggerung gestartet, bevor ein bestimmter Stempel die Druckrollen passiert. Somit können die Pressereignisse den Stempeln zugeordnet werden. Jede Messung pro Stempel startet automatisch ab einer Presskraft von 0,8 kN. (Programmierung des Datenerfassungssystems: Herr J. Dressler, Tübingen).

#### *Kalibrierung*

Die Messkette wird vor Versuchsbeginn kalibriert. Die Kalibrierung wird durch Abgleich der Trägerfrequenzmessbrücke im Spider 8 gegen einen piezoelektrischen Kraftaufnehmer (Typ 9021 A, SN 351596, Fa. Kistler Instruments) mit werkseitig

angegebener Empfindlichkeit von 4,23 pC/N vorgenommen. Hierzu wird das Kalibriernormal zwischen obere und untere Druckrolle eingespannt. Die Ladungssignale werden mit Hilfe eines Ladungsverstärkers (Typ 5007, SN 331647, Fa. Kistler Instruments; Zeitkonstante long, Empfindlichkeit 5000 N/V) verstärkt und anschließend digitalisiert. Der durch lineare Regression berechnete Kalibrierfaktor wird in die Software eingegeben. Der Kalibrierbereich beträgt 1-25 kN. 1 V Ausgangsspannung entspricht 57,31 kN. Eine detaillierte Beschreibung der Kalibrierung gibt Herzog (1991).

### ***Pressbedingungen und Maschineneinstellungen***

3 Stempelpaare, Durchmesser 11,5 mm, doppeltgewölbt

Maschinengeschwindigkeit: 20 U/min

Geschwindigkeit des Rührflügelfüllschuhs: 20 Skt.

Dauer der Presskrafterfassung: 52,28 s (entspricht 17 Durchläufen à drei Stempeln)

## **7.9 Prüfung der Tabletten**

### **7.9.1 Galenische Prüfungen**

#### ***Masse***

Pro Presskraftniveau werden 10 zufällig ausgesuchte Tabletten gewogen. Es werden Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung berechnet.

#### ***Bruchfestigkeit***

Die Bruchfestigkeit wird mit einem Bruchfestigkeitstester TBH 30 (Fa. Erweka) nach Ph. Eur. 1997 bestimmt. Es werden Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung berechnet.

#### ***Zerfallszeit***

Die Bestimmung der Zerfallszeit erfolgt entsprechend den Angaben der Ph. Eur. Nachtrag 2001. Es wird die Zeit bestimmt, nach der 6 Tabletten in einem Zerfallstester (Typ PTZ 1, Fa. Pharmatest) rückstandsfrei zerfallen sind. Als Zerfallsmedium dient auf 36-38 °C temperiertes Wasser. Aufgrund der Klebetendenz der Tabletten wird die Prüfung ohne Scheiben durchgeführt.

### *Friabilität*

Die Bestimmung der Friabilität erfolgt nach Ph. Eur. Nachtrag 2001 in einem Friabilator (Typ PTF 1, Fa. Pharmatest).

#### **7.9.2 Freisetzungsuntersuchungen**

Die Freigabeuntersuchungen erfolgen in einer Paddleapparatur gemäß USP 24 (Apparat 2). Alle Arbeiten werden unter Ausschluss von Tageslicht durchgeführt.

Freisetzungsmedium:                   Phosphatpuffer pH 6,4 R Ph. Eur. mit 2%  
Natriumdodecylsulfat.

Freisetzungsvolumen:                1000 ml

Anzahl der Behälter:                 3 oder 6

Rührerdrehzahl:                     100 min<sup>-1</sup>

Freisetzungstemperatur:            37 ± 0,5 °C

Entnahmezeitpunkte:                Nach 5, 10, 15, 30, 45, 60, und 90 min.

Die entnommenen 5 ml Freisetzungsmedium werden durch Celluloseacetatfilter (Porengröße 0,22 µm, Fa. Sartorius) filtriert und als Probenlösung zur HPLC-Analyse (siehe dort) eingesetzt. Probenlösungen, die nicht sofort analysiert werden, werden bei – 20 °C gelagert.

## KAPITEL 8

### ZUSAMMENFASSUNG

*Hypericum perforatum* L. wird zur Behandlung leichter und mittelschwerer Depressionen eingesetzt. Die bisher vorliegenden biochemischen und tierexperimentellen Untersuchungen weisen darauf hin, dass die antidepressive Wirkung von Johanniskraut auf dem Zusammenspiel mehrerer Wirkmechanismen beruht und der gesamte *Hypericum*-Extrakt als therapeutisch wirksames Prinzip angesehen werden muss. Als potentielle Wirkstoffe werden Hyperforin, Hypericine und Flavonoide diskutiert. Des Weiteren sind als wesentliche Begleitstoffe Gerbstoffe, stickstoffhaltige Verbindungen, Fette und Wachse und Pflanzensäuren enthalten. Da Begleitstoffe den überwiegenden Anteil des Extraktes ausmachen, beeinflussen sie seine technologischen Eigenschaften und damit die Herstellung fester Darreichungsformen aus Johanniskrauttrockenextrakten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe verschiedener Johanniskrauttrockenextrakt-Chargen unter besonderer Berücksichtigung der Begleitstoffe, sowie die Untersuchung des Einflusses dieser Stoffe auf die technologische Verarbeitbarkeit der Extrakte. Die Tabletten sollen eine Zerfallszeit von weniger als 15 Minuten, eine Bruchfestigkeit im Bereich von 60-80 N und Friabilitätswerte unter 0,1 % aufweisen.

Die Hauptinhaltsstoffe der Trockenextrakte werden mittels HPLC und anderer in der Literatur beschriebener Verfahren quantifiziert. Alle untersuchten Extrakte zeigen qualitativ dasselbe Inhaltsstoffspektrum, unterscheiden sich jedoch in der quantitativen Zusammensetzung.

Flavonoide, Hyperforin und Hypericin werden mittels HPLC und UV-Detektion bestimmt. Zur Analyse der **Flavonoide** wird ein Gradientensystem verwendet, womit ein Gesamtflavonoidgehalt von 4,8 bis 11,4 % ermittelt wird. Der Herstellungsprozess der Extrakte aus der Johanniskrautdroge bewirkt somit eine Aufkonzentrierung der Flavonoide. Die Bestimmung von Hyperforin und Hypericin erfolgt in getrennten

Läufen isokratisch, um zeitsparende Verfahren mit kurzen Retentionszeiten einsetzen zu können. Der **Hypericing**gehalt der Extrakte beträgt 0,19 bis 0,3 %. **Hyperforin** ist in den Extrakten mit 1,3 bis 3,9 % enthalten. In Stabilitätsversuchen zeigt ein Gemisch von Hyperforin und Adhyperforin im Verhältnis 80/20 nach 18 Monaten Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eine deutliche Abnahme des Hyperforingehalts um 30 %, während der Hyperforingehalt eines hyperforinreichen Trockenextrakts, ebenfalls bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert, unverändert bleibt. Ein Trockenextrakt ist daher als Hyperforin-Sekundärstandard aufgrund des stabilisierenden Einflusses der Extraktmatrix besser geeignet als ein Hyperforin-Isolat. Der Hyperforingehalt der untersuchten Extraktchargen nimmt während 18 monatiger Lagerung bei Raumtemperatur um 17 bis 77 % ab.

Als **Begleitstoffe** in Pflanzenextrakten sind die im Pflanzenreich ubiquitären, wasserlöslichen **Zucker** zu erwarten. Aus diesem Grund wird eine isokratische HPLC-Analysenmethode mit refraktometrischer Detektion zur Bestimmung der Zucker in Johanniskrauttrockenextrakt entwickelt. Aufgrund der komplexen Extraktmatrix ist eine Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion erforderlich. Die HPLC-Fingerprints der Zucker sind bei allen Extraktchargen gleich: es werden Glucose, Fructose, Saccharose und Lactose gefunden. Letztere stammt aus der Extraktherstellung, wo sie als Stellmittel eingesetzt wird. Die Extraktchargen unterscheiden sich jedoch deutlich in der quantitativen Zusammensetzung der Zucker. Der Fructosegehalt beträgt 5,2 bis 9,8 %, für Glucose werden Werte zwischen 3,2 und 7,2 % gefunden, während Saccharose mit 1,4 bis 10,4 % die größten Unterschiede aufweist. Mono- und Disaccharide haben möglicherweise einen Einfluss auf Hygroskopizität und Verarbeitbarkeit der Extrakte, insbesondere die Schwankungen im Saccharosegehalt könnten von Bedeutung sein. Der Gesamtzuckergehalt der Extrakte beträgt 19,1 bis 25,4 % und ist somit für alle Extrakte ähnlich.

*Hypericum perforatum* L. ist reich an **Gerbstoffen** des Catechin-Typs. Die Bestimmung nach Arzneibuch ergibt Gerbstoffgehalte im Bereich von 6,2 bis 9,0 %. Mittels Flüssig-Flüssigextraktion mit n-Hexan wird der Anteil an lipophilen Inhaltsstoffen mit 10,0 bis 14,4 % bestimmt. Der **Asche**gehalt der Extrakte beträgt 4,9 bis 8,4 %. Der mittels Elementaranalyse bestimmte Stickstoffgehalt von 0,76 bis 1,36 % wird mit Hilfe eines Faktors (6,25) in den **Gesamtproteingehalt** von 3,9 bis

8,4 % umgerechnet. Die in der Literatur beschriebenen geringen Mengen an stickstoffhaltigen Verbindungen können den gefundenen hohen Gesamtproteingehalt von bis zu 8,4 % nicht erklären. Weitergehende Untersuchungen wären hier erforderlich. **Citronensäure** und **Äpfelsäure** werden für Johanniskraut zum ersten mal identifiziert und mittels einer HPLC-Methode mit Lichtstredetektion quantifiziert. Der Citronensäuregehalt beträgt 0,9 bis 2,3 % und der Äpfelsäuregehalt 2,3 bis 3,1 %.

Die phytochemischen Untersuchungen erfassen somit insgesamt 60 bis 70 % der Inhaltsstoffe der Johanniskrauttrockenextrakte quantitativ, der Rest bleibt unbekannt.

Im zweiten Teil der Arbeit soll der Versuch unternommen werden, die analytischen Befunde mit den technologischen Eigenschaften der Extrakte im Hinblick auf ihre Verarbeitbarkeit zu Tablettenkernen, die später mit einem Überzug versehen werden, zu korrelieren und eine für alle Extrakte einsetzbare, optimierte Rezeptur zu entwickeln. Alle Extraktpulver sind stark **hygroskopisch** und neigen zum Verkleben, wobei sich die Sorptionsisothermen nicht signifikant unterscheiden. Die besonders schlechten Fließeigenschaften einiger Extraktpulverchargen lassen sich auf ihre kleine Teilchengröße zurückführen.

Versuche zur **Direkttablettierbarkeit** der Extraktpulver zeigen Unterschiede in der Verarbeitbarkeit der Extraktchargen auf, die vor allem auf Unterschieden in der Fließfähigkeit beruhen. Die extraktpulverhaltigen Pressmischungen zeigen schlechte Fließeigenschaften und in Abhängigkeit von der verwendeten Extraktcharge Klebetendenz an den Stempeln. Sie weisen eine deutliche Deckeltendenz auf. Die Zerfallszeit der Tabletten ist chargenabhängig, liegt jedoch bei ausreichenden Bruchfestigkeiten über 60 N bei bis zu 50 Minuten.

Die pulvertechnologischen Eigenschaften von Extraktpulver haben sich für eine Direkttablettierung als unzureichend erwiesen. Aus diesem Grund wird der Einfluss einer technologischen Vorbehandlung auf die Verarbeitbarkeit der Trockenextraktchargen untersucht. Da eine Feuchtgranulierung mit Wasser aufgrund der Hygroskopizität der Extrakte nicht möglich und die Granulierung mit organischen Lösungsmitteln verarbeitungs- und umwelttechnisch problematisch ist, wird eine Trockengranulierung der Trockenextraktchargen vorgenommen. Die Trockengranulierung erfolgt durch **Walzenkompaktierung** mit einem kraft- und spalt-

kontrollierten Laborkompaktor, GMP Mini-Pactor, der eine optimale Prozesskontrolle gewährleistet. Er ist aus der Produktzuführung, der Kompaktier- und der Granuliereinheit aufgebaut und mit geriffelten Walzen ausgestattet. Eine Walze ist fixiert, während die zweite Walze beweglich gelagert ist. Dies gestattet eine automatische Steuerung der Spaltbreite während des Kompaktierprozesses und eine optimale Presskraftregelung. Die Maschine ist GMP-gerecht ausgelegt.

Die Extrakte werden mit 0,5, 2,0 und 5,0 % Magnesiumstearat gemischt und bei Kompaktierkräften von 4 bis 20 kN/cm kompaktiert. Zur vergleichenden Tablettierung von Extraktpulver und Kompaktat wird eine Formulierung auf der Basis von Avicel PH 101, Ac-Di-Sol, Cab-O-Sil M 5 und Magnesiumstearat entwickelt, die sich gleichermaßen zur Tablettierung von Extraktpulver und Kompaktat eignet. Die Kompaktierung verbessert deutlich die Fließfähigkeit der Extrakte und der daraus hergestellten Tablettiermischungen, sowie deren Verarbeitbarkeit auf einer Rundlauf-tablettenpresse und die Tablettenqualität. Unterschiede zwischen den Extraktchargen bezüglich der physikalischen Eigenschaften und der Verarbeitbarkeit werden ausgeglichen. Die Tablettierung von kompaktathaltigen Tablettiermischungen reduziert die Staubentwicklung während der Tablettierung und verhindert das Deckeln der Tabletten. Die Klebeneigung an den Stempeln ist bei Formulierungen mit wenigstens 2 % Magnesiumstearat im Granulat stark verringert. Formulierungen mit 5 % Magnesiumstearat in der inneren Phase können ohne Magnesiumstearatzusatz in der äußeren Phase tablettiert werden. Kompaktathaltige Tabletten weisen **Zerfallszeiten von ungefähr 12 min** auf. Ein hoher Magnesiumstearatzusatz im Granulat beeinträchtigt weder die Zerfallszeit noch die Bruchfestigkeit der Tabletten. Des weiteren erfolgt die **Freisetzung** von Hyperforin, Hypericin und Rutin aus kompaktathaltigen Tabletten schneller als aus extraktpulverhaltigen Tabletten.

Eine nähere Untersuchung und Quantifizierung der Haupteinfluss-Größen des Kompaktierprozesses auf die Kompaktat- und Tabletteneigenschaften erfolgt mittels eines **3<sup>3</sup>-Faktorenexperimentes**. Hierbei wird der Einfluss der drei unabhängigen Prozessvariablen Magnesiumstearatkonzentration, Kompaktierkraft und Granuliersiebgröße auf die mittlere Partikelgröße der Kompaktate und die Zerfallszeit kompaktathaltiger Tabletten untersucht. Zwei verschiedene Johanniskrautextrakt-

chargen werden mit 0,5, 2,0 und 3,5 % Magnesiumstearat gemischt und bei Kompaktierkräften von 4, 8 und 12 kN/cm kompaktiert. Die Granulierung erfolgt mit Granuliersiebgrößen von 0,8 mm, 1,0 mm und 1,25 mm Maschenweite. Durch Varianzanalyse und multiple, lineare, schrittweise Regression wird der Zusammenhang zwischen den Zielgrößen mittlere Partikelgröße des Granulats und Zerfallszeit der Tabletten und den unabhängigen Prozessvariablen untersucht. Die mittlere Partikelgröße  $d_{50}$  der Kompaktate wird durch die unabhängigen Variablen mit Korrelationskoeffizienten größer als 0,9 gut erklärt.

Die Ergebnisfunktionen der Zerfallszeit der Tabletten erklären die gemessenen Ergebnisse nur ungenügend. Die Zerfallszeiten der Tabletten betragen 5 bis 15 Minuten und steigen geringfügig mit zunehmender Magnesiumstearatkonzentration und mit steigender Kompaktierkraft an. Folglich verringert der Magnesiumstearatzusatz im Granulat den negativen Einfluss auf die Zerfallszeit. Zugleich bleibt die Funktionalität von Magnesiumstearat als Schmiermittel erhalten.

Insgesamt ermöglicht die Kompaktierung die Verarbeitung von Extraktchargen unterschiedlicher physikalischer und chemischer Zusammensetzung zu Tabletten mit einheitlichen und spezifikationsgerechten Eigenschaften. Rohstoffunterschiede werden somit ausgeglichen. Bisher ist es (noch) nicht gelungen, die Unterschiede in den Eigenschaften und der Verarbeitbarkeit mit bestimmten Inhaltsstoffen zu korrelieren. Der Saccharose kommt eine gewisse Bedeutung zu, die gefundenen Unterschiede reichen jedoch zur Erklärung allein nicht aus. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass bisher nur 60 bis 70 % der Inhaltsstoffe quantifiziert werden konnten.

Trotzdem hat die Arbeit gezeigt, dass durch die Auswahl geeigneter technologischer Methoden Extrakte mit unterschiedlichen Zusammensetzungen und Eigenschaften erfolgreich zu Tabletten verarbeitet werden können.

## KAPITEL 9

### LITERATURVERZEICHNIS

- AOAC, Association of Official Analytical Chemists  
"Official Methods of Analysis of the AOAC International"  
AOAC International, 16. Aufl., Arlington, VA, USA, 1995, Kap. 32, 23-24
- Armstrong, N. A. und James, K. C.  
"Understanding experimental design and interpretation in pharmaceuticals"  
Ellis Horwood Limited, Chichester, 1990, 49
- Arnaud, Ph.; Bossard, D. und Chaumeil, J.C.  
"Effect of the granulation process on nitrofurantoin granule characteristics"  
Drug. Dev. Ind. Pharm. **24**, 57-66 (1998)
- Bakele, W.  
"Grundlagen, Methoden und Technik der Trockengranulierung"  
Chem.-Ing.-Tech. **64**, 273-275 (1992)
- Berghöfer, R.  
"Analytik und Isolierung phenolischer Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L. aus Anbau und Wildvorkommen und Vergleich mit anderen heimischen Hypericum-Arten"  
Dissertationes botanicae 106, Cramer, Berlin-Stuttgart (1987)
- Biber, A.; Fischer, H.; Römer, A. und Chatterjee, S. S.  
"Oral bioavailability of hyperforin from *Hypericum* extracts in rats and human volunteers"  
Pharmacopsychiat. **31**, Suppl. 1, 36-43 (1998)
- Biffignandi, P. M. und Bilia, A. R.  
"The growing knowledge of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) drug interactions and their clinical significance"  
Curr. Ther. Res. **61**, 389-394 (2000)
- Bombardelli, E. und Morazzoni, P.  
"Hypericum perforatum"  
Fitoterapia **66**, 43-68 (1995)
- Bork, P. M.; Bacher, S.; Schmitz, M. L.; Kaspers, U. und Heinrich, M.  
"Hypericin as a non-antioxidant inhibitor of NF- $\kappa$ B"  
Planta Med. **65**, 297-300 (1999)

Bos, C.E.; Bolhuis, G.K.; Lerk, C.F.; de Boer, J.H.; Duineveld, C.A.A.; Smilde, A.K. und Doornbos, D.A.

”The use of a factorial design to evaluate the physical stability of tablets prepared by direct compression I. A new approach based on the relative change in tablet parameters”

Eur. J. Pharm. Biopharm. **37**, 204-209 (1991a)

Bos, C.E.; Bolhuis, G.K.; Lerk, C.F.; de Boer, J.H.; Duineveld, C.A.A.; Smilde, A.K. und Doornbos, D.A.

”The use of a factorial design to evaluate the physical stability of tablets prepared by direct compression II. Selection of excipients suitable for use under tropical storage conditions”

Eur. J. Pharm. Biopharm. **37**, 210-215 (1991b)

Brantner, A.; Kartnig, Th. und Quehenberger, F.

“Vergleichende phytochemische Untersuchungen an *Hypericum perforatum* L. und *Hypericum maculatum* Crantz“

Sci. Pharm. **62**, 261-276 (1994)

Braun, M.

“Formulierungen und in vitro-Depositionsverhalten von Pulverinhalaten mit Dinatriumcromoglicat (DNCG)“

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1995)

Brenner, R.; Azbel, V.; Madhusoodanan, S. und Pawlowska, M.

“Comparison of an extract of *Hypericum* (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: a double blind, randomized pilot study”

Clin. Ther. **22**, 411-419 (2000)

Brockmann, H.

„Photodynamisch wirksame Pflanzenfarbstoffe“

Fortschr. Chem. Org. Nat. St. **14**, 141-182 (1957)

Brockmann, H.; Franssen, U.; Spitzner, D. und Augustiniak, H.

„Zur Isolierung und Konstitution des Pseudohypericins“

Tetrahedron Lett. **23**, 1991-1994 (1974)

Brockmann, H.; Pohl, F.; Maier, K. und Haschad, M. N.

„Über das Hypericin, den photodynamischen Farbstoff des Johanniskrautes (*Hypericum perforatum*)“

Ann. Chem. **553**, 1-53 (1942)

- Brolis, M.; Gavetta, B.; Fuzzati, N.; Pace, R.; Panzeri, F. und Peterlongo, F.  
"Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection – mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography – UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum* L."  
J. Chromatogr. A **825**, 9-16 (1998)
- Burger, A. und Dialer, R.  
"Zur Wirkstofffreigabe aus pflanzenextrakthaltigen Dragees, 1. Mitteilung"  
Sci. Pharm. **49**, 461-471 (1981)
- Butterweck, V.; Jürgenliemk, G.; Nahrstedt, A. und Winterhoff, H.  
"Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test"  
Planta Med. **66**, 3-6 (2000)
- Cataldi, T. R. I.; Margiotta, G.; Iasi, L.; Di Chio, B.; Xiloyannis, C. und Bufo, S. A.  
"Determination of sugar compounds in olive plant extracts by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection"  
Anal. Chem. **72**, 3902-3907 (2000)
- Chatterjee, S. S.; Nöldner, M.; Koch, E. und Erdelmeier, C.  
„Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin“  
Pharmacopsychiat. **31**, Suppl. I, 7-15 (1998)
- Chatterjee, S. S.; Biber, A.; Weibezahn, C.  
"Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin"  
Pharmacopsychiat. **34**, Suppl. 1, 11-19 (2001)
- Chi, J. D. und Franklin, M.  
"Measurement of hyperforin a constituent of St. John's wort in plasma by high-performance liquid chromatography"  
J. Chromatogr. B **735**, 285-28 (1999)
- Christ, B. und Müller, K. H.  
„Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen“  
Arch. Pharm. **293/65**: 1033-1042 (1960)
- Cohn, R.; Heilig, H. und Delorimier, A.  
"Critical evaluation of the compactor"  
J. Pharm. Sci. **55**, 328-331 (1966)
- Czygan, F. C.  
„Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrautes“  
Phytother. **14**, 272-278 (1993)
- Demisch, L.; Hölzl, J.; Gollik, B. und Kaczmarczyk, P.  
„Identification of selective MAO-type-A inhibitors in *Hypericum perforatum* L.“  
Pharmacopsychiat. **22**, 194 (1989)

- DAB 6, Amtliche deutsche Fassung  
Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 6. Ausgabe (Neudruck 1951)
- Deutscher Arzneimittel-Codex (DAC)  
Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH,  
Eschborn, 3. Erg. (1991)
- Diaz, L.; Souto, C.; Concheiro A.; Gomez-Amozy L. M. and Martinez-Pacheco, R.  
"Evaluation of Eudragit E as excipient in tablets of dry plant extracts"  
S.T.P. Pharma **6**, 105-109 (1996)
- Dimpfel, W.; Schober, F. und Mannel, M.  
"Effects of a methanolic extract and a hyperforin-enriched CO<sub>2</sub> extract of St. John's  
wort (*Hypericum perforatum*) on intracerebral field potentials in the freely moving rat  
(tele-stereo-EEG)"  
Pharmacopsychiat. **31**, Suppl. I, 30-35 (1998)
- DIN 10758  
"Untersuchung von Honig. Bestimmung des Gehaltes an den Sacchariden Fructose,  
Glucose, Saccharose, Turanose und Maltose HPLC-Verfahren"  
Deutsches Institut für Normung, Beuth Verlag GmbH, Berlin (1997)
- DIN 53916  
"Bestimmung der Rieselfähigkeit von Pulvern und Granulaten"  
Verfahren nach Pfrengle"
- Ebel, S.  
„Würzburger Skripten zur Analytik“  
Reihe Statistik 6. Aufl., Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität  
Würzburg, 1995, 5-99
- Eder, M. und Mehnert, W.  
"Bedeutung pflanzlicher Begleitstoffe in Extrakten"  
Pharmazie **53**, 285-293 (1998)
- El Rassi, Z. und Mechref, Y.  
"Recent advances in capillary electrophoresis of carbohydrates"  
Electrophor. **17**, 275-301 (1996)
- Erdelmeier, C. A. J.  
„Hyperforin, possibly the major non-nitrogenous secondary metabolite of *Hypericum  
perforatum* L.“  
Pharmacopsychiat. **31**, Suppl. 1, 2-6 (1998)
- Europäisches Arzneibuch 1997, 3. Ausgabe, Amtliche deutsche Fassung  
Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH,  
Eschborn (1997)

Europäisches Arzneibuch Nachtrag 2001  
Council of Europe, Strasbourg (2001)

Falk, H. und Schmitzberger, W.  
„On the Nature of „Soluble“ Hypericin in Hypericum Species“  
Monatsh. Chem. **123**, 731-739 (1992)

Franz, G.  
„Pflanzliche Drogen in den aktuellen Arzneibüchern“  
Dtsch. Apoth. Ztg. **141**, 792-802 (2001)

Fuchs, L.  
„Kräuterbuch“  
Kap. CCCXXIII, Basel (1543)

Funakoshi, Y.; Asogawa, T. und Satake, E.  
“Effects of changes in roller compactor parameters on granulations produced by compaction”  
Drug. Dev. Ind. Pharm. **3**, 555-573 (1977)

Gaedcke, F.  
“Johanniskraut und dessen Zubereitungen“  
Dtsch. Apoth. Ztg **137**, 3753-3757 (1997)

Galia, E.; Nicolaides, E.; Hörter, D.; Löbenberg, R.; Reppas, C. und Dressman, J. B.  
“Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and class II drugs”  
Pharm. Res. **15**, 698-705 (1998)

Gebre-Mariam, T.; Winnemöller, M. und Schmidt, P.C.  
“An evaluation of the disintegration efficiency of a sodium starch glycolate prepared from enset starch in compressed tablets  
Eur. J. Pharm Biopharm. **43**, 124-132 (1996)

Ghebregzabher, M.; Rufini, S.; Monaldi, B. und Lato, M.  
“Thin-layer chromatography of carbohydrates“  
J. Chromatogr. **127**, 133-162 (1976)

Gray, D. E.; Rottinghaus, G. E.; Garrett, H. E. G und Pallardy, S. G.  
“Simultaneous determination of the predominant hyperforins and hypericins in St. John’s wort (*Hypericum perforatum* L.) by liquid chromatography”  
J. AOAC Int. **83**, 944-949 (2000)

Greeson, J. M.; Sanford, B. und Monti, D. A.  
“St. John’s wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature”  
Psychopharmacol. **153**, 402-414 (2001)

Grösz, J.; Braunsteiner, W.

“Quantitative determination of glucose, fructose, and sucrose, and separation of fructo-oligosaccharides by means of TLC”

J. Planar. Chromatogr. **2**, 420-423 (1989)

Gurevich, A. J.; Dobrynin, V. N.; Kolosov, M. N.; Popravko, S. A.; Ryabova, I. D.;

Chernov, B. K.; Derbentseva, N. A.; Aizenman, B. E. und Garagulya, A. D.

”Hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum* L.”

Antibiotiki **75**, 510-513 (1971)

Häberlein, H.; Tschiersch, K.-P.; Stock S. und Hölzl, J.

„Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.)

Pharm. Ztg./PZ-Wiss. **137/4**, 169-174 (1992)

Hagenström, U.

„Das Vorkommen einer antibakteriellen Fraktion in den Kapseln einiger *Hypericum*-Arten“

Arzneim. Forsch. **5**, 155 (1955)

Herzog, R.

“Calciumphosphate in der Tablettierung“

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1991)

Hiller, K. O. und Schmidt, A. H.

“Chargenkonformität von Phytopharmaka“

Dtsch. Apoth. Ztg. **140**, 2955-2961 (2000)

Hölzl, J. und Ostrowski, E.

“Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.), HPLC-Analyse der wichtigsten

Inhaltsstoffe und deren Variabilität in einer Population“

Dtsch. Apoth. Ztg. **127**, 1227-1230 (1987)

Hölzl, J.; Sattler, S. und Schütt, H.

“Johanniskraut: eine Alternative zu synthetischen Antidepressiva?“

Pharm. Ztg. **193**, 3959-3977 (1994)

ICD 10

“International statistical classification of diseases and related health problems“

World Health Organization, Genf, Bd. 1 (1992)

Inghelbrecht, S. und Remon J. P.

”Reducing dust and improving granule and tablet quality in the roller compaction process”

Int. J. Pharm. **171**, 195-206 (1998)

In-process revision

”St. John’s Wort”

Pharmacop. For. **24**, 6916-6919 (1998)

Iuliano, T. A.

”A simplified method for determining undeclared sweeteners added to pure orange juice”

J. AOAC Int. **79**, 1381-1387 (1996)

Jensen, A. G.; Hansen, S. H. und Nielsen, E.

“Adhyperforin as a contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity”

Life sci. **68**, 1593-1603 (2001)

Johanson, J.

”Roll press feed systems”

Powder Handl. Process. **8**, 159-163 (1996)

Johne, A.; Brockmoller, J.; Bauer, S.; Maurer, A.; Langheinrich, M. und Roots, I.

“Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St. John’s wort (*Hypericum perforatum*)”

Clin. Pharmacol. Ther. **66**, 338-345 (1999)

Jungmayr, P.

“Phytopharmaka im Widerstreit“

Dtsch. Apoth. Ztg. **139**, 4547-4552 (1999)

Juslin, L.; Antikainen, O.; Merkkü, P. und Yliruusi, J.

”Droplet size measurement: I. Effect of three independent variables on droplet size distribution and spray angle from a pneumatic nozzle”

Int. J. Pharm. **123**, 247-256 (1995)

Käufeler, R.; Meier, B.; Brattström, A.

“Efficacy and tolerability of Ze 117 St. John’s wort extract in comparison with placebo, imipramine and fluoxetine for the treatment of mild to moderate depression according to ICD-10. An overview”

Pharmacopsychiat. **34**, Suppl. 1, 49-50 (2001)

Kaul, R.

“Johanniskraut: Botanik, Inhaltsstoffe, Qualitätskontrolle, Pharmakologie, Toxikologie und Klinik“

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2000)

Keymer, R.

“Tabletten aus Trockenextrakten“

Pharm. Ind. **31**, 721 (1969)

Kommentar zum DAB 1998

Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn, 11. Lfg. (1999)

- Krämer, W. und Wiartalla, R.  
„Bestimmung von Naphthodianthronen in Johanniskraut“  
Pharm. Ztg. Wiss. **137**, 202-207 (1992)
- Kristensen, H. G. und Schaefer, T.  
“Granulations“  
In: „Encyclopedia of Pharmaceutical Technology“  
Bd. 7, Swarbrick, J., Boylan JC. (Hrsg.), Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 1993,  
123
- Laker, M. F.  
“Estimation of neutral sugars and sugar alcohols in biological fluids by gas-liquid  
chromatography”  
J. Chromatogr. **184**, 457-470 (1980)
- Lang, F. und Wilhelm, E.  
”Quantitative determination of proanthocyanidins in Ginkgo biloba special extracts”  
Pharmazie **51**, 734-737 (1996)
- Lang, F.; Schnädelbach, D. und Stumpf, H.  
”Considerations on future pharmacopoeial monographs for plant extracts”  
Pharmeur. **11**, 268-274 (1999)
- Lantz, R. J. und Schwartz, J. B.  
“Mixing“  
In: „Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets“  
Bd. 2, Liebermann, H.A.; Lachmann, L., Schwartz, J. (Hrsg.), Marcel Dekker Inc.,  
New York und Basel, 1990, 34
- Lapke, C.; Schilcher, H. und Riedel, E.  
“GABA in *H. perforatum* L. and in other herbal drugs“  
Abstracts of Lectures and Poster Presentations. 44<sup>th</sup> Annual Congress of the Society  
for Medicinal Plant Research, Prague, Poster Abstract P 63 (1996)
- Lewis, G.A.; Mathieu, D. und Phan-Tan-Luu, R.  
”Pharmaceutical experimental design”  
Marcel Dekker, Inc., New York, 1999, 186
- Lindberg, N.-O.; Jönsson, C. und Holmquist, B.  
”Optimization of disintegration time and crushing strength of a tablet formulation”  
Drug Dev. Ind. Pharm. **11**, 931-943 (1985)
- Linde, K.; Ramirez, G.; Mulrow, D. C.; Pauls, A.; Weidenhammer, W.; Melchart, D.  
„St. John´s wort for depression-an overview and meta-analysis of randomized clinical  
trials“  
Brit. Med. J. **313**, 253-258 (1996)

List, P. H.

”Arzneiformenlehre”

4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1985, 45

Maisenbacher, P.

“Untersuchungen zur Analytik von Johanniskrautöl“

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1991)

Maisenbacher, P.; Kovar, K.A

“Adhyperforin: A homologue of hyperforin from *Hypericum perforatum*”

*Planta Med.* **58**, 291-293 (1992)

Martens, D. A. und Frankenberger, W. T. Jr.

“Determination of saccharides by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection“

*Chromatographia* **29**, 7-12 (1990)

Mathis, C. und Ourisson, G.

“Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* II“

*Phytochemistry* **3 a**, 115-131 (1964)

Merfort, I.

“Untersuchungen zur Flavonoidführung der Gattung *Arnica* unter besonderer Berücksichtigung der arzneilich verwendeten *Arnica*blüten“

Habilitationsschrift, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (1990)

Merkku, P. und Yliruusi, J.

”Use of 3<sup>3</sup> factorial and multilinear stepwise regression analysis in studying the fluidized bed granulation process Part I”

*Eur. J. Pharm. Biopharm.* **39**, 75-81 (1993a)

Merkku, P.; Antikainen, O. und Yliruusi, J.

”Use of 3<sup>3</sup> factorial and multilinear stepwise regression analysis in studying the fluidized bed granulation process, Part II”

*Eur. J. Pharm. Biopharm.* **39**, 112-116 (1993b)

Merkku, P.; Lindqvist, A.-S.; Leiviskä, K. und Yliruusi, J.

”Influence of granulation and compression process variables on flow rate of granules and on tablet properties, with special reference to weight variation”

*Int. J. Pharm.* **102**, 117-125 (1994)

Miller, R. W.

“Advances in pharmaceutical roller compactor feed systems designs“

*Pharm. Technol.* **6**, 154-162 (1994)

Miller, R. W.

”Roller Compaction Technology”

In: “Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology”

Parikh, D. M. (Hrsg.), Marcel Dekker Inc., New York, 1997, 99-150

- Morrison, I. M.  
"Fractionation of cell wall components"  
In: "Modern Methods of Plant Analysis"  
Bd. 17, Linskens, H. F. und Jackson, J. F. (Hrsg), Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg,  
1996, 2
- Müller, W. E.; Rolli, M.; Schäfer, C. und Hafner, U.  
„Effects of hypericum extract (Li 160) in biochemical models of antidepressant  
activity“  
Pharmacopsychiat. **30**, Suppl. 1, 102-107 (1997)
- Müller, W. E.; Singer, A.; Wonnemann, M.; Hafner, U.; Rolli, M. und Schäfer, C.  
„Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of  
Hypericum extract“  
Pharmacopsychiat. **31**, Suppl. 1, 16-21 (1998)
- Müller, W.E.; Singer, A. und Wonnemann, M.,  
"Johanniskraut-Vom Nerventee zum modernen Antidepressivum"  
Dtsch. Apoth. Ztg. **139**, 1741-1750 (1999)
- Müller, W. E.; Singer, A.; Wonnemann, M.  
"Hyperforin-Antidepressant activity by a novel mechanism of action"  
Pharmacopsychiat. **34**, Suppl. 1, 98-102 (2001)
- Müller-Kuhrt, L. und Boesel, R.  
„Analytik der Hypericine im Hypericum-Extrakt“  
Nervenheilkunde **12**, 359-361 (1993)
- Nährstedt, A. und Butterweck, V.  
"Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum  
perforatum* L."  
Pharmacopsychiat. **30**, Suppl. 1, 129-134 (1997)
- Nöldner M.  
"Johanniskraut und Arzneimittelinteraktionen"  
Dtsch. Apoth. Ztg. **141**, 3627-3630 (2001)
- Oehlke, J.; Brudel, M. und Blasig, I. E.  
"Benzoylation of sugars, polyols and amino acids in biological fluids for high-  
performance liquid chromatography analysis"  
J. Chromatogr. B **655**, 105-111 (1994)
- Omarova, M. A und Artamonova, N. A.  
"Classes and fatty-acid composition of lipids from *Hypericum perforatum*"  
Chem. Nat. Compd. **35**, 684-685 (1999)
- Orth, H. C. J. und Schmidt, P. C.  
"Stability and stabilization of hyperforin"  
Pharm. Ind. **62**, 60-63 (2000)

Orth, H. C. J.

“Isolierung, Stabilität und Stabilisierung von Hyperforin und Identifizierung seines Hauptabbauproduktes aus *Hypericum perforatum* L.“

Dissertation, Eberhard-Karls Universität Tübingen (1999a)

Orth, H. C. J.; Hauer, H.; Erdelmeier, C. A. J. und Schmidt, P. C.

“Orthoforin: The main degradation product of hyperforin from *Hypericum perforatum* L.“

Pharmazie **54**, 76-77 (1999b)

Orth, H. C. J.; Rentel, C. und Schmidt, P. C.

“Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L.”

J. Pharm. Pharmacol. **51**, 193-200 (1999c)

Palma, S. D.; Manzo, R. H. und Allemanni, D. A.

”Dry plant extracts loaded on fumed silica for direct compression: Preparation and preformulation”

Pharm. Dev. Technol. **4**, 523-530 (1999)

Parrott, E.

”Densification of powders by concavo-concave roller compactor”

J. Pharm. Sci. **70**, 288-291 (1981)

Perovic, S. und Müller, W. E. G.

„Pharmacological profile of *Hypericum* extract: effect on serotonin uptake by postsynaptic receptors“

Arzneim. Forsch./Drug. Res. **45**, 1145-1148 (1995)

Plazier-Vercamen, J. A. und Bruwier, C.

”Evaluation of excipients for direct compression of the spray-dried extract of *Harpagophytum procumbens*”

S.T.P. Pharma **2**, 525-530 (1986)

Reichling, J.; Weseler, A.; Saller, R.

“A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L.”

Pharmacopsychiat. **34**, Suppl. 1, 116-118 (2001)

Renger, B.; Jehle, H.; Fischer, M. und Funk, W.

„Validierung von Analysenverfahren in der pharmazeutischen Analytik“

Pharm. Ind. **56**, 993-1000 (1994)

Rocksloh K.

“Rezepturoptimierung von Johanniskrautextrakt-Drageekernen unter Einbeziehung Neuronaler Netze“

Dissertation, Eberhard-Karls Universität, Tübingen (1999a)

Rocksloh, K.; Rapp, F.-R.; Abu-Abed, S.; Müller, W.; Reher, M.; Gauglitz, G. und Schmidt, P. C.

”Optimization of crushing strength and disintegration time of a high-dose plant extract tablet by neural networks”

Drug Dev. Ind. Pharm. **25**, 1015-1025 (1999b)

Roth, L.

“Hypericum, Hypericin“

ecomed-Verlagsgesellschaft mbH, Landsberg/Lech (1990)

Rücker G.; Manns, D.; Hartmann, R.; Bonsels, U.

“Peroxides as constituents of plants. Part 19. A c50-hydroperoxide from *Hypericum perforatum*”

Arch. Pharm. **328**, 725-730 (1995)

Schellenberg, R.; Sauer, S. und Dimpfel, W.

„Pharmacodynamic effects of two different *Hypericum* extracts in healthy volunteers measured by quantitative EEG“

Pharmacopsychiat. **31**, Suppl. 1, 44-53 (1998)

Schiller, M.; von der Heydt, H. H. H., März, F. und Schmidt, P. C. (in Vorbereitung)

Schütt, H. und Hölzl, J.

“Vergleichende Qualitätsuntersuchungen von Johanniskraut-Fertigarzneimitteln unter Verwendung verschiedener quantitativer Bestimmungsmethoden“

Pharmazie **49**, 206-208 (1994)

Schütt, H. und Schulz, V.

“Hypericum“

In: „Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis“

Bd 5, 5. Ausgabe, Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H. und Schneider, G.

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York; 474-495 (1993)

Schulz, V.; Hänsel, R.

“Rationale Phytotherapie“

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 4. Aufl., 1999, 362-363

Shangraw, R.; Mitrevej, A. und Shah, M.

”A new era of tablet disintegrants”

Pharm. Tech. **4** (10), 49-57 (1980)

Sheskey, P. J.; Cabelka, T. D.; Robb, R. T. und Boyce, B. M.

”Use of roller compaction in the preparation of controlled-release hydrophilic matrix tablets containing methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose polymers”

Pharm. Tech. **18** (9), 132-150 (1994)

Shlieout, G.; Lammens, R. F. und Kleinebudde, P.

”Dry granulation with a roller compactor”

Pharm. Techn. Eur. **11**, 24–35 (2000)

- Simmen, U.; Higelin, J.; Berger-Büter, K.; Schaffner, W.; Lundstrom, K.  
“Neurochemical studies with St. John’s wort in vitro“  
Pharmacopsychiat. **34**, Suppl. 1, 137-142 (2001)
- Singer, A.; Wonnemann, M. und Müller, W. E.  
“Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John’s wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na<sup>+</sup>“  
J. Pharmacol. Exp. Ther. **290**, 1363-1368 (1999)
- Sloley, B. D.; Urichuk, L. J.; Lei, L.; Lie-Dong, G.; Coutts, R. T.; Pang P. K. T.; Shan J. J.  
”Chemical and pharmacological evaluation of Hypericum perforatum extracts“  
Acta Pharmacol. Sin. **21**, 1145-1152 (2000)
- Sparenberg, B.  
„MAO-inhibierende Eigenschaften von Hypericuminhaltsstoffen und Untersuchungen zur Analytik und Isolierung von Xanthonen aus *Hypericum perforatum* L.“  
Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1993)
- Strickland, W.; Nelson, E.; Busse, L. und Higuchi, T.  
”The physics of tablet compression IX. Fundamental aspects of tablet lubrication“  
J. Am. Pharm. Assoc. **45**, 51-55 (1956)
- Thiede, H. M. und Walper, A.  
„MAO- und COMT-Hemmung durch Hypericum-Extrakte und Hypericin“  
Nervenheilkunde **12**, 346-348 (1993)
- Tseng L.-H.  
“Kopplung von chromatographischen Kapillartrenntechniken mit der NMR-Spektroskopie: Entwicklung und Anwendung in der Naturstoffanalytik“  
Dissertation, Eberhard-Karls Universität Tübingen (2000)
- Umek, A.; Kreft, S.; Kartnig, T. und Heydel, B.  
”Quantitative phytochemical analyses of six Hypericum species growing in Slovenia“  
Planta Med. **65**, 388-390 (1999)
- Volz, H.-P.  
„Controlled clinical trials of Hypericum extracts in depressed patients - an overview“  
Pharmacopsychiat. **30**, Suppl. 1, 72-76 (1997)
- Westerhoff, K.; Kaunzinger, A.; Wurglics, M.; Schubert-Zsilavec, M.; Baumeister, A. und Dressman, JB.  
“Release characteristics of hyperforin and total hypericin from St. John’s Wort products“  
Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. **333**, Suppl. 2, 59 (2000)
- Wills, R. B. H.; Bone, K. und Morgan, M.  
”Herbal products: active constituents, modes of action and quality control“  
Nutr. Res. Rev. **13**, 47-77 (2000)

Wirz, A.; Meier, B. und Sticher, O.

“Stability of hypericin and pseudohypericin in extract solutions of *Hypericum perforatum* and in standard solutions”

Pharm. Ind. **63**, 410-415 (2001)

Woelk, H.

”Comparison of St. John’s wort and imipramine for treating depression: randomized controlled trial”

Br. Med. J. **321**, 536-539 (2000)

Wonnemann, M.; Singer, A.; Siebert, B.; Müller, W. E.

“Evaluation of synaptosomal uptake inhibition of most relevant constituents of St. John’s wort”

Pharmacopsychiat. **34**, Suppl. 1, 148-151 (2001)

Wurglics, M.; Westerhoff, K.; Kaunzinger, A.; Wilke, A.; Baumeister, A. und Schubert-Zsilavec M.

“Johanniskrautextrakt-Präparate“

Dtsch. Apoth. Ztg. **140**, 3904-3910 (2000)

York, P.

”Crystal engineering and particle design for the powder compaction process”

Drug Dev. In. Pharm. **18**, 677-721 (1992)

# KAPITEL 10

## ANHANG

### 10.1 Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der quantitativen HPLC-Bestimmung von Rutin, Hyperforin und Hypericin im Extrakt

Tab. 10.1 Messdaten der Kalibrierung von Rutin (für Bestimmung im Extrakt)

	Konzentration Rutin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Rutin	Konzentration Rutin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Rutin
	1,892	102603	28,334	1418459
	1,892	101401	28,334	1436501
	1,892	102268	28,334	1448612
	1,892	101628	28,334	1443215
	1,892	101614	28,334	1447114
	1,892	100994	28,334	1442830
Mittelwert		101751,33		1439455,17
realsdv [%]		0,58		0,77
var (yc)		344527,87		123519457,37
	9,461	485318	37,345	1928810
	9,461	489505	37,345	1915080
	9,461	484208	37,345	1917125
	9,461	490945	37,345	1914044
	9,461	486174	37,345	1924830
	9,461	488373	37,345	1921495
Mittelwert		487420,50		1920230,67
realsdv [%]		0,53		0,30
var (yc)		6793784,33		34161348,67
	18,922	954174	47,306	2392553
	18,922	975682	47,306	2411211
	18,922	974211	47,306	2399935
	18,922	965809	47,306	2373178
	18,922	971079	47,306	2388880
	18,922	970567	47,306	2372764
Mittelwert		968587,00		2389753,50
realsdv [%]		0,81		0,63
var (yc)		61510143,60		227215552,30

Tab. 10.2 Messdaten der Systempräzision von Rutin (Standard)

	Konzentration Rutin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Rutin	Konzentration Rutin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Rutin
	41,2	1918463	41,2	1928810
	41,2	1945031	41,2	1915080
	41,2	1913814	41,2	1917125
	41,2	1908402	41,2	1914044
	41,2	1911391	41,2	1924830
	41,2	1925397	41,2	1921495
Mittelwert	1920323,60			
realsdv [%]	0,51			
var (yc)	97709652,60			



Tab. 10.5 Messdaten der Kalibrierung von Hyperforin (für Bestimmung im Extrakt)

	Konzentration Hyperforin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hyperforin	Konzentration Hyperforin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hyperforin
	0,295	6862	5,906	136612
	0,295	6803	5,906	137076
	0,295	6846	5,906	137534
	0,295	6860	5,906	137258
	0,295	6809	5,906	137099
	0,295	6988	5,906	137595
Mittelwert		6861,33		137195,67
realsdv [%]		0,98		0,26
var (yc)		4484,67		128430,67
	1,182	27923	11,812	271247
	1,182	27887	11,812	273555
	1,182	27848	11,812	274334
	1,182	27858	11,812	273017
	1,182	27748	11,812	273605
	1,182	27748	11,812	272512
Mittelwert		27835,33		273045,00
realsdv [%]		0,26		0,39
var (yc)		5256,67		1150579,60
	2,953	68608	14,765	340710
	2,953	68969	14,765	341142
	2,953	68781	14,765	342882
	2,953	68340	14,765	342338
	2,953	68695	14,765	341839
	2,953	69184	14,765	341840
Mittelwert		68762,83		341781,83
realsdv [%]		0,43		0,23
var (yc)		85515,77		616790,57

Tab. 10.6 Messdaten der Systempräzision von Hyperforin (Standard)

	Konzentration Hyperforin 95,8% [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hyperforin	Konzentration Hyperforin 95,8% [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hyperforin
	7,60	174067	7,60	174255
	7,60	174732	7,60	174427
	7,60	175633	7,60	175295
	7,60	174743	7,60	174797
	7,60	175099	7,60	175045
	7,60	175129	7,60	174462
Mittelwert	174807,00			
realsdv [%]	0,26			
var (yc)	208323,82			

Tab. 10.7 Messdaten der Systempräzision von Hyperforin (Extrakt)

	Konzentration Extrakt [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hyperforin	Konzentration Extrakt [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hyperforin
	261,3	226233	261,3	226667
	261,3	226603	261,3	227208
	261,3	226027	261,3	226766
	261,3	226603	261,3	227573
	261,3	226093	261,3	227130
	261,3	225991	261,3	227200
Mittelwert	226576,40			
realsdv [%]	0,30			
var (yc)	270426,04			

Tab. 10.8 Messdaten der Methodenpräzision von Hyperforin

<i>jeweils ca. 300 mg Extrakt /100 ml</i>	<i>Flächeneinheiten Hyperforin</i>		
	209369	228883	229846
	213817	229460	228752
	217138	228962	228383
	217625	229189	227501
	217095	229365	226836
	217645	229036	227631
Mittelwert	215448,17	229149,17	228158,17
realsdv [%]	1,77	0,11	0,42
var (yc)	6640255235,81	7501378280,95	7437544361,14
	211195	225297	218842
	209715	225744	218902
	208048	226377	219480
	208385	226707	219115
	210480	225793	219046
	210317	226428	217533
Mittelwert	209690,00	226057,67	218819,67
realsdv [%]	0,64	0,25	0,11
var (yc)	1536413,60	281560,67	447455,47
Mittelwert	221220,47		
realsdv [%]	1,50		
var (yc)	10150002,57		

Tab. 10.9 Messdaten der Kalibrierung von Hypericin (für Bestimmung im Extrakt)

	<i>Konzentration Hypericin [mg/100 ml]</i>	<i>Flächeneinheiten Hypericin</i>	<i>Konzentration Hypericin [mg/100 ml]</i>	<i>Flächeneinheiten Hypericin</i>
	0,052	5747	0,520	62071
	0,052	5885	0,520	62552
	0,052	5972	0,520	62093
	0,052	5722	0,520	61898
	0,052	5670	0,520	63123
	0,052	5888	0,520	62263
Mittelwert		5814,00		62333,33
realsdv [%]		2,02		0,71
var (yc)		13834,00		198485,87
	0,104	11863	1,301	160427
	0,104	11986	1,301	161073
	0,104	11874	1,301	159118
	0,104	12017	1,301	160480
	0,104	12167	1,301	160057
	0,104	11966	1,301	159772
Mittelwert		11978,83		160154,50
realsdv [%]		0,93		0,42
var (yc)		12297,37		450798,70
	0,260	29926	2,601	324062
	0,260	29691	2,601	325672
	0,260	30569	2,601	325109
	0,260	30435	2,601	325338
	0,260	31098	2,601	323796
	0,260	29739	2,601	325393
Mittelwert		30243,00		324895
realsdv [%]		1,83		0,24
var (yc)		306674,80		599093,60

Tab. 10.10 Messdaten der Systempräzision von Hypericin (Standard)

Konzentration Hypericin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hypericin	Konzentration Hypericin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hypericin
0,52	62071	0,52	63574
0,52	62552	0,52	62368
0,52	62093	0,52	62540
0,52	61898	0,52	62242
0,52	63123	0,52	62082
0,52	62263	0,52	62821
Mittelwert	62468,92		
realsdv [%]	0,30		
var (yc)	270426,04		

Tab. 10.11 Messdaten der Systempräzision von Hypericin (Extrakt)

Konzentration Extrakt[mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hypericin	Konzentration Extrakt[mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hypericin
501,6	189225	501,6	189664
501,6	189655	501,6	188281
501,6	188136	501,6	189657
501,6	189574	501,6	189601
501,6	188766	501,6	189881
501,6	189015	501,6	188209
Mittelwert	189138,67		
realsdv [%]	0,34		
var (yc)	412037,33		

Tab. 10.12 Messdaten der Methodenpräzision von Hypericin

jeweils ca. 300 mg Extrakt /100 ml	Flächeneinheiten Hypericin		
	141661	143172	146469
	141411	142542	147207
	141926	142884	144738
Mittelwert	141666,00	142866,00	146138,00
realsdv [%]	0,18	0,22	0,87
var (yc)	5017358105,67	5102739801,00	5340149535,00
	141097	142328	148259
	142768	143106	144659
	142575	141468	145927
Mittelwert	142146,67	142300,67	146281,67
realsdv [%]	0,64	0,58	1,25
var (yc)	5051975819,33	5062817481,00	5351804394,92
Mittelwert	141168,42		
realsdv [%]	0,94		
var (yc)	1751266,72		

## 10.2 Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der quantitativen HPLC-Bestimmung von Rutin, Hyperforin und Hypericin im FreisetzungsmEDIUM

Tab. 10.13 Messdaten der Kalibrierung von Rutin (FreisetzungsmEDIUM)

	Konzentration Rutin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Rutin	Konzentration Rutin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Rutin
	0,056	25035	0,562	236220
	0,056	25515	0,562	245439
	0,056	22847	0,562	239695
	0,056	21418	0,562	243503
	0,056	23235	0,562	237435
	0,056	26053	0,562	238126
Mittelwert		24017,17		240069,67
realsdv [%]		7,49		1,52
var (yc)		3232169,77		13259427,07
	0,112	46869	0,843	366252
	0,112	47546	0,843	370759
	0,112	44315	0,843	384005
	0,112	49863	0,843	368092
	0,112	44659	0,843	360816
	0,112	45872	0,843	373173
Mittelwert		46520,67		370516,17
realsdv [%]		4,42		2,12
var (yc)		4219074,67		61443858,17
	0,281	119163	1,125	488464
	0,281	120473	1,125	497273
	0,281	119977	1,125	483096
	0,281	116886	1,125	488962
	0,281	118487	1,125	505538
	0,281	120016	1,125	487694
Mittelwert		119167,00		491837,83
realsdv [%]		1,11		1,65
var (yc)		1749582,80		66095955,37

Tab. 10.14 Messdaten der Kalibrierung von Hyperforin (FreisetzungsmEDIUM)

	Konzentration Hyperforin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hyperforin	Konzentration Hyperforin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hyperforin
	0,063	21637	1,105	404996
	0,063	24864	1,105	406319
	0,063	23114	1,105	400920
	0,063	23759	1,105	406526
	0,063	22141	1,105	395153
	0,063	24376	1,105	402994
Mittelwert		23315,17		402818,00
realsdv [%]		5,41		1,07
var (yc)		1591323,77		18627110,80
	0,275	99727	1,380	517772
	0,275	103588	1,380	500141
	0,275	107338	1,380	503278
	0,275	106720	1,380	501493
	0,275	107766	1,380	501846
	0,275	107167	1,380	506170
Mittelwert		105384,33		505116,67
realsdv [%]		2,99		1,29
var (yc)		9936657,87		42646629,47
	0,564	212933	1,656	599410
	0,564	214154	1,656	614255

	0,564	210836	1,656	600296
	0,564	209132	1,656	601746
	0,564	209530	1,656	601292
	0,564	208066	1,656	595440
Mittelwert		210775,17		602073,17
realsdv [%]		1,12		1,06
var (yc)		5533296,17		40672800,17
	0,829	308817		
	0,829	306404		
	0,829	310534		
	0,829	303335		
	0,829	309753		
	0,829	314491		
Mittelwert		308889,00		
realsdv [%]		1,23		
var (yc)		14372450,00		

Tab. 10.15 Messdaten der Kalibrierung von Hypericin (Freisetzungsmedium)

	Konzentration Hypericin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hypericin	Konzentration Hypericin [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Hypericin
	0,00096	81024	0,01274	999460
	0,00096	70067	0,01274	996474
	0,00096	71934	0,01274	992018
	0,00096	68768	0,01274	995221
	0,00096	71276	0,01274	1022160
	0,00096	67345	0,01274	987371
Mittelwert		71735,67		998784,00
realsdv [%]		6,75		1,22
var (yc)		23478642,67		148192149,20
	0,00191	140362	0,03185	2578233
	0,00191	136008	0,03185	2539037
	0,00191	140173	0,03185	2559281
	0,00191	137592	0,03185	2520031
	0,00191	140376	0,03185	2508429
	0,00191	139923	0,03185	2528656
Mittelwert		139072,33		2538944,50
realsdv [%]		1,32		1,02
var (yc)		3375882,67		670387495,10
	0,00382	317955	0,07100	5499989
	0,00382	311952	0,07100	5576424
	0,00382	324405	0,07100	5468630
	0,00382	322777	0,07100	5632395
	0,00382	321947	0,07100	5663353
	0,00382	321892	0,07100	5395733
Mittelwert		320154,67		5539420,67
realsdv [%]		1,42		1,85
var (yc)		20659005,07		10517003391,47
	0,00637	498764	0,09555	7423208
	0,00637	519726	0,09555	7539068
	0,00637	506566	0,09555	7397577
	0,00637	524106	0,09555	7391518
	0,00637	509856	0,09555	7395528
	0,00637	512774	0,09555	7360211
Mittelwert		511965,33		7417851,67
realsdv [%]		1,78		0,85
var (yc)		83230993,07		3929481285,86

Tab. 10.16 Messdaten der Systempräzision von Rutin (Standard)

	Flächeneinheiten Rutin	Flächeneinheiten Rutin
	310774	328793
	328648	331358
	326046	334113
	330068	326320
	312455	319819
	319540	356048
Mittelwert	326998,50	
realsdv [%]	2,57	
var (yc)	70796348,90	

Tab. 10.17 Messdaten der Systempräzision von Hypericin (Standard)

	Flächeneinheiten Hypericin	Flächeneinheiten Hypericin
	1847505	1921486
	1835971	1871943
	1821562	1922588
	1895553	1887139
	1904782	1898300
	1885504	1895187
Mittelwert	1882293,33	
realsdv [%]	1,71	
var (yc)	1040813091,33	

### 10.3 Parameter der Kalibrierung und Validierung der HPLC-Analysenverfahren zur Bestimmung von Rutin, Hyperforin und Hypericin im Freisetzungsmedium

Tab. 10.18 Kalibrierparameter von Rutin, Hyperforin und Hypericin (Freisetzungsuntersuchungen)

Parameter	Rutin
Messbereich [mg/100 ml]	0,056 – 1,124
Anzahl der Kalibrierproben	36
Datenschwerpunkt	$E[xc] = 0,498 \text{ mg/100 ml}; E[yc] = 215354,8 \text{ AUC}$
Korrelationskoeffizient (r)	0,9996
Steigung/Empfindlichkeit (b1) [AUC / (mg/100 ml)]	439880,9
Kalibrierfunktion Rutin	$y(x) = 439880,9 [x-0,498] + 215354,8$
Parameter	Hyperforin
Messbereich [mg/100 ml]	0,063 – 1,656
Anzahl der Kalibrierproben	42
Datenschwerpunkt	$E[xc] = 0,839 \text{ mg/100 ml}; E[yc] = 308338,8 \text{ AUC}$
Korrelationskoeffizient (r)	0,9997
Steigung/Empfindlichkeit (b1) [AUC / (mg/100 ml)]	362155,5
Kalibrierfunktion Hyperforin	$y(x) = 362155,470 [x-0,839] + 308338,786$
Parameter	Hypericin
Messbereich [mg/100 ml]	0,00095 – 0,0960
Anzahl der Kalibrierproben	48
Datenschwerpunkt	$E[xc] = 0,0278 \text{ mg/100 ml}; E[yc] = 2192241$
Korrelationskoeffizient (r)	0,9997
Steigung/Empfindlichkeit (b1) [AUC / (mg/100 ml)]	78337612,3
Kalibrierfunktion Hypericin	$y(x) = 78337612,283 [x-0,0278] + 2192241,104$

Tab. 10.19 Validierparameter der HPLC-Bestimmung von Rutin, Hyperforin und Hypericin in Freisetzungsmedium

Parameter	relsdv [%]	
Rutin (Freisetzungsmedium)		
Systempräzision (n=12)	Extrakt	2,57
Erfassungsgrenze [mg/100 ml]		0,008
Bestimmungsgrenze [mg/100 ml]		0,025
Hyperforin (Freisetzungsmedium)		
Erfassungsgrenze [mg/100 ml]		0,004
Bestimmungsgrenze [mg/100 ml]		0,014
Hypericin (Freisetzungsmedium)		
Systempräzision (n=12)	Extrakt	1,71
Erfassungsgrenze [mg/100 ml]		0,000055
Bestimmungsgrenze [mg/100 ml]		0,000183

## 10.4 Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der quantitativen HPLC-Bestimmung der Zucker

Tab. 10.20 Messdaten der Kalibrierung von Fructose

	Konzentration Fructose [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Fructose	Konzentration Fructose [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Fructose
	48,416	106881	363,120	768625
	48,416	103185	363,120	771172
	48,416	109979	363,120	756673
	48,416	102234	363,120	785042
	48,416	106286	363,120	769513
	48,416	105566	363,120	774492
Mittelwert		105688,50		770919,50
relsdv [%]		2,62		1,19
var (yc)		7680708,30		84495450,70
	121,040	248570	486,150	1039991
	121,040	282386	486,150	1054850
	121,040	256483	486,150	1024069
	121,040	254536	486,150	1037625
	121,040	265733	486,150	1047104
	121,040	259686	486,150	1045268
Mittelwert		261232,33		1041484,50
relsdv [%]		4,52		1,00
var (yc)		139571298,67		108991233,10
	242,080	521404	605,200	1293495
	242,080	519168	605,200	1297674
	242,080	511717	605,200	1291910
	242,080	511301	605,200	1294128
	242,080	518345	605,200	1304955
	242,080	510281	605,200	1285928
Mittelwert		515369,33		1294681,67
relsdv [%]		0,93		0,49
var (yc)		23096734,67		40103795,47

Tab. 10.21 Messdaten der Kalibrierung von Glucose

	Konzentration Glucose [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Glucose	Konzentration Glucose [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Glucose
	48,312	116793	362,340	809210
	48,312	113684	362,340	824470
	48,312	110198	362,340	807400
	48,312	103400	362,340	827457
	48,312	108234	362,340	820244
	48,312	108144	362,340	833152
Mittelwert		110075,50		820322,17
realsdv [%]		4,26		1,25
var (yc)		21969039,90		104636748,17
	120,780	263786	484,060	1097284
	120,780	282386	484,060	1135421
	120,780	264720	484,060	1094109
	120,780	268459	484,060	1113959
	120,780	261786	484,060	1109925
	120,780	275154	484,060	1091835
Mittelwert		269381,83		1107088,83
realsdv [%]		2,94		1,49
var (yc)		62804120,97		271048992,17
	241,560	556764	603,900	1381612
	241,560	554540	603,900	1381361
	241,560	536661	603,900	1388807
	241,560	544436	603,900	1371313
	241,560	535429	603,900	1406909
	241,560	541820	603,900	1359961
Mittelwert		544941,67		1381660,50
realsdv [%]		1,64		1,15
var (yc)		80191267,47		253318064,70

Tab. 10.22 Messdaten der Kalibrierung von Saccharose

	Konzentration Saccharose [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Saccharose	Konzentration Saccharose [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Saccharose
	48,744	101681	365,580	779617
	48,744	101937	365,580	800856
	48,744	108925	365,580	786046
	48,744	115004	365,580	774572
	48,744	117853	365,580	803092
	48,744	111515	365,580	789531
Mittelwert		109485,83		788952,33
realsdv [%]		6,10		1,44
var (yc)		44558400,17		128870303,47
	121,860	264642	487,200	1070473
	121,860	268045	487,200	1059074
	121,860	276606	487,200	1064102
	121,860	256707	487,200	1079017
	121,860	262098	487,200	1067594
	121,860	249643	487,200	1073489
Mittelwert		262956,83		1068958,17
realsdv [%]		3,54		0,66
var (yc)		86417029,37		49428670,97
	243,720	527197	609,300	1341318
	243,720	525135	609,300	1334394
	243,720	514912	609,300	1320586
	243,720	534390	609,300	1348469
	243,720	534896	609,300	1334091
	243,720	518102	609,300	1335734

Mittelwert	525772,00	1335765,33
realsdv [%]	1,56	0,69
var (yc)	67344438,80	85462468,67

Tab. 10.23 Messdaten der Kalibrierung von Lactose

	Konzentration Lactose [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Lactose	Konzentration Lactose [mg/100 ml]	Flächeneinheiten Lactose
	48,572	106881	364,287	799603
	48,572	103185	364,287	808752
	48,572	109979	364,287	807484
	48,572	102234	364,287	792776
	48,572	106286	364,287	806774
	48,572	107959	364,287	798155
Mittelwert		106087,33		802257,33
realsdv [%]		2,75		0,80
var (yc)		8517859,47		40733864,67
	121,429	268584	486,828	1083657
	121,429	261410	486,828	1096728
	121,429	272039	486,828	1079437
	121,429	267189	486,828	1090401
	121,429	257855	486,828	1079076
	121,429	252093	486,828	1062186
Mittelwert		263195,00		1081914,17
realsdv [%]		2,83		1,09
var (yc)		55633184,40		139581114,17
	242,858	532477	607,145	1379416
	242,858	544774	607,145	1365427
	242,858	538779	607,145	1366072
	242,858	527133	607,145	1368992
	242,858	545828	607,145	1377859
	242,858	534245	607,145	1355026
Mittelwert		537206,00		1368798,67
realsdv [%]		1,36		0,66
var (yc)		53336825,60		80668795,87

Tab. 10.24 Messdaten der Systempräzision von Fructose, Glucose, Saccharose und Lactose (Standard)

Konzentration Fructose, Glucose, Saccharose, Lactose je ca. 370 mg/100 ml				
	Flächeneinheiten Fructose	Flächeneinheiten Glucose	Flächeneinheiten Saccharose	Flächeneinheiten Lactose
	785210	822772	830205	833387
	794190	848343	819054	830609
	789110	848746	797594	832710
	782427	834788	819638	813787
	784289	838924	809054	819328
	787072	853276	828637	823317
	789088	848129	795362	836161
	780777	840208	797132	816691
	790060	840602	823801	832235
	786760	826035	814877	816732
	791869	835791	799931	822683
	775962	893237	792075	820660
Mittelwert	786401,17	844237,58	810613,33	824858,33
realsdv [%]	0,64	2,13	1,70	0,94
var (yc)	25578854,15	322308461,72	190684996,06	60023445,33

Tab. 10.25 Messdaten der Systempräzision von Fructose, Glucose, Saccharose und Lactose (Extrakt)

Konzentration Extrakt ca. 250 mg/100 ml				
	Flächeneinheiten Fructose	Flächeneinheiten Glucose	Flächeneinheiten Saccharose	Flächeneinheiten Lactose
	773706	879675	387468	412871
	778820	877259	403108	407104
	776798	877959	384627	408622
	778892	860687	376569	417135
	797137	862457	369148	423648
	782062	865023	380838	394455
	792743	877311	395497	412420
	779471	853387	370198	405003
	780394	846990	363363	429317
	795282	840988	369950	429813
	800053	820152	376632	408880
	762150	808952	382116	403129
Mittelwert	783125,67	855903,33	379959,50	412699,75
realsdv [%]	1,41	2,71	3,04	2,59
var (yc)	122752942,79	536884703,88	133748127,73	114080054,75

Tab. 10.26 Messdaten der Methodenpräzision von Fructose

jeweils ca. 200 mg Extrakt /100 ml	Flächeneinheiten Fructose		
	615645	596827	604677
	625810	585825	593193
	607769	583783	596132
Mittelwert	616408,00	588811,67	598000,67
realsdv [%]	1,47	1,19	1,00
var (yc)	81806047,00	49226617,33	35589500,33
	597545	492021	590590
	600414	499541	582264
	609723	502988	590866
Mittelwert	602560,67	498183,33	587906,67
realsdv [%]	1,06	1,13	0,83
var (yc)	40532054,33	31451216,33	23898809,33
Mittelwert	581978,5		
realsdv [%]	7,32		
var (yc)	1613681293		

Tab. 10.27 Messdaten der Methodenpräzision von Glucose

jeweils ca. 200 mg Extrakt /100,0 ml	Flächeneinheiten Glucose		
	439212	448674	469797
	447273	446377	467121
	438656	450226	461634
Mittelwert	441713,67	448425,67	466184,00
realsdv [%]	1,09	0,43	0,89
var (yc)	23256924,33	3749952,33	17317119,00
	441261	425062	459614
	451784	440163	440830
	454078	455149	455112
Mittelwert	449041,00	440124,67	451852,00
realsdv [%]	1,52	3,42	2,17
var (yc)	46711909,00	226307994,33	96180364,00
Mittelwert	449556,83		
realsdv [%]	4,05		
var (yc)	125195286,50		

Tab. 10.28 Messdaten der Methodenpräzision von Saccharose

jeweils ca. 200 mg Extrakt /100,0 ml		Flächeneinheiten Saccharose	
	393398	371408	423899
	433743	397611	403683
	403656	366886	412431
Mittelwert	410265,67	378635,00	413337,67
realsdv [%]	5,11	4,38	2,45
var (yc)	439695526,33	275178553,00	102788197,33
	401344	365247	398690
	389513	368379	390884
	393137	395481	429801
Mittelwert	394664,67	376369,00	406458,33
realsdv [%]	1,54	4,42	5,07
var (yc)	36743464,33	276403764,00	423893474,33
Mittelwert	396621,72		
realsdv [%]	4,08		
var (yc)	412293986,45		

Tab. 10.29 Messdaten der Methodenpräzision von Lactose

jeweils ca. 200 mg Extrakt /100,0 ml		Flächeneinheiten Lactose	
	512755	467740	529850
	490261	499500	503446
	505662	456892	502610
Mittelwert	502892,67	474710,67	511968,67
realsdv [%]	2,29	4,66	3,03
var (yc)	132246914,33	490303061,33	239981285,33
	534803	454445	495602
	500737	424680	504047
	460361	468473	479582
Mittelwert	498633,67	449199,33	493077,00
realsdv [%]	7,47	4,98	2,52
var (yc)	1388720849,33	500094476,33	154415775,00
Mittelwert	488413,67		
realsdv [%]	4,50		
var (yc)	803538635,18		

Tab. 10.30 Messdaten der Wiederfindung von Fructose

Konz. Extrakt [mg/100 ml]	100,2	100,1	100,0
	Flächeneinheiten Fructose		
	461184	410716	442885
	457938	407161	458271
	459504	408433	458072
Mittelwert	459542,00	408770,00	453076,00
realsdv [%]	0,35	0,44	1,95
var (yc)	2635212,00	3244683,00	77902261,00
Ist-Gehalt [mg/100 ml]	9,45	8,41	9,32
Soll-Gehalt [mg/100 ml]	11,18	11,18	11,18
Wiederfindungsrate [%]	84,54	75,19	83,35
Wiederfindungsrate	Mittelwert	81,03	
	realsdv [%]	6,29	
	var (yc)	25,94	

Tab. 10.31 Messdaten der Wiederfindung von Glucose

Konz. Extrakt [mg/100 ml]	100,2	100,1	100,0
	<i>Flächeneinheiten Glucose</i>		
	437797	408587	463293
	446122	413767	475652
	444474	412114	465130
Mittelwert	442797,67	411489,33	468025,00
realsdv [%]	1,00	0,64	1,42
var (yc)	19433976,33	7000756,33	44471989,00
Ist-Gehalt [mg/100 ml]	8,61	8,01	9,09
Soll-Gehalt [mg/100 ml]	9,65	9,65	9,65
Wiederfindungsrate [%]	89,24	83,01	94,25
Wiederfindungsrate	Mittelwert	88,83	
	realsdv [%]	6,34	
	var (yc)	31,71	

Tab. 10.32 Messdaten der Wiederfindung von Saccharose

Konz. Extrakt [mg/100 ml]	100,2	100,1	100,0
	<i>Flächeneinheiten Saccharose</i>		
	375638	416857	415017
	410638	409127	427208
	394659	394457	382251
Mittelwert	393645,00	406813,67	408158,67
realsdv [%]	4,45	2,80	5,70
var (yc)	307021147,00	129453633,33	540560514,33
Ist-Gehalt [mg/100 ml]	7,98	8,24	8,27
Soll-Gehalt [mg/100 ml]	8,45	8,45	8,45
Wiederfindungsrate [%]	94,40	97,52	97,84
Wiederfindungsrate	Mittelwert	96,59	
	realsdv [%]	1,97	
	var (yc)	3,63	

Tab. 10.33 Messdaten der Wiederfindung von Lactose

Konz. Extrakt [mg/100 ml]	100,2	100,1	100,0
	<i>Flächeneinheiten Lactose</i>		
	401950	424897	429573
	415030	403060	434463
	424212	409962	403373
Mittelwert	413730,67	412639,67	422469,67
realsdv [%]	2,70	2,71	3,96
var (yc)	125165361,33	124591066,33	279490033,33
Ist-Gehalt [mg/100 ml]	8,27	8,24	8,44
Soll-Gehalt [mg/100 ml]	8,98	8,98	8,98
Wiederfindungsrate [%]	92,03	91,79	93,93
Wiederfindungsrate	Mittelwert	92,59	
	realsdv [%]	1,26	
	var (yc)	1,37	

## 10.5 Rezepturanhang

### Rezeptur Nr. 1 (Kapitel 4.2, Direkttablettierung der Extraktpulver)

Substanzen	Masse pro Kern [mg]
Extraktpulver (94 %)	319,15 (entspr. 300 mg nativ)
Cellactose	170,85
Tablettierhilfsmittel K	26,00
Magnesiumstearat	4,00
Tablettengewicht	520,00

### Rezeptur Nr. 2 (Kapitel 5.4.1, Rezeptur mit Kompaktat)

Substanzen	Masse pro Kern [mg]
Kompaktat (2 % Magnesiumstearat im Kompaktat, 8 kN/cm Kompaktierkraft)	319,15
Cellactose	150,05
Tablettierhilfsmittel K	26,00
Ac-Di-Sol	20,80
Magnesiumstearat	4,00
Tablettengewicht	520,00

### Rezepturen Nr. 3 und 4 (Kapitel 5.4.1, Rezeptur nach Rocksløh (1999a))

Substanzen	Nr. 3	Masse pro Kern [mg]	Nr. 4
Kompaktat (2 % Magnesiumstearat im Kompaktat, 8 kN/cm Kompaktierkraft)		325,50 (entspr. 300 mg nativ)	325,50 (entspr. 300 mg nativ)
Avicel PH 101		173,70	194,50
Ac-Di-Sol		20,80	-
Tablettengewicht		520,00	520,00

### Rezeptur Nr. 5 (Kapitel 5.4.1, Tablettierung von Kompaktat ohne Magnesiumstearat in der äußeren Phase der Rezeptur)

Substanzen	Masse pro Kern [mg]
Kompaktat (2 % Magnesiumstearat im Kompaktat, 8 kN/cm Kompaktierkraft)	325,50 (entspr. 300 mg nativ)
Avicel PH 101	168,50
Ac-Di-Sol	20,80
Cab-O-Sil M 5	5,20
Tablettengewicht	520,00

### Rezepturen Nr. 6 und 7 (Kapitel 5.4.2, Tablettierung von Extraktpulver)

	Ohne Magnesiumstearat in der äußeren Phase	Mit Magnesiumstearat in der äußeren Phase
Substanzen	Masse pro Kern [mg]	Masse pro Kern [mg]
Extraktpulver (94 %)	319,15 (entspr. 300 mg nativ)	319,15 (entspr. 300 mg nativ)
Avicel PH 101	174,85	172,25
Ac-Di-Sol	20,80	20,80
Cab-O-Sil M 5	5,20	5,20
Magnesiumstearat	--	2,60
Tablettengewicht	520,00	520,00

**Rezepturen Nr. 8-12 (Kapitel 5.4.2, Tablettierung von Kompaktat)**

	Nr. 8	Nr. 9	Nr. 10	Nr. 11	Nr. 12
<b>Substanzen</b>	<b>Masse pro Kern [mg]</b>				
Kompaktat (x = % Magnesiumstearat im Kompaktat)	320,84 x = 0,5 %	325,52 x = 2 %	335,05 x = 5 %	335,05 x = 5 %	330,37 x = 3,5 %
Avicel PH 101	170,56	165,88	156,35	158,95	161,03
Ac-Di-Sol	20,80	20,80	20,80	20,80	20,80
Cab-O-Sil M 5	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20
Magnesiumstearat	2,60	2,60	2,60	--	2,60
Tablettengewicht	520,00	520,00	520,00	520,00	520,00

## 10.6 Zusammenfassung der statistischen Parameter der Faktorenexperimente

Tab. 10.34 Wichtige statistische Parameter der mittleren Partikelgröße  $d_{50}$  der Kompaktate I 0044 und F 0015

Effekt	Berechnete Effekte $\pm s_{dv}$ (17 fg.)	p-Wert	Regressions- koeffizienten	Regressionskoeffizienten wiederberechnet
<b><math>d_{50}</math> Kompaktat I 0044</b>				
Durchschnitt	482,41 $\pm$ 18,01			
Konstante			482,41	471,82
M: Magnesium- stearat	11,56 $\pm$ 16,68	0,4977	5,78	
K: Kompaktier- kraft	186,33 $\pm$ 16,68	<0,0001	93,17	93,17
S: Granulier- siebgröße	238,00 $\pm$ 16,68	<0,0001	119,00	119,00
MM	-31,78 $\pm$ 28,88	0,2865	-15,89	
MK	12,67 $\pm$ 20,42	0,5433	6,33	
MS	9,83 $\pm$ 20,42	0,6363	4,92	
KK	-134,78 $\pm$ 28,88	0,0002	-67,39	-67,39
KS	13,00 $\pm$ 20,42	0,5329	6,50	
SS	136,22 $\pm$ 28,88	0,0002	68,11	68,11
<b><math>d_{50}</math> Kompaktat F 0015</b>				
Durchschnitt	574,07 $\pm$ 20,56			
Konstante			574,07	540,56
M: Magnesium- stearat	-13,00 $\pm$ 19,04	0,5038	-6,50	
K: Kompaktier- kraft	55,56 $\pm$ 19,04	0,0096	27,78	27,78
S: Granulier- siebgröße	283,22 $\pm$ 19,04	<0,0001	141,61	141,61
MM	-36,78 $\pm$ 32,97	0,2802	-18,39	
MK	-13,67 $\pm$ 23,31	0,5654	-6,83	

MS	14,83 ± 23,31	0,5331	7,42	
KK	-63,78 ± 32,97	0,0699	-31,89	
KS	28,17 ± 23,31	0,2435	14,08	
SS	70,56 ± 32,97	0,0471	35,28	35,28

Tab. 10.35 Wichtige statistische Parameter der Zerfallszeit kompaktathaltiger Tabletten I 0044 und F 0015

Effekt	Berechnete Effekte ± sdv (17 fg.)	p-Wert	Regressions- koeffizienten	Regressionskoeffizienten wiederberechnet
<b>Zerfallszeit Kompaktat I 0044</b>				
Durchschnitt	691,04 ± 87,42			
Konstante			691,04	683,59
M: Magnesium- stearat	268,56 ± 80,93	0,0041	134,28	134,28
K: Kompaktier-kraft	-185,56 ± 80,93	0,0349	-92,78	-92,78
S: Granulier- siebgröße	13,78 ± 80,93	0,8668	6,89	
MM	56,78 ± 140,18	0,6905	28,39	
MK	0,50 ± 99,12	0,9960	0,25	
MS	-163,33 ± 99,12	0,1177	-81,67	
KK	-94,22 ± 140,18	0,5105	-47,11	
KS	90,83 ± 99,12	0,3723	45,42	
SS	15,11 ± 140,18	0,9154	7,55	
<b>Zerfallszeit Kompaktat F 0015</b>				
Durchschnitt	583,00 ± 80,81			
Konstante			583,00	612,33
M: Magnesium- stearat	283,67 ± 74,81	0,0015	141,83	141,83
K: Kompaktier-kraft	-135,33 ± 74,81	0,0882	-67,67	-67,67
S: Granulier- siebgröße	-110,78 ± 74,81	0,1570	-55,39	
MM	95,67 ± 129,58	0,4704	47,83	
MK	71,67 ± 91,62	0,4449	35,83	
MS	-122,00 ± 91,63	0,2006	-61,00	
KK	-11,33 ± 129,58	0,9313	-5,67	
KS	27,67 ± 91,63	0,7663	13,83	
SS	3,67 ± 129,58	0,9778	1,83	

## 10.7 Firmenverzeichnis

Alexanderwerk AG, Postfach 10 01 63, D-42897 Remscheid

Alltech Associates, Inc., OI20002051 Wankegan Rd. Deerfield, IL 60015, USA

AMS GmbH, Heinrich-Heine-Str. 5, D-09557 Flöha

W. A. Bachofen Maschinenfabrik, Utengasse 15/17, CH-4002 Basel

Bandelin, Heinrichstr. 3-4, D-12207 Berlin

Bärlocher GmbH, Postfach 50 01 08, Riesstr. 16, D-80992 München

Bender & Hobein GmbH, Buchbrunnenweg 26, D-89081 Ulm-Jungingen

BIO-RAD GmbH, Heidemannstr. 164, D-80939 München

Cabot GmbH, Josef-Bautz-Str. 15, D-63457 Hanau

Degussa AG, Postfach 110533, D-60314 Frankfurt

Desaga GmbH, In den Ziegelwiesen 1-7, D-69153 Wiesloch

Elementar Analysensysteme GmbH, Donaustr. 7, D-63452 Hanau

Engelsmann AG, Frankenthaler Str. 137-141, D-67059 Ludwigshafen

Erweka GmbH, Ottostr. 20-22, D-63150 Heusenstamm

Extrasynthese, Z.I. Lyon-Nord-Impasse Jaquard, F-69726 Genay

Filk, Meißner Ring 1-5, D-09599 Freiberg

Finn-Aqua Santasalo-Sohlberg GmbH, Kalscheurener Str. 92, D-50354 Hürth

Finzelberg, Koblenzer Str. 48-54, D-56626 Andernach

The Fitzpatrick Company Europe, NV Entrepotstraat 8, B-9100 Sint-Niklaas

Freund Industrial Co., LTD, 2-14-2, Takadanobaba, Shinjuku-ku, J-160-0075 Tokyo

Gerteis Maschinen + Processingengineering AG, Stampfstr. 74, CH-8645 Jona

GFL GmbH, Otto-Brenner-Str. 3, D-21337 Lüneburg

HBM siehe Hottinger-Baldwin Meßtechnik

Heraeus Instruments GmbH, Postfach 1561, D-63450 Hanau

Heumann Pharma GmbH, Heideloffstr. 18-28, D-90478 Nürnberg

Hosokawa Bepex GmbH, Daimlerstr. 8, D-74211 Leingarten

Hottinger-Baldwin Meßtechnik GmbH, Im Tiefen See 45, D-64293 Darmstadt

IBM Deutschland GmbH, Pascalstr. 100, D-70569 Stuttgart

IKA (s. Janke und Kunkel)

Indena, Via Ripamonti 99, I-20141 Milano

Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Postfach 1263, D-79217 Staufen

Julabo Labortechnik GmbH, Eisenbahnstr. 45, D-77690 Seelbach

Kistler Instruments GmbH, Eulachstr. 22, CH-8408 Winterthur

Korsch Pressen AG, Breitenbachstr. 1, D-13509 Berlin

Krüss GmbH, Borstelet Chausee 85-99a, D-22453 Hamburg

Lehmann & Voss & Co., Postfach 30 34 24, D-20311 Hamburg  
Leybold-Heraeus AG, Bonner Str. 498, D-50051 Köln  
Lichtwer Pharma GmbH, Wallenroder Str. 8-10, D-13435 Berlin  
Macherey & Nagel, Neumann-Neander-Str. 6-8, D-52355 Düren  
Malvern Instruments GmbH, Rigipsstr. 19, D-71083 Herrenberg  
Manugistics, Inc., East Jefferson Street Rockville, MD 20852-4999, USA  
Meggle GmbH, Megglestr. 6-12, D-83512 Wasserburg  
Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, D-64271 Darmstadt  
Messer Griesheim GmbH, Fütingsweg 34, D-47805 Krefeld  
Metrohm GmbH & Co., In den Birken 3, D-70794 Filderstadt  
Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, D-35396 Gießen  
Microsoft GmbH, Edisonstr. 1, D-85716 Unterschleißheim  
Millipore GmbH, Hauptstr. 87, D-65760 Eschborn  
Müggenburg Extrakt GmbH, Immenhacken 3, D-24558 Henstedt-Ulzburg  
Perkin-Elmer GmbH, Postfach 10 11 64, D-88662 Überlingen  
Pharmatest Apparatebau, Postfach 11 50, D-63512 Hainburg  
Quarzlampengesellschaft GmbH Hanau (s. Heraeus Instruments GmbH)  
Riedel-de Haën AG, Wunsdorfer Str. 40, D-30918 Seelze  
Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstr. 1-5, D-76185 Karlsruhe  
Sartorius AG, Weender Landstr. 94-108, D-37075 Göttingen  
Schleicher & Schuell GmbH, Hahnestr. 3, D-37586 Dassel  
Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co., Willmar-Schwabe-Str. 4, D-76227 Karlsruhe  
Shimadzu Europa GmbH, Albert-Hahn-Str. 6-10, D-47269 Duisburg  
Sigma GmbH, Grünwalderweg 30, D-82041 Deisenhofen  
Vaisala, Marlowring 21, D-22525 Hamburg  
Varian GmbH, Alsfelderstr. 6, D-64289 Darmstadt  
VCH-Verlagsgesellschaft, Boschstr. 12, D-69469 Weinheim  
Vydac, 17434 Mojave, Hesperia, CA 92345 USA  
W.O.Electronics, Jubiläumsgasse 3, A-2103 Langenzersdorf  
Waters GmbH, Hauptstr. 87, D-65760 Eschborn  
West Company Deutschland GmbH, Stolbergerstr. 21-41, D-52249 Eschweiler  
Zscheile & Klinger, Stresemannstr. 268, D-22769 Hamburg

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Bauernfeind, Domdey, Dûchène, Eiden, Fichtl, Gmeiner, Haas, Habrich, Laufer, Lotter, Poschenrieder, Regenfus, Reimann, Schmidt, Schûmann, Stachel, Steglich, Thoma, Tiller, Wagner, Wanner, Weiß, Wûnsch, Zenk.

## Lebenslauf

26. Januar 1973	geboren in München als Sohn von Benedikt von Eggelkraut-Gottanka (Richter am Amtsgericht) und Renate von Eggelkraut-Gottanka, geb. Weigand
1979-1983	Robert-Bosch-Grundschule Gauting
1983-1992	Otto-von-Taube-Gymnasium Gauting
Juli 1992	Abitur
Oktober 1992- Oktober 1996	Pharmaziestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
September 1994	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1996	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 1996-April 1997	Praktikum an der Fakultät für Pharmazie der Universität Paris XI (URA CNRS 1218) Paris
Mai 1997-Oktober 1997	Praktikum in der Gerner Apotheke München
Oktober 1997	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar 1998	Approbation als Apotheker
Januar 1998	Beginn der Dissertation „Untersuchungen zur Zusammensetzung und Verarbeitung von Trockenextrakten aus <i>Hypericum perforatum</i> L.“ im Fach Pharmazeutische Technologie an der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. P. C. Schmidt
seit Juni 1998	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Tübingen
Juli 2001	Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie