

ANALYTIK UND TECHNOLOGISCHE OPTIMIERUNG
VON FILMTABLETTEN MIT EXTRAKTEN VON
***ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA* CHAM.**

DISSERTATION

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

2002

vorgelegt von

MARC SCHILLER

Tag der mündlichen Prüfung

28. Juni 2002

Dekan

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter

Prof. Dr. P. C. Schmidt

2. Berichterstatter

Prof. Dr. S. Laufer

Die vorliegende Arbeit entstand 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 nicht nur für die Schaffung optimaler Arbeitsbedingungen und seine ständige Bereitschaft zur Hilfe und zur Diskussion, sondern auch für seinen persönlichen und menschlichen Einsatz. Die Möglichkeit der Teilnahme an Weiterbildungsseminaren zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie, der Besuch von Kongressen und Seminaren und die Teilnahme an Exkursionen zu verschiedenen Firmen hat meinen technologischen Horizont erweitert und meine Begeisterung für das Gebiet der Pharmazeutischen Technologie gefördert. Dafür gebührt ihm mein Dank.

Ganz besonders danken möchte ich der Firma Boehringer Ingelheim KG, Ingelheim/Rhein, für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Den Herren Dr. Frieder März und Dr. Holger von der Heydt, Boehringer Ingelheim KG, Ingelheim/Rhein, danke ich für die gute Betreuung über die gesamte Zeit der Promotion, insbesondere während meiner Aufenthalte in Ingelheim und für ihre ständige Diskussionsbereitschaft bei den Treffen in Tübingen.

Der gesamten Abteilung ADD / Entwicklung CHC der Boehringer Ingelheim KG, Ingelheim/Rhein, danke ich für die stets freundliche Aufnahme während meiner vier Aufenthalte, besonderen Dank an Frau Claudia Müller für die Durchführung der DVS-Untersuchungen, an Frau Marita (Tammy) Wenskowsky für die hilfreiche Einweisung in die HPLC-Analytik und die Mithilfe bei der Validierung der Zuckermethode und Herrn Matthias Engel für ein immer offenes Ohr.

Der Firma Gerteis Maschinen+Processengineering, Jona, Schweiz, gebührt Dank für die Ermöglichung der Kompaktierversuche auf einem GMP Mini-Factor.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Robert Lammens, Bayer AG, Leverkusen, für die Überlassung der Abbildungen zum Walzenkompaktor und für seine immer freundliche Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Strähle, Lehrstuhl für Anorganische Chemie, gebührt ein großer Dank für die Ermöglichung der Durchführung der Röntgendiffraktometrieversuche.

Der Firma Dionex GmbH, Idstein, danke ich für die einmonatige kostenlose Überlassung des ASE-Gerätes zur Durchführung der Fraktionierungsuntersuchungen.

Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, samt seinen Mitarbeitern möchte ich einen großen Dank für die Ermöglichung der Durchführung der GC-MS-Analysen und der reibungslosen Organisation aussprechen.

Bei Frau Dr. Gudrun Roos, Lehrstuhl für Analytische Chemie der Eberhard-Karls-Universität, möchte ich mich für die Hilfe bei der Interpretation der Massenspektren bedanken.

Ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat Frau Rebecca Trach durch ihre große Mithilfe bei den Tablettier- und Coatingversuchen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen, den ehemaligen aber vor allem den derzeitigen, danke ich ganz herzlich für das sehr angenehme Arbeitsklima, unzählige Kochorgien, spannende Diskussionen über Fußball und andere Sportarten sowie für eine gute Zusammenarbeit und zahlreiche fachliche Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Harald Römpp für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts.

Bei Frau Renate Beer, Frau Martina Brenn, Herrn Roland Walker und Herrn Klaus Weyhing bedanke ich mich für ihre Unterstützung während meiner Zeit am Lehrstuhl.

Herzlichen Dank auch an meine Eltern, Großeltern und den Rest meiner Familie, die den privaten Rückhalt für das Gelingen dieser Arbeit darstellen.

Ganz besonders danken möchte ich Frau Susanne Plenio, die den Fortgang meiner Arbeit zu jedem Zeitpunkt nach Kräften unterstützt hat.

*Meinen Eltern und meiner
Familie in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet*

„Die Strasse gleitet fort und fort,
weg von der Tür, wo sie begann,
weit über Land, von Ort zu Ort,
ich folge ihr, so gut ich kann.“

J.R.R. Tolkien

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
2.	<i>Eschscholtzia californica</i> Chamisso	3
2.1.	Allgemeines, Verbreitung, Botanik	3
2.2.	Inhaltsstoffe	3
2.2.1.	Alkaloide	4
2.2.2.	Flavonoide	5
2.2.3.	Sonstige Inhaltsstoffe	6
2.3.	Pharmakologie	8
2.4.	Anwendung	9
3.	Analytik von Begleitstoffen	10
3.1.	Extraktfraktionierung	10
3.1.1.	Manuelle Fraktionierung durch Flüssig/Flüssig- Extraktion	10
3.1.2.	Beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE)	12
3.2.	Bestimmung von Pektinen	16
3.2.1.	Durchführung	17
3.2.2.	Ergebnisse der Pektinbestimmung	17
3.3.	Gerbstoffanalytik	19
3.3.1.	Methoden der Gerbstoffbestimmung	20
3.3.2.	Ergebnisse der Gerbstoffbestimmung	20
3.4.	Bestimmung von Kalium in pflanzlichen Trockenextrakten mit der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)	22

3.4.1.	Ergebnisse der Kaliumbestimmung	22
3.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	23
4.	Analytik der Zucker	25
4.1.	Quantifizierung der Zucker mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie mit gekoppelter gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD)	25
4.1.1.	HPLC-Methode	26
4.1.2.	Kalibrierung und Validierung der Methode	28
4.1.3.	Ergebnisse der Quantifizierung	29
4.2.	Hydrolyse der Zucker mit Trifluoressigsäure (TFA)	33
4.2.1.	Durchführung der TFA-Hydrolyse	33
4.2.2.	Ergebnisse	34
4.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse	35
5.	Analytik der organischen Säuren	37
5.1.	Quantifizierung organischer Säuren mit Hilfe der Ionenausschlusschromatographie und gekoppelter Lichtstredetektion (IEC-ELSD)	37
5.1.1.	HPLC-Methode	37
5.1.2.	Kalibrierung und Validierung der Methode	39
5.1.3.	Ergebnisse der Quantifizierung	41
5.2.	Bestimmung der organischen Säuren mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)	44
5.2.1.	Methode der GC-MS	44
5.2.2.	Überprüfung der Richtigkeit der Methode	45
5.2.3.	Ergebnisse der Quantifizierung	46
5.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse	50

6.	Physikalisch-chemische Charakterisierung der Extrakte	52
6.1.	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) der Extrakte	53
6.1.1.	Durchführung	54
6.1.2.	Ergebnisse der DSC-Untersuchungen	54
6.2.	Röntgendiffraktometrie der Extrakte	55
6.2.1.	Durchführung	56
6.2.2.	Ergebnis der Röntgendiffraktometrie	56
6.3.	Dynamische Wasserdampfsorptionsanalyse (DVS) der Extrakte	58
6.3.1.	Durchführung	58
6.3.2.	Ergebnisse der DVS-Untersuchungen	59
6.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	61
	Farbige Abbildungen	63
7.	Kompaktierung, Tablettierung, Coating und Stabilität der erhaltenen Filmtabletten	65
7.1.	Kompaktierung der Extrakte	66
7.1.1.	Einleitung	66
7.1.2.	Beobachtungen	68
7.2.	Pulvertechnologie, Partikelgrößenbestimmung	70
7.2.1.	Durchführung der pulvertechnologischen Bestimmungen	70
7.2.2.	Ergebnisse der Pulvertechnologie	71
7.2.3.	Durchführung der Partikelgrößenbestimmung	73
7.2.4.	Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung	73

7.3.	Tablettierung der Extrakte und Kompaktate mit anschließendem Coating der Tabletten	74
7.3.1.	Tablettierung	74
7.3.2.	Coating	79
7.4.	Stabilitätsuntersuchungen der Filmtabletten	79
7.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	83
8.	Entfernung von Ionen zur Verbesserung der Extrakteigenschaften	85
8.1.	Ionenaustausch und Sprühtrocknung der Extrakte	85
8.2.	DVS-Untersuchungen der modifizierten Extrakte	86
8.3.	Tablettierung und Coating	87
8.4.	Stabilitätsuntersuchungen der Filmtabletten	88
8.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	92
9.	Experimenteller Teil	94
9.1.	Materialien	94
9.2.	Allgemein verwendete Geräte	97
9.3.	Datenverarbeitung	98
9.4.	Analytische Verfahren	99
9.4.1.	Extraktfraktionierung durch Flüssig/Flüssig- Extraktion	99
9.4.2.	Extraktfraktionierung mit beschleunigter Lösemittlextraktion (ASE)	99
9.4.3.	Gehaltsbestimmung von Pektinen	100
9.4.4.	Gehaltsbestimmung der Gerbstoffe	102
9.4.5.	Gehaltsbestimmung von Kalium in pflanzlichen Trockenextrakten	103

9.4.6.	Gehaltsbestimmung der Zucker mit der Methode der Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD)	103
9.4.7.	Ionenausschlusschromatographie mit anschließender Lichtstreuendetektion (IEC-ELSD) zur Bestimmung des Gehalts von Citronen-, Äpfel- und Weinsäure in pflanzlichen Trockenextrakten	107
9.4.8.	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) zur Bestimmung der organischen Säuren in pflanzlichen Trockenextrakten	110
9.5.	Physikalisch-chemische Methoden	111
9.5.1.	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	111
9.5.2.	Röntgendiffraktometrie	113
9.5.3.	Messung der dynamischen Wasserdampfsorption (DVS)	113
9.6.	Galenische Methoden	114
9.6.1.	Walzenkompaktierung der Trockenextrakte von <i>Eschscholtzia californica</i> Cham.	114
9.6.2.	Partikelgrößenanalyse mittels Laserbeugung	117
9.6.3.	Böschungswinkelmessung	118
9.6.4.	Bestimmung des Hausnerfaktors	118
9.6.5.	Ionenaustausch mit Trockenextrakten von <i>Eschscholtzia californica</i> Cham.	118
9.6.6.	Sprühtrocknung der von Ionen befreiten Extrakte	119
9.6.7.	Tablettierung der Extrakte und Kompaktate	120
9.6.8.	Bestimmung der Bruchfestigkeit von Tabletten	122
9.6.9.	Bestimmung der Zerfallszeit von Tabletten	122
9.6.10.	Coating der Extrakt- und Kompaktat-Tabletten	122
9.6.11.	Stabilitätsuntersuchungen von Filmtabletten	123

10.	Zusammenfassung	124
11.	Literaturverzeichnis	131
12.	Anhang	150
12.1.	Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der HPAEC-PAD- Bestimmung der Zucker in pflanzlichen Trockenextrakten	150
12.2.	Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der IEC-ELSD- Methode zur Quantifizierung der organischen Säuren in pflanzlichen Trockenextrakten	157
12.3.	Firmenverzeichnis	163

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
a.m.u.	atomare Masseneinheit
Art.-Nr.	Artikelnummer
ASE	accelerated solvent extraction (Beschleunigte Lösemittlextraktion)
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DSC	differential scanning calorimetry (Dynamische Differenzkalorimetrie)
DMS	Dehnungsmessstreifen
DVS	dynamic vapour sorption (Dynamische Wasserdampfsorption)
ELSD	evaporative light scattering detection (Lichtstreuungsdetektion)
et al.	et alii
Fa.	Firma
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Gl.	Gleichung
HPAEC	high performance anion exchange chromatography (Hochleistungsanionenaustauschchromatographie)
IEC	ion exclusion chromatography (Ionenausschlusschromatographie)
n.d.	nicht detektierbar
PAD	pulsed amperometric detection (Gepulste amperometrische Detektion)
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europea
r.F.	relative Feuchte
RID	refraktometrische Detektion
SPE	solid phase extraction (Festphasenextraktion)
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
VK	Variationskoeffizient (relative Standardabweichung)

Besondere Hinweise:

Die Fehlerbalken in den Abbildungen geben den 95%-Vertrauensbereich des Mittelwertes an.

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht beziehungsweise vorgestellt:

- M. Schiller, H. von der Heydt, F. März und P. C. Schmidt – „Quantification of sugars and organic acids in hygroscopic pharmaceutical herbal dry extracts“ – J. Chromatogr. A, zur Publikation angenommen
- M. Schiller, H. von der Heydt, F. März und P. C. Schmidt – „Enhanced processing properties and stability of film coated tablets prepared from roller-compacted and ion-exchanged *Eschscholtzia californica* Cham. dry extracts“ – STP Pharma, zur Publikation eingereicht
- M. Schiller, H. von der Heydt, F. März und P. C. Schmidt – „Determination of carbohydrate content of dry extracts from herbal drugs and comparison with their water sorption behaviour“ – Poster, DPhG Doktorandentagung Frankfurt/Main 2000, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 333, Suppl. 1, S. 27 (2000)
- S.G. von Eggelkraut-Gottanka, M. Schiller und P. C. Schmidt – „Dry granulation of plant dry extracts with a gap width and force controlled roller compactor“ – Poster und Vortrag, DPhG Doktorandentagung Frankfurt/Main 2001, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 334, Suppl. 1, S. 15 (2001)
- M. Schiller, H. von der Heydt, F. März und P. C. Schmidt – „Investigation of the cracking tendency of film coated tablets containing a plant dry extract“ – Poster, DPhG Jahrestagung Halle/Saale 2001, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 334, Suppl. 2, S. 82 (2001)
- M. Schiller, H. von der Heydt, F. März und P. C. Schmidt – „Cracking phenomenon of dry extract film coated tablets: What is the role of organic acids?“ – Poster, APV Jahrestagung Florenz, Italien 2002, Proc. 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV, S. 257-258 (2002)

KAPITEL 1

EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Phytopharmaka stellen in Deutschland und anderen mitteleuropäischen Ländern eine wichtige Gruppe von Arzneimitteln dar und gewinnen auch in Nordamerika ständig an Bedeutung (Tyler 1998). Obwohl nach dem Arzneiverordnungsreport (Schwabe 1999) die meisten pflanzlichen Arzneimittel zu den umstrittenen Arzneimittelgruppen in Bezug auf die Verordnungsfähigkeit gezählt werden, nimmt ihre Bedeutung in der Selbstmedikation leichter bis mittelschwerer Erkrankungen ständig zu. Dabei spielt das geringere Behandlungsrisiko durch eine im allgemeinen niedrigere Nebenwirkungsrate der Phytopharmaka im Vergleich zu synthetischen Arzneimitteln eine große Rolle. In einer repräsentativen Umfrage des Allensbacher Instituts für Demoskopie stuften im Jahre 1997 49% der Befragten pflanzliche Arzneimittel als wirksam ein, während lediglich ein Anteil von 8% diesen Präparaten eine Wirksamkeit absprach (Schulz und Hänsel 1999).

Schon seit geraumer Zeit wird diskutiert, ob die Gesamtextrakte aus einer Pflanze oder aus Pflanzenteilen als galenische Zubereitungen oder isolierte Reinsubstanzen im Rahmen einer Phytotherapie zum Einsatz kommen sollen (List et al. 1969). Spätestens seit dem sogenannten „Bühler-Papier“, das vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) 1995 verfasst wurde, gilt der pflanzliche Extrakt in seiner Gesamtheit als wirksamkeitsbestimmendes Prinzip in einer Therapie, sofern keine Inhaltsstoffe bekannt sind, die im isolierten Zustand denselben therapeutischen Erfolg zeigen wie der Gesamtextrakt. Aus diesem Grund gilt eine Standardisierung von Phytopharmaka als Grundvoraussetzung für eine reproduzierbare Wirksamkeit einer pflanzlichen Arzneizubereitung (Gaedcke und Steinhoff 2000).

Anders als bei einem synthetischen Arzneistoff, der bei Einhaltung bestimmter Bedingungen stets in gleicher überprüfbarer Beschaffenheit anfällt, ist bei pflanzlichen Rohprodukten von vornherein mit einer erheblichen Variabilität hinsichtlich ihrer Zusammensetzung zu rechnen.

Pflanzliche Begleitstoffe, die auf Grund dieser Schwankungen auch in den Extrakten in unterschiedlichen Anteilen auftreten, können die physikochemischen Eigenschaften der wirksamen Bestandteile und damit deren Bioverfügbarkeit beeinflussen (Eder und Mehnert 1998). Sie sind außerdem in der Lage, das physikalisch-chemische Verhalten der Extrakte, zum Teil in einem unzumutbaren Maße, zu verändern. Eine wichtige und vielzitierte Eigenschaft pflanzlicher Extrakte nach deren Trocknung ist ihre ausgeprägte Hygroskopizität (Shygarova et al. 1997), die Schwierigkeiten in der galenischen Weiterverarbeitung zu Kapseln oder Tabletten, wie beispielsweise das Kleben an Stempelwerkzeugen oder das Platzen von extrakthaltigen Filmtabletten, hervorrufen kann. Die hygroskopischen Erscheinungen und deren Folgen hängen im Wesentlichen von der Art und Konzentration der Begleitstoffe ab (Harnischfeger und Stumpf 1991).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung und Quantifizierung der für die starken hygroskopischen Eigenschaften verantwortlichen Begleitstoffe in verschiedenen Chargen eines Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. mit Hilfe chromatographischer Trenn- und Detektionsmethoden. Vergleichend dazu wird das Vorliegen der analysierten Substanzen in Extrakten anderer Pflanzen beschrieben, um dies mit den hygroskopischen Eigenschaften der Extraktzubereitungen zu korrelieren.

Mit der Methode der Walzenkompaktierung soll der Einfluss der Hygroskopizität auf die Verarbeitung unterschiedlicher Extraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. zu Kompaktaten und anschließend zu Filmtabletten untersucht werden. Abschließend sollen mit Hilfe von Stabilitätsuntersuchungen Aussagen über den Einfluss verschiedener pflanzlicher Inhaltsstoffe und unterschiedlicher Verarbeitungsschritte auf die hygroskopischen Eigenschaften und die Stabilität der erhaltenen Filmtabletten gemacht werden.

KAPITEL 2

ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA CHAMISSE

2.1 Allgemeines, Verbreitung, Botanik

Eschscholtzia californica Cham. ("Californian Poppy", Kalifornischer Goldmohn oder Schlafmützchen) stammt aus der Familie der Papaveraceen, die mit ihren 23 Gattungen und 200 Arten eine in der Pharmazie häufig verwendete Pflanzenfamilie darstellt. Kalifornischer Goldmohn zählt zu den wenigen saftfreien Pflanzen dieser Familie, enthält jedoch für Papaveraceen typische Inhaltsstoffe, wie z.B. Alkaloide, vergleichbar mit *Papaver somniferum* oder *Chelidonium majus*.

Die Pflanze *Eschscholtzia californica* Cham. ist ursprünglich im Südwesten Nordamerikas beheimatet und wird seit Mitte des 19. Jahrhunderts als Zierpflanze in Europa und Asien kultiviert (Kreis 1993). Das ein- bis mehrjährige Kraut erreicht eine Höhe von 0,3–0,6 m. Die hellgelben bis orangeroten Blüten mit einem Durchmesser von 2,5–3,5 cm sitzen auf langen Stielen. Die Blüten besitzen zahlreiche (13-47) Staubblätter, als Frucht wird eine längliche, 4–6 cm große schotenförmige Kapsel ausgebildet (Kreis 1993). Zur Gewinnung der pharmazeutisch genutzten Extrakte werden die zur Blütezeit gesammelten und getrockneten oberirdischen Teile der Pflanzen verwendet. Diese stammen entweder aus Wildsammlungen in Kalifornien und Neu-Mexiko oder werden aus kontrolliertem Anbau in Südfrankreich erhalten. Ein trockener und sandiger Boden wird für den Anbau von *Eschscholtzia californica* Cham. bevorzugt (Tomè et al. 1999).

2.2 Inhaltsstoffe

Als hauptverantwortlich für die in den Kapiteln 2.3 und 2.4 beschriebenen Wirkungen von *Eschscholtzia californica* Cham. wird die Gruppe der Alkaloide angesehen. Daneben sind jedoch Flavonoide, Gerbstoffe und andere, teilweise ubiquitäre Pflanzeninhaltsstoffe in *Eschscholtzia californica* Cham. enthalten.

2.2.1 Alkaloide

Rolland (1988) detektiert nach einer dünnschichtchromatographischen Trennung mit Hilfe von Dragendorffs Reagenz sieben Alkaloide in wässrigen und ethanologisch/wässrigen Extrakten des kalifornischen Goldmohns. Mit Hilfe einer Normalphasen-HPLC-Methode bestimmen Rey et al. (1991) Protopin und Californin (=Eschscholtzin) als Hauptalkaloide in den oberirdischen Teilen von *Eschscholtzia californica* Cham.. Im Rahmen einer Dissertation untersucht Von der Heydt (1994) das Vorkommen von Alkaloiden in ethanologisch/wässrigen Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. und findet einen Gesamtgehalt von 2,1–3,9%, wobei das Pavinalkaloid Californidin (Abb. 2-1) mit 0,7–1,9% den Hauptanteil ausmacht.

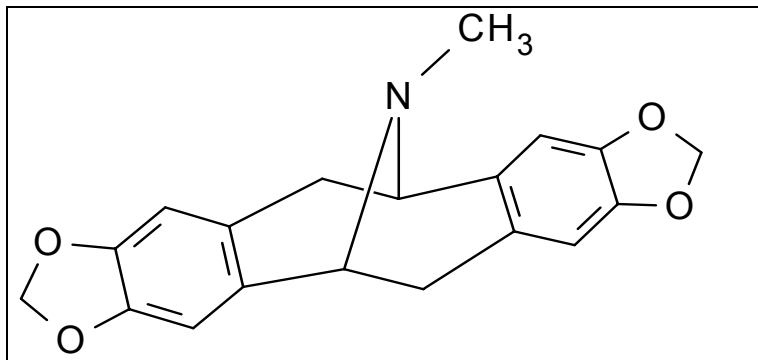


Abb. 2-1 Struktur von Californidin, Hauptalkaloid in *Eschscholtzia californica* Cham.

Daneben kommen noch Californin, die Protopinalkaloide α -Allocryptopin und Protopin, das Aporphinalkaloid Lauroschoztzin (=N-Methyl-laurotetanin) sowie weitere Pavinalkaloide vor. Die beiden Benzophenanthridine Sanguinarin und Chelerythrin stellen Nebenalkaloide dar. In einer späteren Arbeit (Beck 1999) wird eine Strukturaufklärung von Alkaloiden in *Eschscholtzia californica* Cham. durchgeführt und dabei in einem 30%-igen ethanologischen Extrakt lediglich Californidin, Californin und Lauroschoztzin gefunden. Jain et al. (1996 a) beschreiben erstmals die Trennung und Gewinnung von Cheilanthifolin, Hunnemanin und Norsanguinarin aus methanolischen Extrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. Tomè et al. (1999) vergleichen das Alkaloidspektrum von Pflanzen aus kontrolliertem Anbau mit dem wildgesammelter Pflanzen und bestimmen für die letztgenannten einen signifikant geringeren Alkaloidgehalt.

Einen umfassenden Überblick über die verschiedenen Alkaloide in *Eschscholtzia californica* Cham. geben Fabre et al. (2000), die diese mit Hilfe der Ionenpaarchromatographie trennen und mit einer Elektrospray-Massenspektrometrie-Methode identifizieren. Dabei werden die gefundenen Substanzen in die verschiedenen Klassen der Pavin-, Benzylochinolin-, Protopin-, Aporphin- und Benzophenanthridin-Alkaloide eingeteilt. Vincieri et al. (1988) zählen Alkaloide aus bestimmten Fraktionen einer Tinktur aus *Eschscholtzia californica* Cham. zu den wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen.

2.2.2 Flavonoide

Rolland (1988) beschreibt nach einer dünnschichtchromatographischen Trennung und der Detektion mit Naturstoffreagenz nach Neu das Vorkommen von Quercetin sowohl in wässrigen als auch ethanolisch/wässrigen Extrakten von *Eschscholtzia californica* Cham., während er Rutin als Inhaltsstoff ausschließt. Bei Von der Heydt (1994) werden mit Hilfe einer HPLC-Trennung und verschiedener Methoden der Strukturaufklärung im Gegensatz dazu sechs Flavonoide als Inhaltsstoffe von ethanolisch/wässrigen Extrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. identifiziert. Es handelt sich um Glykoside der Aglyka Quercetin, Isorhamnetin und Kämpferol, wobei das Quercetinrutosid (=Rutin, Abb. 2-2) den größten Anteil ausmacht. Der Flavonoid-Gehalt in den Extrakten liegt bei 2,5–5,5%.

Beck (1999) bestätigt die Ergebnisse und führt zusätzlich noch Monoglykoside von Isorhamnetin und Quercetin als Inhaltsstoffe des kalifornischen Goldmohns an. Jain et al. (1996 b) isolieren neben Quercitrin erstmals zwei methoxylierte Isoflavone aus methanolischen Extrakten von *Eschscholtzia californica* Cham.. Nach Strukturaufklärung mit Hilfe von ¹H-NMR-Spektroskopie geben Beck und Häberlein (1999) zusätzlich 6,8-Dihydroxyisorhamnetin als Inhaltsstoff in den oberirdischen Teilen der Pflanze an.

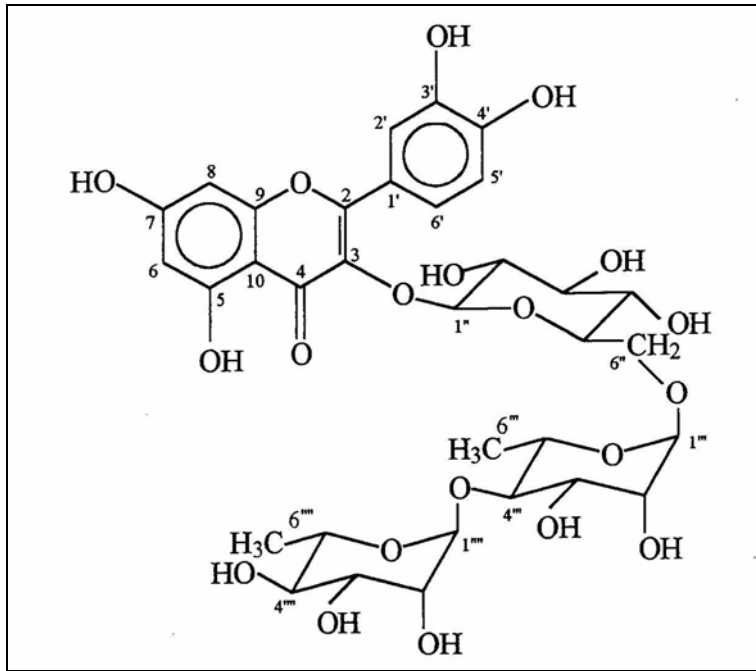


Abb. 2-2 Struktur des Hauptflavonoids Rutin

2.2.3 Sonstige Inhaltsstoffe

Neben den beiden Substanzgruppen der Flavonoide und Alkaloide, die nur einen sehr geringen Anteil in den Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. ausmachen, sind in den Extrakten andere Stoffgruppen in größeren Mengen vertreten, die eventuell für die starken hygroskopischen Eigenschaften verantwortlich gemacht werden können. Im Folgenden soll ein Überblick über die bislang bekannten und in der Literatur beschriebenen Pflanzeninhaltsstoffe in *Eschscholtzia californica* Cham. gegeben werden.

Als Kohlenhydrate werden bei Von der Heydt (1994) in ethanolisch/wässrigen Extrakten (DEV 4:1) lediglich Glucose und Fructose erwähnt, die nach einer halbquantitativen dünnschichtchromatographischen Bestimmung jeweils einen Gehalt von 3,5% im Extrakt aufweisen. Nach einer sauren Hydrolyse wird ein erhöhter Gehalt an Glucose und ein Auftreten von Rhamnose beobachtet, was sich mit der Freisetzung der Zucker aus den erwähnten Flavonoiden erklären lässt.

Des weiteren lassen sich in den Extrakten Aminosäuren als ubiquitäre Stoffwechselprodukte in Pflanzen nachweisen. Rolland (1988) bestimmt 23 Aminosäuren in Extrakten von *Eschscholtzia californica* Cham.. Von der Heydt (1994) bestimmt mit Hil-

fe einer flüssigchromatographischen Methode den Gesamtgehalt von insgesamt 20 verschiedenen Aminosäuren auf 1,9%. Dabei überrascht, dass die für die Alkaloidsynthese wichtigen Vorstufen Phenylalanin und Tyrosin mit nur 0,04 bzw. 0,07% einen sehr geringen Gehalt aufweisen. Beck (1999) bestimmt mit einer HPLC-Methode, der eine Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthalaldehyd zu Grunde liegt, ebenfalls 20 Aminosäuren in wässrigen Extrakten, wobei hier auch nicht essentielle Substanzen, wie γ -Aminobuttersäure (GABA) aufgeführt werden.

Von der Heydt (1994) quantifiziert in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. neben anderen Kationen Kalium mit einem Gehalt von 12%. Damit bestätigt er den von Rolland (1988) gefundenen hohen Kaliumgehalt von etwa zwei Prozent in der getrockneten Droge.

Bei Gerbstoffen handelt es sich ebenfalls um ubiquitäre Pflanzeninhaltsstoffe, die auch in Extrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. auftreten. Rolland (1988) findet mit Hilfe einer dünnschichtchromatographischen Methode in ethanolisch/wässrigen Extrakten lediglich hydrolysierbare Gallensäuregerbstoffe. Kondensierte Catechin-gerbstoffe sind nicht nachweisbar.

Des weiteren beschreibt Rolland (1988) die Bestimmung von organischen Säuren nach dünnschichtchromatographischer Trennung und Detektion mit Schweppes Reagenz. Es wird dabei lediglich das Vorliegen von Äpfelsäure in *Eschscholtzia californica* Cham. nachgewiesen. Das Vorkommen von Glucose-Estern verschiedener Pflanzensäuren, z.B. Ferula- oder Kaffeesäure, in Fumariaceen und Papaveraceen, u.a. in *Eschscholtzia californica* Cham., beschreibt Bögge (1996).

Für die Farbgebung der orangegelben Blütenblätter machen Maoka et al. (2000) unter anderem retro-Carotinoide (z.B. Eschscholtzxanthin) verantwortlich.

2.3 Pharmakologie

Über die Wirkungsmechanismen der Extrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. und Erfahrungen im klinischen Einsatz dieser Pflanze ist in der Literatur wenig bekannt. Es existieren jedoch einige Berichte über Versuche auf zellulärer Ebene oder an Tieren, die diese Effekte aufzuklären versuchen. Rolland et al. (1991) sprechen einem wässrigen Extrakt von *Eschscholtzia californica* Cham. sedative Effekte zu. Nach einer Schlafinduktion bei Mäusen durch die Gabe einer infra-hypnotischen Barbituratdosis verlängert sich die Schlafzeit nach intraperitonealer Gabe eines Extraktes aus kalifornischem Goldmohn signifikant. Außerdem soll der Extrakt in geringeren Dosen anxiolytische Eigenschaften besitzen. Vincieri et al. (1988) führen neben eines ebenfalls um 81% verlängerten Barbituratschlafs nach intraperitonealer Gabe einer Zubereitung, die aus einer ethanolisch/wässrigen Tinktur der Droge gewonnen wird, noch spasmolytische Effekte am isolierten Ratten-Jejunum an. Kleber et al. (1995) erklären die sedativen und hypnotischen Effekte ethanolischer Extrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. in Kombination mit Extrakten von *Corydalis cava* (Fumariaceae) mit einer Hemmung des enzymatischen Abbaus verschiedener Katecholamine und einer gehemmten Adrenalin synthese. Speziell die Dopamin- β -Hydroxylase und die Monoaminoxidase (MAO-B) werden durch Extrakte aus kalifornischem Goldmohn gehemmt, was zu einer Aufrechterhaltung hoher Katecholaminspiegel führt. Beck (1999) findet am GABA_A-Rezeptor den Benzodiazepinen vergleichbare sedative Wirkungen dreier Hauptalkaloide aus *Eschscholtzia californica* Cham..

Es finden sich jedoch nicht nur Beschreibungen sedativer Eigenschaften von *Eschscholtzia californica* Cham.. So liegen auch Angaben zu einer möglichen analgetischen Wirkung des kalifornischen Goldmohns vor. Lenfeld et al. (1981) schreiben den quartären Benzophenanthridin-Alkaloiden Sanguinarin und Chelerythrin, die in *Eschscholtzia californica* Cham. als Nebenalkaloide vorliegen, im Tiermodell antiinflammatorische Eigenschaften zu. Reimeier et al. (1995) untersuchen ethanolische *Eschscholtzia californica* Cham.-Extrakte in Kombination mit Extrakten aus *Corydalis cava* und finden eine modulierende Aktivität dieser Extrakte in Bezug auf die endogenen Pentapeptide Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin, die an opioide Rezeptoren des nozizeptiven Systems binden.

2.4 Anwendung

Extrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. sind als Bestandteile in pflanzlichen Sedativa in Kombination mit anderen Pflanzenextrakten enthalten. Seit einigen Jahren wird jedoch die Anwendung pflanzlicher Kombinationspräparate als kritisch eingestuft, solange kein Nachweis dafür erbracht wird, dass jeder arzneilich wirksame Bestandteil einen Beitrag zur Wirkung des Medikaments leistet (Schulz und Hänsel 1999).

Die Geschichte der medizinischen Anwendung des kalifornischen Goldmohns reicht bis zu den Ureinwohnern Amerikas zurück. Indianer, die im Gebiet von Kalifornien leben, verwenden noch heutzutage Abkochungen von *Eschscholtzia californica* Cham. gegen Kopfläuse. Um Kinder zum Einschlafen zu bringen, werden ein bis zwei Blütenblätter unter das Kissen gelegt (Bocek 1984). Diese Anwendungen scheinen allerdings auf Grund fehlender Untersuchungen wenig plausibel zu sein. Heutzutage wird die Pflanze *Eschscholtzia californica* Cham. vor allem in Frankreich wegen ihrer analgetischen und sedativen Eigenschaften in Form von Tinkturen oder Trockenextrakten eingesetzt (Schäfer et al. 1995). In Amerika werden Kindern bei Schlafstörungen Zubereitungen aus kalifornischem Goldmohn verordnet (Kreis 1993). Wagner (1999) beschreibt die sedierenden und spasmolytischen Eigenschaften der Pflanze und führt die Anwendung als schmerzstillendes Schlafmittel in der Kinderheilkunde an.

Die Wirksamkeit von Zubereitungen aus *Eschscholtzia californica* Cham. scheint bei den Anwendungsgebieten als Sedativum und Analgetikum plausibel, ist aber weder durch klinische Studien noch durch ausreichend dokumentiertes Erfahrungsmaterial belegt. In der Aufbereitungsmonographie der Kommission E der ehemaligen Zulassungsbehörde (Bundesgesundheitsamt, BGA) wird aus diesen Gründen eine therapeutische Anwendung nicht befürwortet (Bundesanzeiger 1991).

KAPITEL 3

ANALYTIK VON BEGLEITSTOFFEN

Pflanzliche Trockenextrakte stellen Vielstoffgemische dar (Eder und Mehnert 2000), die neben den wirksamkeitsrelevanten Inhaltsstoffen Begleitstoffe in unterschiedlicher Zusammensetzung enthalten. Ein Hauptgrund für die Schwankungen im Inhaltsstoffspektrum liegt in der natürlichen Variation der stofflichen Zusammensetzung der Ausgangsdroge, die zu einer breiten Streuung der Inhaltsstoffgruppen im daraus hergestellten Extrakt führt (Schmidt 1997). Ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit ist die qualitative und quantitative Bestimmung unterschiedlicher Begleitstoffe in verschiedenen Chargen von Trockenextrakten aus *Eschscholtzia californica* Cham., die einen Einfluss auf deren Verarbeitbarkeit besitzen können. Dabei sollen die Inhaltsstoffmuster der *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakte mit denen anderer Pflanzenextrakte verglichen werden. Nach einer Abschätzung des Anteils von Substanzen unterschiedlicher Polarität durch manuelle und automatisierte Extraktfraktionierung wird der Gehalt an Pektinen, Gerbstoffen und der Kaliumgehalt in den verschiedenen Pflanzenextrakten bestimmt. Auf die Gehaltsbestimmung der Kohlenhydrate wird in Kapitel 4 genauer eingegangen. Die Quantifizierung der organischen Säuren wird in Kapitel 5 ausführlich beschrieben.

3.1 Extraktfraktionierung

Um einen groben Überblick über die Anteile von Inhaltsstoffen unterschiedlicher Polarität in den verschiedenen Pflanzenextrakten zu bekommen, wird eine Extraktfraktionierung mit Lösungsmitteln steigender Polarität durchgeführt.

3.1.1 Manuelle Fraktionierung durch Flüssig/Flüssig-Extraktion

Merfort (1990) setzt eine Flüssig/Flüssig-Extraktionsmethode zur Fraktionierung von Inhaltsstoffen aus verschiedenen Arnika-Arten ein. Bei von Eggelkraut-Gottanka (2001) wird diese Methode für die Fraktionierung von Johanniskraut-Trockenextrakten

beschrieben. Dabei sollen die Extrakte mit Hilfe dreier verschiedener organischer Lösungsmittel in vier Stoffgruppen unterschiedlicher Polarität aufgetrennt und deren Anteil im Gesamtextrakt durch Wägung des jeweiligen Rückstandes bestimmt werden. Mit n-Hexan werden Fette, Terpene, Chlorophyll und andere apolare Inhaltsstoffe extrahiert, während mit Dichlormethan u.a. Flavonoidaglyka anfallen. Ethylacetat extrahiert auf Grund seiner Polarität monoglykosidische Flavonoide. In der wässrigen Phase verbleiben neben den sehr polaren Flavonoiddiglykosiden Zucker, organische Säuren, Salze, Alkaloide und andere sehr hydrophile Substanzen, die in den Extrakten auf Grund der überwiegend wässrigen oder wässrig/alkoholischen Extraktion vermehrt vorliegen.

3.1.1.1 Durchführung

Die wässrige Suspension der Trockenextrakte wird filtriert und in einem Scheidetrichter der Reihe nach mit n-Hexan, Dichlormethan und Ethylacetat extrahiert. Nach Einengen der organischen Phasen, Trocknung der verbleibenden wässrigen Phase und Wiegen der jeweiligen Rückstände kann eine Gesamtübersicht über die Polaritätsverteilung der Inhaltsstoffe in pflanzlichen Trockenextrakten erstellt werden. Nicht zuordenbare Anteile, d.h. die Differenz zwischen der eingesetzten und der ausgewogenen Menge, werden als sonstige Anteile aufgeführt.

3.1.1.2 Ergebnisse der Fraktionierung

In Abb. 3-1 ist das Ergebnis einer sechsfachen Fraktionierung von Charge ECC 614 des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. dargestellt. Die relativ hohen Konfidenzintervalle lassen die großen Schwankungen, die diese Methode mit sich bringt, erkennen. Ein großes Problem bei der Durchführung der Fraktionierung stellen unlösliche Substanzen dar, die sich während des Ausschüttelvorganges zwischen der wässrigen und der jeweiligen organischen Phase anreichern und eine genaue Auftrennung der beiden Phasen erschweren. Dies erklärt auch den großen Anteil an nicht zuordenbaren sonstigen Bestandteilen. Der Vergleich mit einem Extrakt von *Valeriana officinalis* zeigt, dass beim Trockenextrakt aus *Eschscholtzia californica* Cham. ein geringerer Anteil der Inhaltsstoffe der wässrigen Phase zugeordnet werden kann.

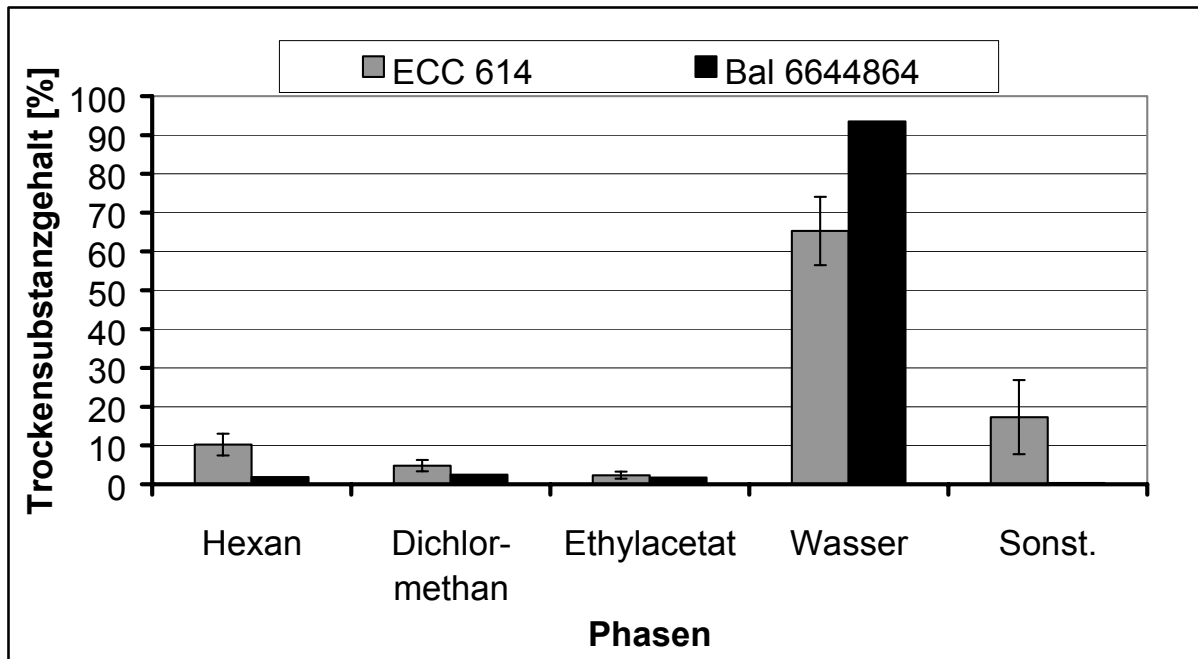


Abb. 3-1 Ergebnis der Extraktfraktionierung von Charge ECC 614 (n=6) im Vergleich zu einer Baldrianextraktcharge (Bal 6644864)

3.1.2 Beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE)

Neben der manuellen Fraktionierung wird die Fraktionierung mit Hilfe der beschleunigten Lösemittlextraktion (ASE) automatisch durchgeführt (Höfler et al. 1995). Die ASE stellt eine gängige Methode zur Extraktion umweltrelevanter Verbindungen aus Bodenproben dar (Höfler et al. 1999) und findet daher überwiegend auf diesem Gebiet ihren Einsatz (Richter et al. 1996). Allerdings gewinnt die ASE-Methode im pharmazeutischen Umfeld zunehmend an Bedeutung. Benthin et al. (1999) beschreiben eine Methode zur Extraktion fünf verschiedener Arzneipflanzen mit Hilfe der ASE. Bei der beschleunigten Extraktion können die gleichen Lösungsmittel verwendet werden, wie sie bei herkömmlichen Extraktionsmethoden zum Einsatz kommen, jedoch kann die Extraktionstemperatur bis 200 °C gesteigert werden. Durch einen erhöhten Druck von bis zu 20 MPa in den Extraktionszellen werden dabei die Lösungsmittel am Sieden gehindert. Außerdem wird dadurch das Eindringen von Lösungsmittel in Poren oder in zelluläre Bestandteile bei der Extraktion von Pflanzen gefördert. Die Extraktion bei erhöhtem Druck und erhöhter Temperatur resultiert zudem in einer gesteigerten Löslichkeit und erhöhten Diffusionsraten der verschiedenen Substanzen. Weitere positive Einflüsse auf das Extraktionsgeschehen haben erniedrigte Viskositäten, Oberflächen-

spannungen und Dielektrizitätskonstanten der Lösungsmittel. So wird die Dielektrizitätskonstante von Wasser bei einer Temperaturerhöhung auf 250 °C bis auf einen Wert von 27 im Vergleich zu 81 bei Raumtemperatur gesenkt (Miller und Hawthorne 1998). Dieser Wert liegt damit zwischen den Dielektrizitätskonstanten von Ethanol und Methanol (bei Raumtemperatur 33 bzw. 24), was die Extraktionseigenschaften von Wasser bei höherer Temperatur stark verändert.

3.1.2.1 Durchführung

Eine wesentliche Bedingung für die Durchführung der ASE mit verschiedenen Lösungsmitteln ist eine komplette Mischbarkeit eines Lösemittels mit dem vorhergehenden. Aus diesem Grund wird anstelle von Ethylacetat das mit Wasser vollständig mischbare Aceton verwendet, das in der eluotropen Reihe in direkter Nachbarschaft zu Ethylacetat steht (Trappe 1940). Nach Einfüllen der verschiedenen Extrakte in die Extraktionshülsen, Befüllung der Hülsen mit dem jeweiligen Lösungsmittel und vierminütiger Mazeration bei einer Temperatur von 70 °C und einem Druck von 100 bar, werden die Extrakte mit Hilfe von Stickstoff in die vorher gewogenen Auffanggefäße gespült. Um den Einfluss von Druck und Temperatur auf das Extraktionsgeschehen zu untersuchen, werden diese beiden Parameter variiert.

3.1.2.2 Ergebnisse der Extraktfraktionierung mit ASE

In Abb. 3-2 sind die Extraktfraktionen in den verschiedenen Trockenextraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. dargestellt. Der Vergleich mit der oben aufgeführten Methode der Flüssig/Flüssig-Extraktion zeigt bei Charge ECC 614 eine vergleichbare relative Verteilung der einzelnen Fraktionen, wobei die durch die ASE-Methode ermittelten Absolutmengen etwas geringere Werte annehmen. Die anderen Chargen zeigen ähnliche Verteilungen der Anteile unterschiedlicher Polarität. Der Gehalt an mit Wasser extrahierbaren Substanzen liegt zwischen 55% und 80%. Bei Charge ECC 604 liegt dieser Anteil mit nur etwa 35% sehr niedrig. Diese Charge besitzt auch eine relativ geringe Hygroskopizität und lässt sich im Vergleich zu den anderen Chargen besser verarbeiten. Allerdings lässt sich bei den anderen Extraktchargen keine Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an mit Wasser extrahierbaren Stoffen und der Hygroskopizität der Extrakte erkennen, denn Charge ECC 606, die sich sehr

schlecht verarbeiten lässt, zeigt einen geringen Anteil in der Fraktion der wasserlöslichen Stoffe.

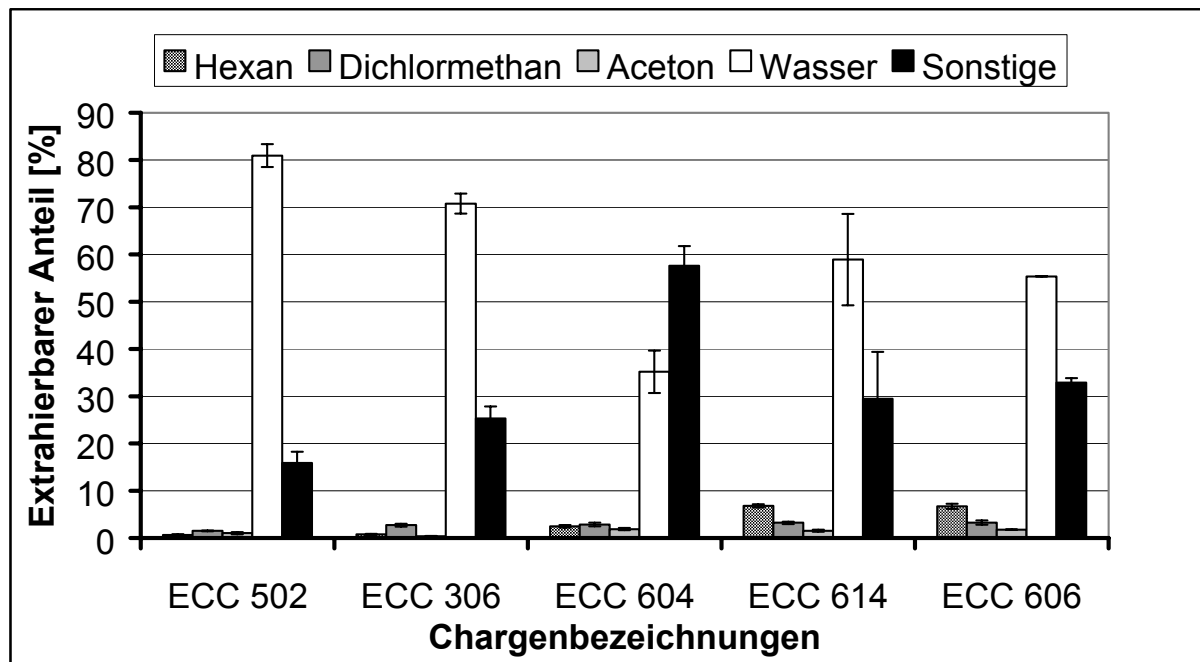


Abb. 3-2 Verteilung der Anteile unterschiedlicher Polarität in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. nach Fraktionierung mit ASE ($n=3$)

Dagegen lassen die Verteilungsmuster der Trockenextrakte anderer Pflanzen (Abb. 3-3) zwischen den einzelnen Pflanzenextrakten deutliche Unterschiede erkennen. Während einige Trockenextrakte bis zu 90% mit Wasser extrahierbare Substanzen enthalten (*Xysmalobium undulatum*, *Melissa officinalis*), liegen die Anteile der verschiedenen Fraktionen bei den Trockenextrakten von *Piper methysticum* (Kava-Kava) in einem beinahe ausgewogenen Verhältnis zueinander vor, wobei die Dichlormethanphase mit etwa 20% hier den größten Anteil ausmacht. Der Grund hierfür liegt in der Verwendung von 96%-igem Ethanol bei der Herstellung der Kava-Kava-Extrakte, während für die meisten anderen Pflanzen hydrophilere Methanol/Wasser- oder Ethanol/Wasser-Gemische für die Extraktion eingesetzt werden (siehe Kapitel 4.1.3).

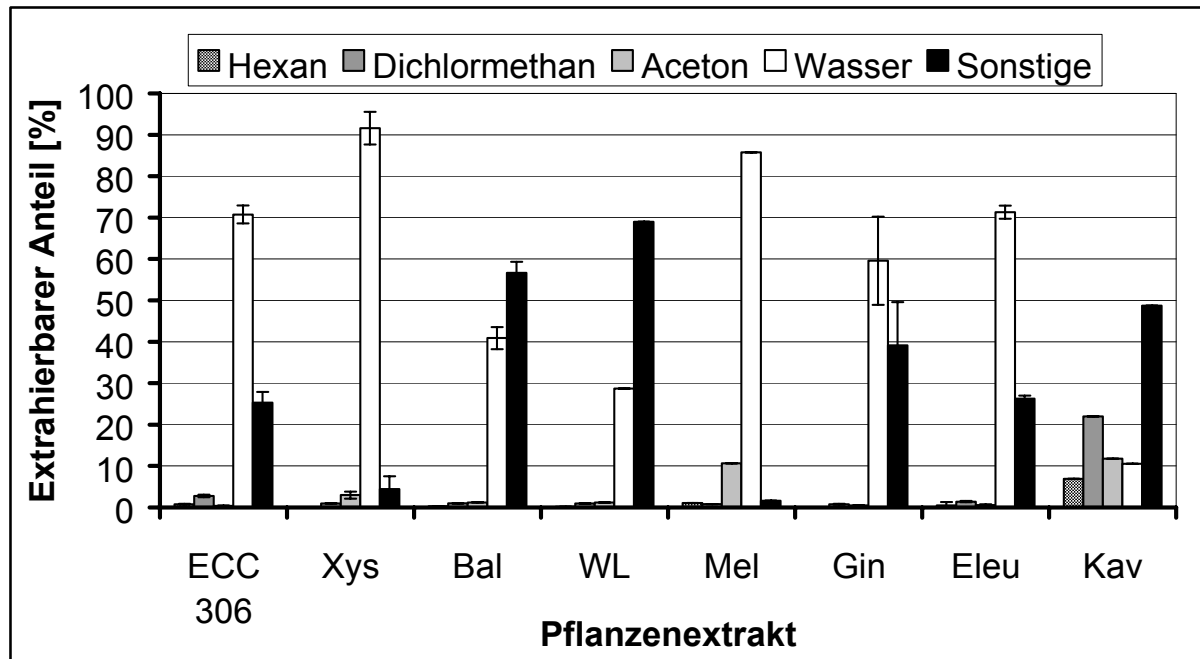


Abb. 3-3 Verteilung der Anteile unterschiedlicher Polarität in Trockenextrakten verschiedener Pflanzen nach Fraktionierung mit ASE (Xys=Xysmalobium, Bal=Baldrian, WL=Weinlaub, Mel=Melisse, Gin=Ginseng, Eleu=Eleutherococcus, Kav=Kava-Kava)

Den Einfluss von Druck und Temperatur auf die Ausbeuten der unterschiedlichen Fraktionen bei der beschleunigten Lösemittelextraktion einer Extraktcharge von *Vitis vinifera* zeigt Abb. 3-4.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Druck einen geringen Einfluss auf die Extraktion wasserlöslicher Stoffe besitzt, während durch eine Erhöhung der Temperatur von 50 auf 80 °C die Ausbeute der mit Wasser extrahierbaren Inhaltsstoffe von 35% auf etwa 80% gesteigert wird. Dies liegt darin begründet, dass in den Trockenextrakten keine zellulären Diffusionsvorgänge stattfinden müssen, bei denen eine Druckerhöhung zu einer gesteigerten Extraktausbeute führt. Vielmehr handelt es sich bei der Extraktion aus Trockenextrakten um reine Lösungsvorgänge, die fast ausschließlich von der Temperatur des Lösungsmittels abhängig sind. Hierbei spielt die Erniedrigung der Dielektrizitätskonstante des Wassers bei der vorgegebenen Temperaturerhöhung eine ganz entscheidende Rolle.

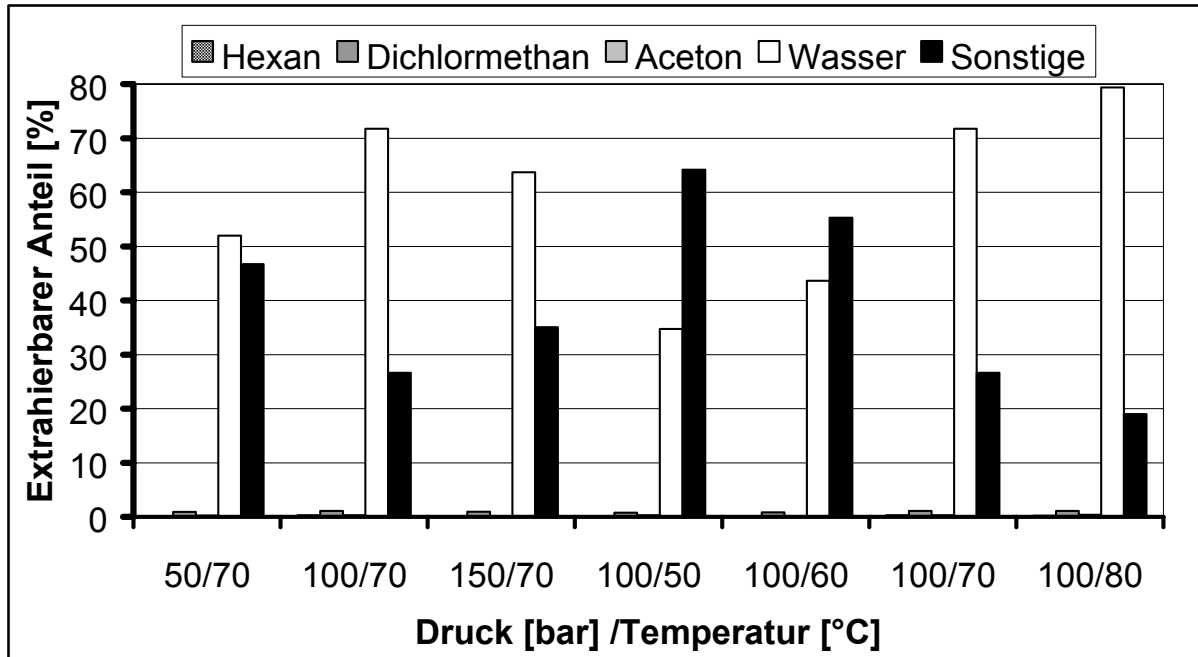


Abb. 3-4 Einfluss von Druck und Temperatur auf die Fraktionierung von *Vitis vinifera*-Trockenextrakt (Charge WL 97220311) bei der ASE

3.2 Bestimmung von Pektinen

Pektine sind Polyuronide, die hauptsächlich aus Galacturonsäureeinheiten bestehen. Diese sind teilweise mit Methanol verestert (Kertesz 1951). Daneben können wechselnde Mengen ungeladener Zucker, z.B. D-Galactose, L-Arabinose, oder L-Rhamnose in diesen Polysacchariden vorkommen. Pektine liegen ubiquitär in allen höheren Pflanzen vor und übernehmen dort in Zellwänden und in interzellulären Zwischenräumen die Aufgaben eines Bindematerials (Whistler und Smart 1953). Sie lassen sich mit verschiedenen Alkoholen fällen (Towle und Christensen 1973), so dass ihr Vorkommen in den mit Alkohol/Wasser-Gemischen hergestellten pflanzlichen Trockenextrakten aus diesem Grund limitiert sein sollte. Pektine werden trotzdem als mögliche Ursache für das hygroskopische Verhalten mancher Trockenextrakte berücksichtigt, da ihre Quellungs- und Gelbildungseigenschaften bekannt sind (Deuel und Stutz 1958).

3.2.1 Durchführung

Die Gehaltsbestimmung der Pektine beruht auf einer Farbreaktion, die erstmals von Dische (1947) beschrieben wird. Diese photometrische Methode wird überwiegend in der Lebensmittelanalytik zur Bestimmung des Pektingehaltes in Fruchtsäften und anderen pektinhaltigen Lebensmitteln eingesetzt (Matissek 1992). Dabei werden die Pektine zunächst mit heißem Ethanol gefällt und anschließend mit Natronlauge hydrolysiert. Anschließend werden die entstandenen Hexuronsäuren durch kurzes Erhitzen in konzentrierter Schwefelsäure zu 5-Formylbrenzschleimsäure umgesetzt, die nach Zusatz von Carbazol einen roten Farbstoff ergibt. Dieser wird bei einer Wellenlänge von 525 nm photometrisch gegen Kalibrierlösungen bestimmt (Stutz und Deuel 1956). Die genaue Einhaltung der Zeiten und Temperaturen bei der Durchführung dieser Konventionmethode ist entscheidend für die Aussagekraft des Ergebnisses (McComb und McCready 1952).

3.2.2 Ergebnisse der Pektinbestimmung

Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Kalibriergeraden, die durch die Bestimmung verschiedener Galacturonsäurelösungen unterschiedlicher Konzentration erstellt werden, durchgeführt (Abb. 3-5).

In Tab. 3-1 sind die ermittelten Kalibrierungs- und Validierungsparameter für die Bestimmung des Pektingehaltes aufgeführt.

Tab. 3-1 Ergebnisse der Kalibrierung und Validierung der Pektinbestimmung in pflanzlichen Trockenextrakten

<i>Parameter:</i>	<i>Ergebnis:</i>
Linearitätsbereich [$\mu\text{g/ml}$]	5-100
Korrelationskoeffizient	0,9989
Präzision (n=5)	3,95

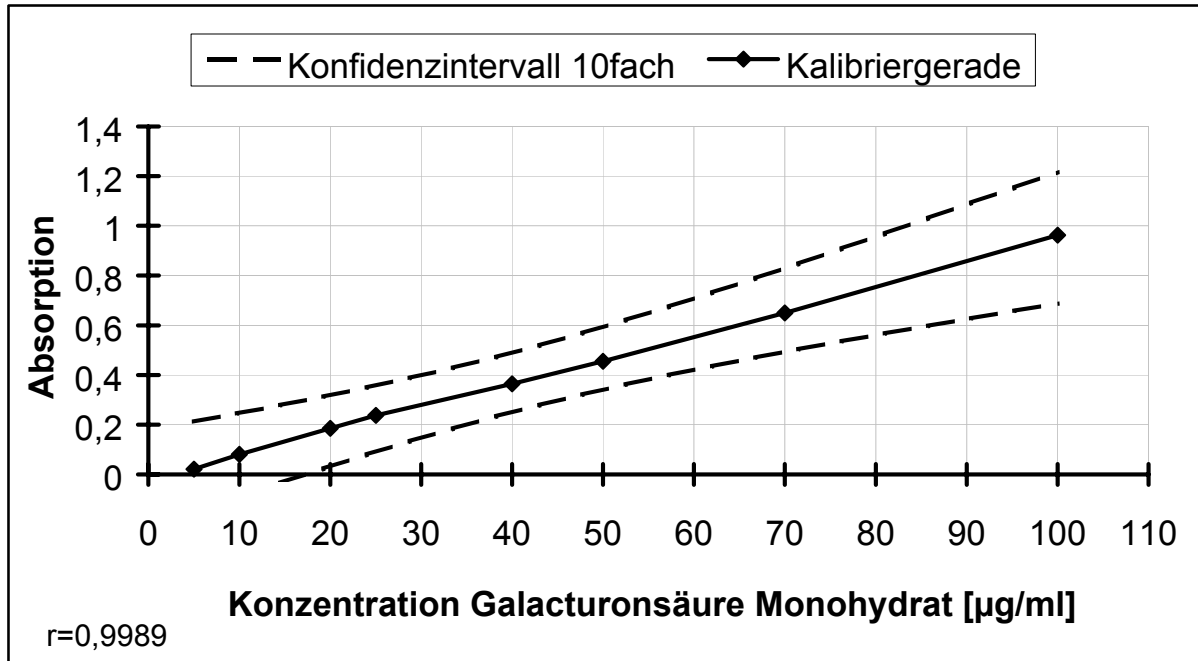


Abb. 3-5 Kalibriergerade für die photometrische Bestimmung des Pektingehaltes in pflanzlichen Trockenextrakten

Tab. 3-2 zeigt eine Übersicht über den gefundenen Pektingehalt in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. und anderer Pflanzen.

Tab. 3-2 Pektingehalt in pflanzlichen Trockenextrakten nach der photometrischen Bestimmung mit Hilfe der Carbazol-Farbreaktion

Pflanze	Extraktcharge	Pektingehalt in mg/g (\pm Standardabweichung)
<i>Eschscholtzia californica</i> Cham. (n=5)	ECC 502	7,2 (\pm 0,7)
	ECC 604	5,6 (\pm 0,3)
	ECC 606	5,1 (\pm 2,3)
	ECC 614	4,0 (\pm 0,6)
	ECC 306	4,8 (\pm 1,1)
Melisse	Mel 4640060	20,4
Kava-Kava	Kav 4641073	0,8
Weinlaub	WL 99220306	17,6
Eleutherococcus	Eleu 98221270	7,3
Baldrian	Bal 4641029	11,6
Ginseng	Gin 1254/426	3,5

Der Gehalt an Pektinen in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. liegt mit 4-7 mg/g (entspricht 0,4-0,7%) im Vergleich zu Extrakten anderer Pflanzen im mittleren Bereich des Spektrums. Während Extrakte anderer Pflanzen (z.B. *Melissa officinalis*) einen Pektingehalt von bis zu 2% aufweisen, enthalten Extrakte von *Piper methysticum* (Kava-Kava) auf Grund der rein ethanolischen Extraktion nur einen sehr geringen Pektingehalt.

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Methode hinsichtlich der Wiederfindungsrate, werden Trockenextrakten verschiedene Mengen an Apfelpektin zugesetzt und die ermittelten Mengen gegen die zugesetzten Mengen aufgetragen (Abb. 3-6). Hierbei zeigt sich eine gute Korrelation ($r=0,9983$), so dass von einer Wiederfindungsrate von annähernd 100% ausgegangen werden kann.

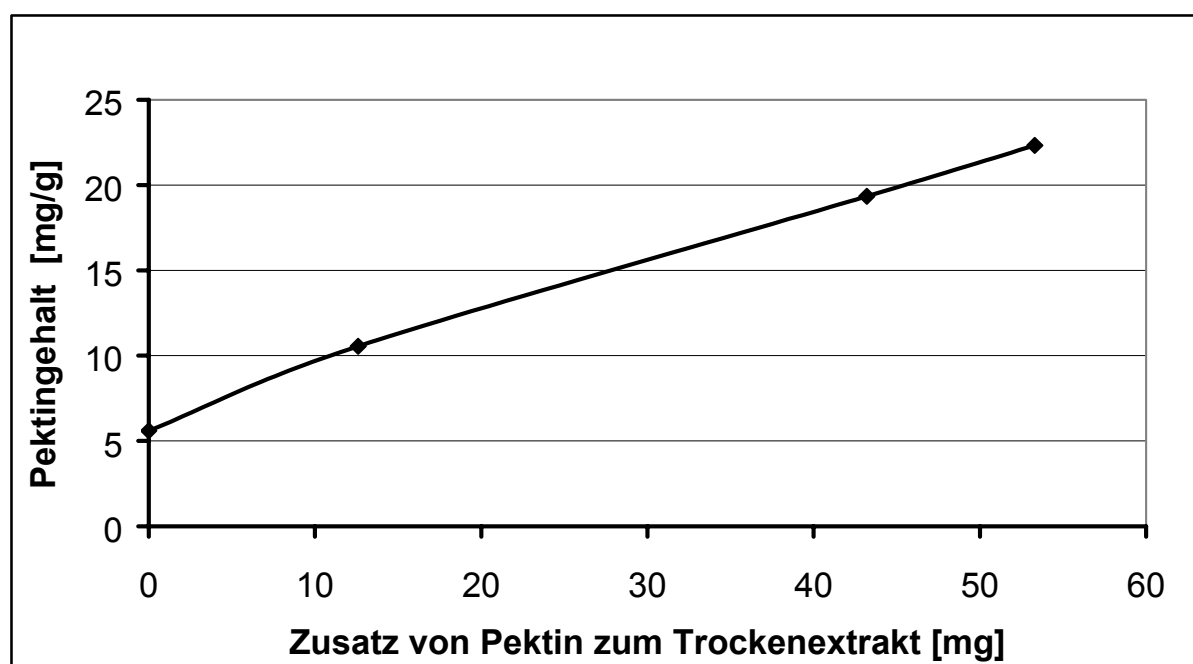


Abb. 3-6 Ermittlung der Wiederfindungsrate von Pektin in Trockenextrakt
ECC 306 nach photometrischer Gehaltsbestimmung

3.3 Gerbstoffanalytik

Gerbstoffe stellen eine häufig auftretende Stoffgruppe in Pflanzenextrakten dar. Sie lassen sich über verschiedene Bestimmungsmethoden quantifizieren, die je nach chemischer Zusammensetzung zu sehr unterschiedlichen Gerbstoffgehalten führen können (Lang und Wilhelm 1996). Die Gehaltsbestimmung der Gerbstoffe in pflanzlichen Ex-

trakten von *Hypericum perforatum* wird bei von Eggelkraut-Gottanka (2001) mit Hilfe der Hautpulvermethode durchgeführt. Coxon et al. (1972) bestimmen die Gerbstoffe in grünem Tee über eine HPLC-Methode. Um einen Überblick über das Vorliegen der Gerbstoffe in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. zu geben, werden im Folgenden zwei alternative Methoden der Gerbstoffbestimmung beschrieben.

3.3.1 Methoden der Gerbstoffbestimmung

3.3.1.1 Gehaltsbestimmung der Gerbstoffe unter Verwendung der Vanillin-Methode

Mit Hilfe der Vanillin-Methode werden sämtliche polyphenolischen Gerbstoffe erfasst. Dazu zählt sowohl die Gruppe der kondensierten Gerbstoffe (Bate-Smith 1975) als auch die Gruppe der hydrolysierbaren Gerbstoffe (Hashidoko 1996). Die Polyphenole werden mit dem Aldehyd Vanillin umgesetzt und das entstehende farbige Reaktionsprodukt photometrisch bestimmt.

3.3.1.2 Gehaltsbestimmung der kondensierten Gerbstoffe unter Verwendung der HCl-Methode

Bei dieser Methode wird im Gegensatz zur erstgenannten lediglich der Anteil der kondensierten Catechin-Gerbstoffe erfasst. Diese werden dabei zu Anthocyanidinfarbstoffen oxidiert und deren Gehalt photometrisch ermittelt.

3.3.2 Ergebnisse der Gerbstoffbestimmung

3.3.2.1 Ergebnisse der Vanillin-Methode

Den Gehalt an Gerbstoffen in Trockenextrakten verschiedener Pflanzen, bestimmt mit der Vanillin-Methode, zeigt Abb. 3-7. Die Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. zeigen dabei einen durchschnittlichen Gehalt von 0,2-0,3% und liegen damit im Vergleich zu anderen Pflanzenextrakten im mittleren Bereich des Spektrums. Die Extrakte von *Vitis vinifera* (Weinlaub) zeigen einen relativ hohen Gehalt an Gerbstoffen, der auch in der Literatur beschrieben ist (Souquet et al. 1996).

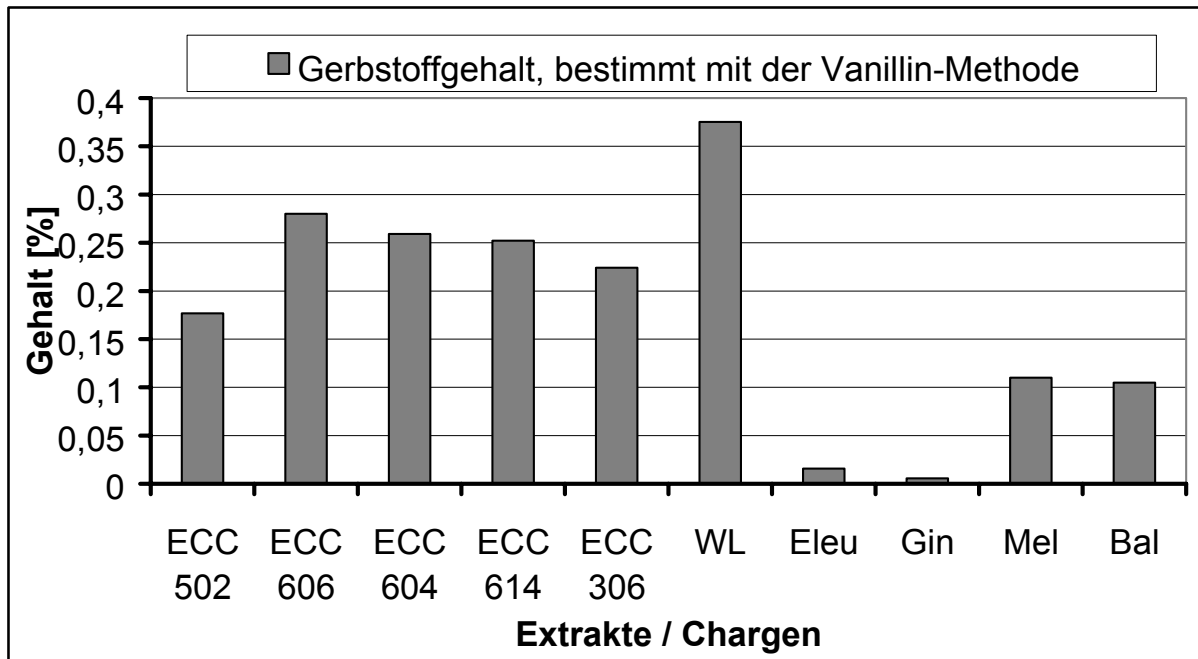


Abb. 3-7 Gehalt an Gerbstoffen in pflanzlichen Trockenextrakten, bestimmt mit der Vanillin-Methode (WL=Weinlaub, Eleu=Eleutherococcus, Gin=Ginseng, Mel=Melisse, Bal=Baldrian)

3.3.2.2 Ergebnisse der HCl-Methode

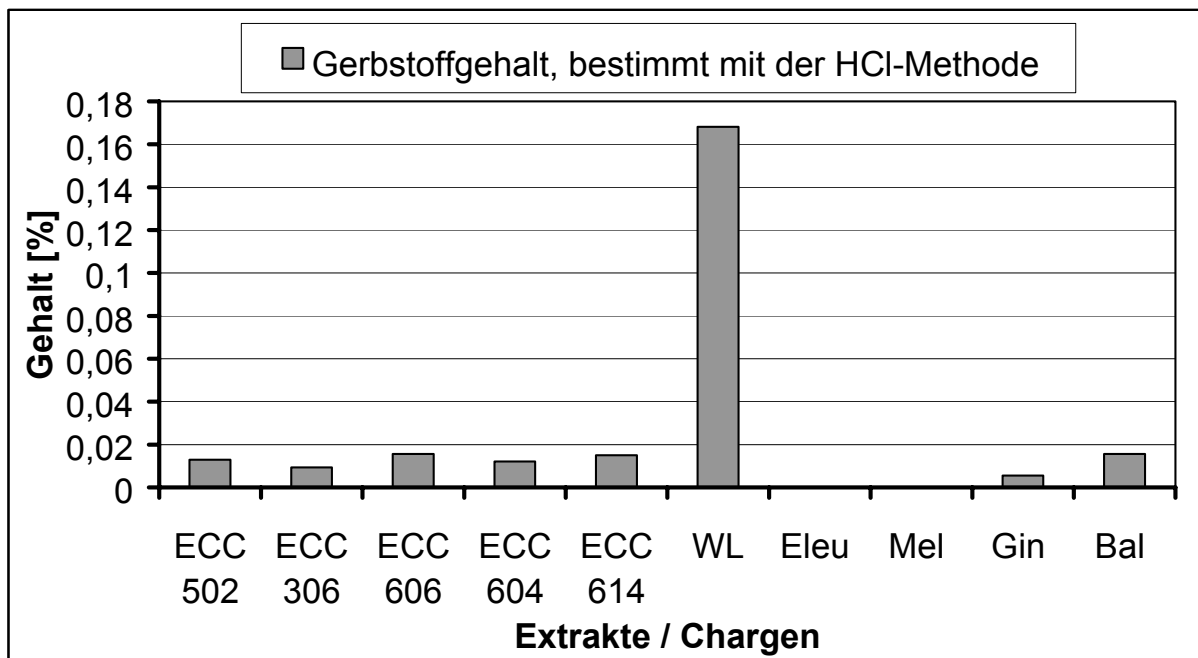


Abb. 3-8 Gehalt an Gerbstoffen in pflanzlichen Trockenextrakten, bestimmt mit der HCl-Methode

In Abb. 3-8 ist der Gerbstoffgehalt in pflanzlichen Trockenextrakten, ermittelt mit Hilfe der HCl-Methode, dargestellt. In den Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. finden sich verglichen mit der Vanillin-Methode niedrigere Werte (0,01-0,02%). Da bei der HCl-Methode nur die kondensierten Gerbstoffe erfasst werden, muss es sich bei den Gerbstoffen in den *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakten überwiegend um hydrolysierbare Gerbstoffe handeln. Der Gerbstoffgehalt in Trockenextrakten von *Melissa officinalis*, bestimmt mit den beiden beschriebenen Methoden, liegt bei sehr niedrigen Werten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Rosmarinsäure und andere in der Literatur beschriebene (Stahl-Biskup 1993), in Melisse-Arten häufig vorkommende Lamiaceen-Gerbstoffe, nicht miterfasst werden.

3.4 Bestimmung von Kalium in pflanzlichen Trockenextrakten mit der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Von der Heydt (1994) findet in einem Trockenextrakt von *Eschscholtzia californica* Cham. einen Kaliumgehalt von etwa 12% und führt diesen auf eine starke Düngung mit kaliumenthaltenden Düngemitteln zurück. Um einerseits den hohen Kaliumgehalt zu bestätigen und andererseits eventuell vorhandene Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen der Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. zu bestimmen, werden die fünf Extraktchargen mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) auf ihren Kaliumgehalt hin untersucht.

3.4.1 Ergebnisse der Kaliumbestimmung

Tab. 3-3 zeigt eine Übersicht über den Gehalt an Kalium in den fünf Trockenextraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham.. Mit Hilfe der Methode der AAS werden Werte ermittelt, die zwischen 8,8 und 12,7% liegen. Es handelt sich dabei um einen sehr hohen Anteil an Kalium in den Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. im Vergleich zu den Extrakten anderer Pflanzen (z.B. *Hypericum perforatum*, Ergebnis hier nicht gezeigt).

Tab. 3-3 *Gehalt an Kalium (in %) in Trockenextrakten von Eschscholtzia californica Cham., bestimmt mit der Atomabsorptionsspektroskopie*

<i>Extraktcharge</i>	<i>Kaliumgehalt [%]</i>	<i>Abs. Standardabweichung [%]</i>
ECC 502	10,51	0,11
ECC 604	12,72	0,16
ECC 606	8,84	0,08
ECC 614	11,23	0,12
ECC 306	12,49	0,17

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die mengenmäßige Bestimmung der nach ihrer Polarität fraktionierten Substanzklassen mit Hilfe der manuellen Flüssig/Flüssig-Extraktion im Scheidetrichter liefert Anhaltspunkte über das Inhaltsstoffspektrum der verschiedenen Trockenextrakte. Da diese Methode jedoch sehr zeitaufwendig ist und größere Unsicherheiten beinhaltet, wird eine automatisierte Extraktfraktionierung mit Hilfe der beschleunigten Lösemittelextraktion (ASE) durchgeführt. Hierbei können Proben über Nacht extrahiert werden, was den Zeitaufwand entscheidend erniedrigt. Mehr als einen groben Überblick über vorhandene Schwankungen des Inhaltsstoffspektrums kann dieses Verfahren allerdings nicht liefern. Man erkennt deutliche Unterschiede zwischen den Extrakten einzelner Pflanzen. Die Schwankungen innerhalb der Extrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. lassen sich jedoch nicht mit dem unterschiedlichen technologischen Verhalten korrelieren. Bei der ASE scheint die Temperatur einen größeren Einfluss auf die Extraktivstoffausbeute zu besitzen als der Druck.

Die Bestimmung des Pektingehalts in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. liefert Werte im Bereich von 0,4-0,7%. Diese können das starke hygroskopische Verhalten der Extrakte bei der Verarbeitung nicht erklären.

Die Quantifizierung der Gerbstoffe in den Trockenextrakten ergibt je nach Bestimmungsmethode sehr niedrige Werte von 0,01-0,3%. Daran ist erkennbar, dass diese Substanzgruppe ebenfalls keinen Einfluss auf die unterschiedliche Hygroskopizität der einzelnen Extrakte haben kann. Durch die Bestimmung dieser Substanzgruppen

kommt man allerdings dem Ziel einer möglichst vollständigen Charakterisierung aller Inhaltsstoffe in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. näher.

Besonders auffällig ist der sehr hohe Gehalt an Kalium (8,8-12,7%) in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham., der sich in anderen Pflanzenextrakten in diesem Ausmaß nicht findet. Die Frage stellt sich, warum *Eschscholtzia californica* Cham. diese großen Mengen an Kalium anreichert und welches die Gegenionen für Kalium darstellen. Eine Erklärung kann in den großen Mengen an Glycerinsäure gefunden werden, die in den Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. vorliegen (Kapitel 5.2).

KAPITEL 4

ANALYTIK DER ZUCKER

Die hygroskopischen Eigenschaften von Kohlenhydraten sind bekannt und in der Literatur beschrieben (Hancock und Shamblin 1998). Über das Vorkommen von Mono-, Oligo- und Polysacchariden in Pflanzen berichten Nuhn (1996) und Wagner (1999). In einem Trockenextrakt von *Eschscholtzia californica* Cham. bestimmt von der Heydt (1994) mit Hilfe einer semiquantitativen Dünnschichtchromatographie jeweils 3,5% Fructose und Glucose. Im Folgenden wird die Bestimmung der Kohlenhydrate in pflanzlichen Trockenextrakten mit Hilfe der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gekoppelter gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) beschrieben.

4.1 Quantifizierung der Zucker mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie mit gekoppelter gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD)

Die Bestimmungsmethode der Anionenaustauschchromatographie mit nachfolgender elektrochemischer Detektion (LaCourse 1997, Weiß 1991) wird vor allem für die Quantifizierung von Zuckern und Zuckeralkoholen eingesetzt. Die Methode der gepulsten amperometrischen Detektion kommt nicht nur im Anschluss an eine ionenaustauschchromatographische Trennmethode zum Einsatz. Hughes und Johnson (1982) verwenden diese Detektionsmethode nach Trennung der Kohlenhydrate mittels RP-HPLC. Auch die Trennung von Polysacchariden auf einer Größenausschlusschromatographie-Säule mit gekoppelter gepulster amperometrischer Detektion ist beschrieben (Dionex Technical Notes 83, 1992). In neuerer Zeit wird die Methode der amperometrischen Detektion mit Potentialpulsen auch für die Bestimmung von Kohlenhydraten nach kapillarelektrophoretischer Trennung eingesetzt (Weber und Lunte 1996).

4.1.1 HPLC-Methode

Die Quantifizierung von Zuckern mit Hilfe der HPAEC-PAD-Methode wird bei Lee (1990) beschrieben. Johnson et al. (1993) geben einen Überblick über den Einfluss verschiedener Parameter auf die Bestimmung und führen Anwendungsbeispiele für die Trennung und Quantifizierung von Kohlenhydraten an.

Probenaufarbeitung

Zur Separierung der Zucker aus den Trockenextrakten lassen sich prinzipiell zwei verschiedene Extraktionsmethoden durchführen, zum einen die Flüssig/Flüssig-Extraktion und zum anderen die Festphasenextraktion (SPE), wobei die geeignete Methode im Hinblick auf die Wiederfindungsraten ausgewählt werden soll. Bei der Probenaufarbeitung von Psilocin aus menschlichem Plasma haben Lindenblatt et al. (1998) im Vergleich zur Flüssig/Flüssig-Extraktion (88%) bei der SPE-Methode eine Wiederfindungsrate von etwa 100% realisieren können.

Für die im Folgenden beschriebene Aufarbeitungsmethode wird eine dreistufige Festphasenextraktionssequenz mit einer hydrophoben Kartusche in Kombination mit einer Anionen- und einer Kationenaustauscherkartusche in Anlehnung an eine Aufreinigungsmethode für Zucker nach Iuliano (1996) optimiert. Dabei werden nach Vorversuchen folgende Beobachtungen gemacht: Besteht die hydrophobe Kartusche aus einem C18-RP-Kieselgelmaterial, beträgt die Wiederfindung von Fructose, Glucose und Saccharose lediglich etwa 94% mit einem relativ hohen Variationskoeffizienten von etwa 9%. Ein Grund für die erniedrigten Wiederfindungsraten können hydrophile Wechselwirkungen der Kohlenhydrate mit noch teilweise vorhandenen freien Silanolgruppen im C18-Material sein. Wird hingegen ein Polymermaterial auf Polystyrol-Divinylbenzol-Basis eingesetzt (Isolute 101, Fa. Separtis), können zufriedenstellende Wiederfindungsraten erreicht werden (siehe Kapitel 4.1.2). Bei den beiden Ionenaustauscher-Kartuschen scheint das Ausgangsmaterial eine geringere Rolle zu spielen, da hier durch gewöhnliches Kieselgelmaterial die Wiederfindungsraten nicht erniedrigt werden.

Trennmethode

Die Methode der HPAEC nutzt die schwach sauren Eigenschaften von Kohlenhydraten für eine selektive Trennung von Zuckern bei hohen pH-Werten auf einer Anionenaustauschersäule. Die pK_s -Werte einiger Monosaccharide und Zuckeralkohole liegen im Bereich zwischen 12 und 13,7 (Dionex Technical Note 20, 1993).

Die Trennung der Zucker auf der Anionenaustauschersäule (CarboPac PA 100, Fa. Dionex) wird in Anlehnung an eine HPAEC-Methode von Yu Ip (1992) durchgeführt. Die Methode wird hinsichtlich der Auflösung optimiert. So hat sich eine 20 mM Natriumhydroxidlösung als optimale mobile Phase für die Trennung der Kohlenhydrate Glucose, Fructose und Saccharose herausgestellt. Im Anschluss an die eigentliche Analyse wird ein Spülvorgang mit 500 mM Natriumhydroxidlösung nachgeschaltet, um eventuell in der Analysenlösung vorkommendes Phosphat oder phosphatenthaltende Substanzen komplett von der Säule zu eluieren. Die Abwesenheit von Carbonat in der mobilen Phase ist eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der Analyse, da es unter Einwirkung von Carbonat zu extremen Verschiebungen bei den Retentionszeiten der Kohlenhydrate kommen kann. Aus diesem Grund werden während der gesamten Analysenzeit die Standgefäße für die mobile Phase mit Helium beaufschlagt. Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung der mobilen Phase findet sich bei Dionex Technical Note 20 (1993).

Detektionsmethode

Bei der HPLC-Analyse von Zuckern kann durch das Fehlen von Chromophoren eine direkte UV-Detektion nicht durchgeführt werden. Die Methode der gepulsten Amperometrie stellt eine schnelle und empfindliche Detektionsart für die Zucker-HPLC dar. Die gebräuchliche Methode für die Bestimmung von Kohlenhydraten, die Messung des Refraktionsindex (RI), wird für die Quantifizierung von Zuckern in pflanzlichen Trockenextrakten aus *Hypericum perforatum* beschrieben (von Eggelkraut-Gottanka 2001). Die RI-Methode bringt jedoch zwei Nachteile mit sich, zum einen die Unvereinbarkeit mit einer Gradientenelution und zum anderen die geringere Empfindlichkeit im Vergleich zur gepulsten amperometrischen Detektion (Martens und Frankenberger Jr. 1990, Shaw 1988). Swallow und Low (1990) bringen die Vorteile der Methode der

PAD gegenüber einer gaschromatographischen Zuckerbestimmung mit gekoppeltem Flammenionisationsdetektor zum Ausdruck.

Beim Anlegen eines oxidativen Potentials (50 mV) an eine Goldelektrode werden die Kohlenhydrate oxidiert (Johnson und LaCourse 1990). Anschließend wird mit Hilfe eines relativ hohen Oxidationspotentials von 750 mV die Elektrodenoberfläche komplett von Verunreinigungen befreit. Hierbei wird die Oberfläche der Goldelektrode komplett oxidiert. Das nachfolgende Anlegen eines reduktiven Potentials (-150 mV) führt zur Reduktion der Goldoberfläche. Mit Hilfe dieser wellenförmigen Potentialänderungen (Abb. 4-1) wird einer Verschmutzung der Anodenoberfläche vorgebeugt und die Häufigkeit einer manuellen Politur des Materials vermindert.

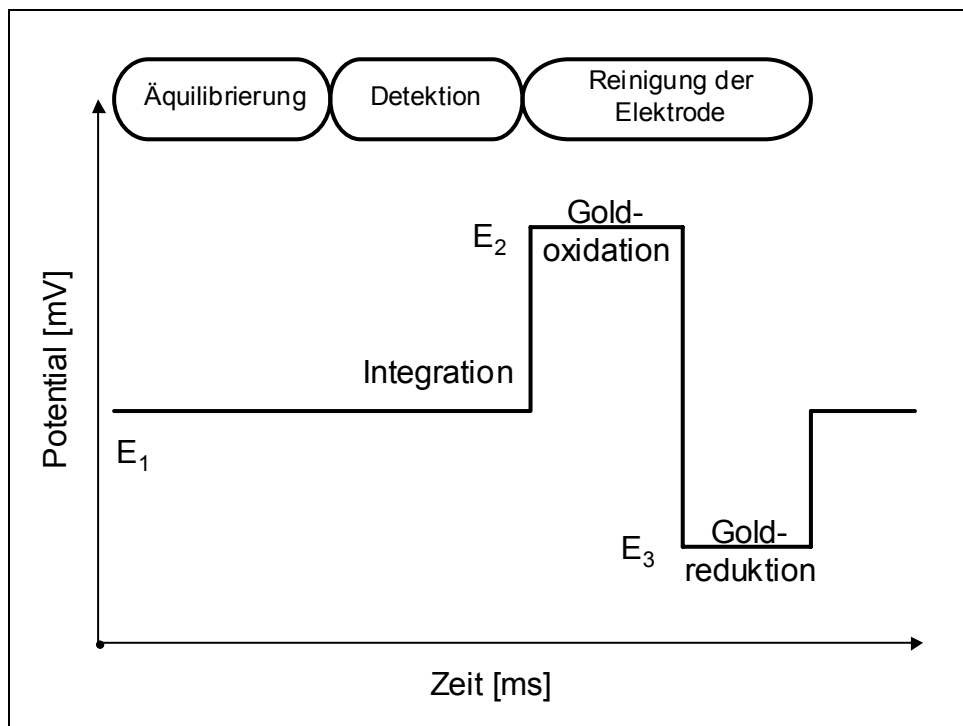


Abb. 4-1 Schematische Darstellung der Potentialsequenz bei der gepulsten amperometrischen Detektion

4.1.2 Kalibrierung und Validierung der Methode

Die Parameter der Kalibrierung und Validierung der HPLC-Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose sind in Tab. 4-1 angegeben.

Tab. 4-1 Kalibrierungs- und Validierungsparameter der HPAEC-PAD-Methode

Parameter	Glucose	Fructose	Saccharose
Retentionszeit [min]	9,8 – 10,2	13,0 – 13,3	16,0 – 16,8
Linearitätsbereich [mg/l]	0,15-52	0,7-70	0,7-68
Korrelationskoeffizient	0,99981	0,9998	0,99992
Steigung der Kalibriergeraden [AUC/(mg/l)]	25736	13644	9716
Systempräzision (n=6)	VK=1,46%	VK=0,25%	VK=0,57%
Methodenpräzision (n=6)	VK=1,88%	VK=1,31%	VK=3,54%
Intermediate precision (Reproduzierbarkeit) (n=12)	VK=2,06%	VK=2,26%	VK=5,24%
Bestimmungsgrenze [mg/l]	0,15	0,19	0,16
Wiederfindungsrate [%]	100,9	98,8	97,3

4.1.3 Ergebnisse der Quantifizierung

Ein typisches Chromatogramm für die Trennung der Kohlenhydrate Glucose, Fructose und Saccharose zeigt Abb. 4-2.

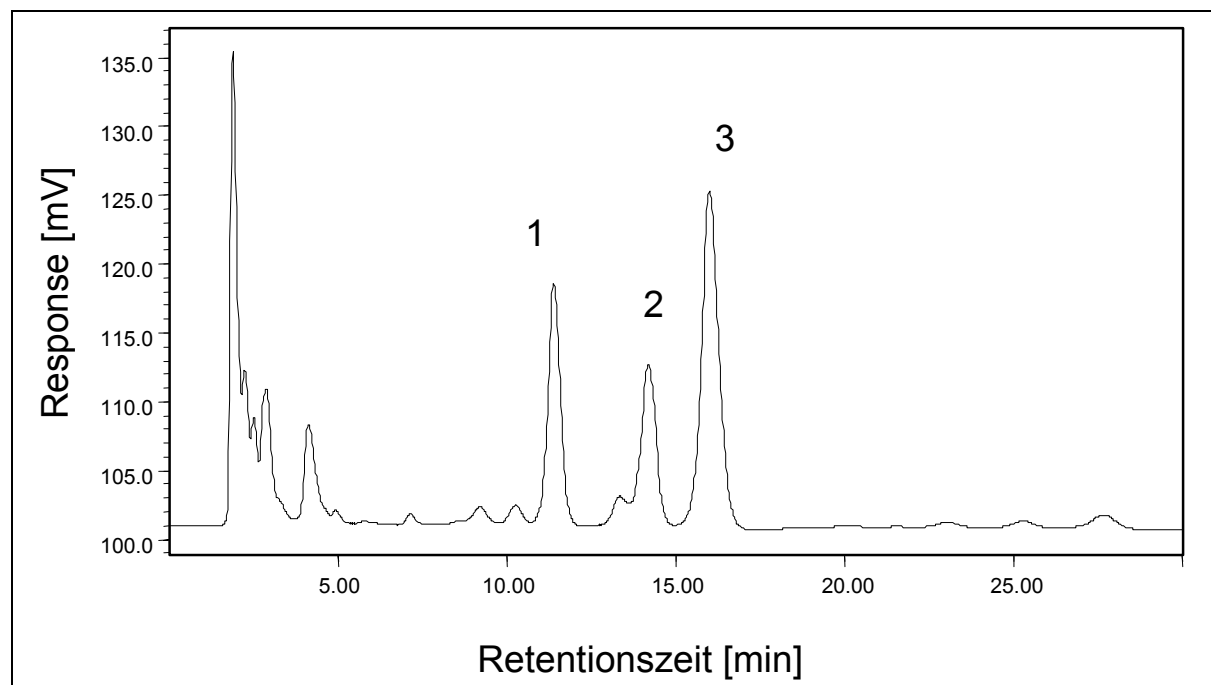


Abb. 4-2 Chromatogramm der Zucker Glucose (1), Fructose (2) und Saccharose (3) (Charge ECC 306)

Bei der Bestimmung der Trockenextrakte einiger Pflanzen treten beim Peak von Fructose unbekannte coeluiierende Zucker auf. Diese stören die Quantifizierung jedoch nicht, da eine Integration des Fructose-Peaks trotzdem möglich ist.

Auf Grund von geringen täglichen Schwankungen im Routineeinsatz der Methode, wird die Quantifizierung der drei Zucker mit Hilfe von externen Standardlösungen durchgeführt. In Abb. 4-3 ist der durchschnittliche Gehalt der drei Kohlenhydrate in den verschiedenen Chargen des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. dargestellt.

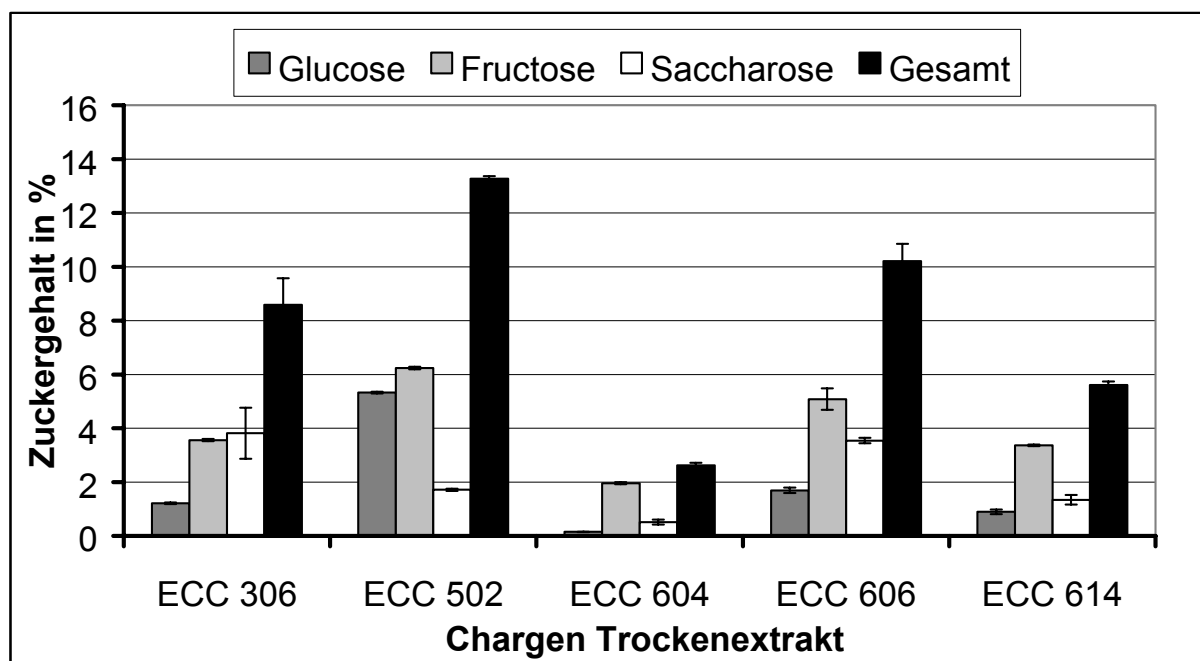


Abb. 4-3 Gehalt der drei Zucker Glucose, Fructose und Saccharose in verschiedenen Chargen von *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakt

Man kann große Schwankungen erkennen, die bei einem Gesamtzuckergehalt von 2,6-13% liegen. Außerdem lassen sich geringere Unterschiede in der Verteilung der Zucker erkennen. Fructose stellt mit 2-6% das Kohlenhydrat mit dem größten Anteil im Trockenextrakt dar.

In Tab. 4-2 sind die Zuckergehalte verschiedener Chargen eines Trockenextraktes von *Vitis vinifera* aufgeführt.

Tab. 4-2 Zuckergehalt in verschiedenen Chargen von *Vitis vinifera*-Trockenextrakten (Gehalt \pm Standardabweichung, $n=3$)

Charge	Glucosegehalt in %	Fructosegehalt in %	Saccharosegehalt in %	Gesamtzuckergehalt in %
WL 97220011	6,32 \pm 0,02	6,58 \pm 0,05	1,91 \pm 0,10	14,80 \pm 0,16
WL 97220311	4,48 \pm 0,06	3,87 \pm 0,01	< 0,1	8,39 \pm 0,10
WL 97221287	5,59 \pm 0,06	3,80 \pm 0,06	< 0,1	9,43 \pm 0,07
WL 98221121	2,69 \pm 0,05	2,20 \pm 0,07	< 0,1	4,95 \pm 0,06
WL 98220027	5,48 \pm 0,01	4,83 \pm 0,01	1,06 \pm 0,02	11,36 \pm 0,03
WL 99220306	5,25 \pm 0,05	4,44 \pm 0,04	0,85 \pm 0,07	10,53 \pm 0,01
WL 99220419	6,74 \pm 0,04	6,05 \pm 0,01	0,75 \pm 0,02	13,53 \pm 0,06
WL 99220599	6,73 \pm 0,04	5,83 \pm 0,07	2,25 \pm 0,10	14,80 \pm 0,13
WL 99220827	6,71 \pm 0,05	5,55 \pm 0,04	1,09 \pm 0,01	13,34 \pm 0,08
WL 00120167	8,13 \pm 0,06	6,67 \pm 0,06	n.d.	14,8 \pm 0,01
WL 00120168	3,66 \pm 0,01	2,86 \pm 0,01	n.d.	6,51 \pm 0,01
WL 102/99	6,29 \pm 0,03	5,39 \pm 0,03	0,45 \pm 0,05	12,43 \pm 0,11
WL 103/99	5,85 \pm 0,03	4,61 \pm 0,03	0,43 \pm 0,02	10,88 \pm 0,02

n.d. = nicht detektierbar

Der Gesamtzuckergehalt in den Weinlaub-Trockenextraktchargen liegt im Durchschnitt etwas höher im Vergleich zu den Extrakten von *Eschscholtzia californica* Cham.. Da Weinlaubextrakte jedoch eine geringere Hygroskopizität aufweisen als Extrakte von *Eschscholtzia californica* Cham., kann der Zuckergehalt allein keine hinreichende Erklärung für die unterschiedliche technologische Verarbeitbarkeit liefern. In Tab. 4-3 sind die Zuckergehalte der Trockenextrakte anderer Pflanzen aufgeführt. Auffällig ist der große Anteil an Saccharose in Trockenextrakten von *Valeriana officinalis*, *Panax ginseng* und *Xysmalobium undulatum*. Bei diesen Pflanzen werden die Wurzeln zur Herstellung der Trockenextrakte verwendet, so dass Saccharose als Speicherkohlenhydrat angesehen werden kann (Katovich et al. 1998).

Tab. 4-3 Zuckergehalt in verschiedenen Trockenextrakten unterschiedlicher Pflanzen (je Charge n=3)

Extrakt (Anzahl der Chargen)	Glucosegehalt in %	Fructosegehalt in %	Saccharosegehalt in %	Gesamtzuckergehalt in %
<i>Valeriana officinalis</i> (5)	1,2 – 6,3	1,7 – 7,3	18,7 – 25,1	26,0 – 33,8
<i>Xysmalobium undulatum</i> (3)	1,0 – 1,1	1,9 – 2,0	11,3 – 11,5	14,3 – 14,6
<i>Eleutherococcus senticosus</i> (4)	1,0 – 7,0	4,2 – 5,8	0,1 – 2,0	6,6 – 12,9
<i>Melissa officinalis</i> (2)	5,3 – 5,4	3,6 – 3,7	0,2 – 0,9	9,6 – 9,8
<i>Piper methysticum</i> (6)	0,3 – 1,7	0,3 – 3,0	0,1 – 0,2	0,6 – 4,7
<i>Panax ginseng</i> (3)	0,3 – 0,8	0,9 – 1,1	6,6 – 8,5	8,0 – 10,0

Der Trockenextrakt von *Piper methysticum* (Kava-Kava) zeigt einen vergleichsweise niedrigen Gehalt an Zuckern. Dies lässt sich aus der unterschiedlichen Extraktionsmethode herleiten. Während die anderen Pflanzen mit Ethanol/Wasser- oder Methanol/Wasser-Gemischen extrahiert werden, kommt bei der Extraktion von Kava-Kava 96%-iges Ethanol zum Einsatz, das ein geringeres Lösungsvermögen für Zucker besitzt. Eine weitere interessante Beobachtung bezüglich des Zuckergehalts in Trockenextrakten von *Piper methysticum* zeigt Abb. 4-4. Die Chargen Kav 1641336 bis Kav 4641073 (Herstelljahre 1991-1994) besitzen einen sehr geringen Gesamtzuckergehalt von <1%, während die nachfolgenden Chargen Kav 5641619 und Kav 6630275 (1995 und 1996) deutlich höhere Gehalte (bis 5%) aufweisen. Der Grund für dieses Phänomen ist nicht bekannt, kann aber bei angenommener gleichbleibender Extraktions- und Herstellungsmethode nur in der Schwankung des Inhaltsstoffmusters des eingesetzten Pflanzenmaterials zu suchen sein.

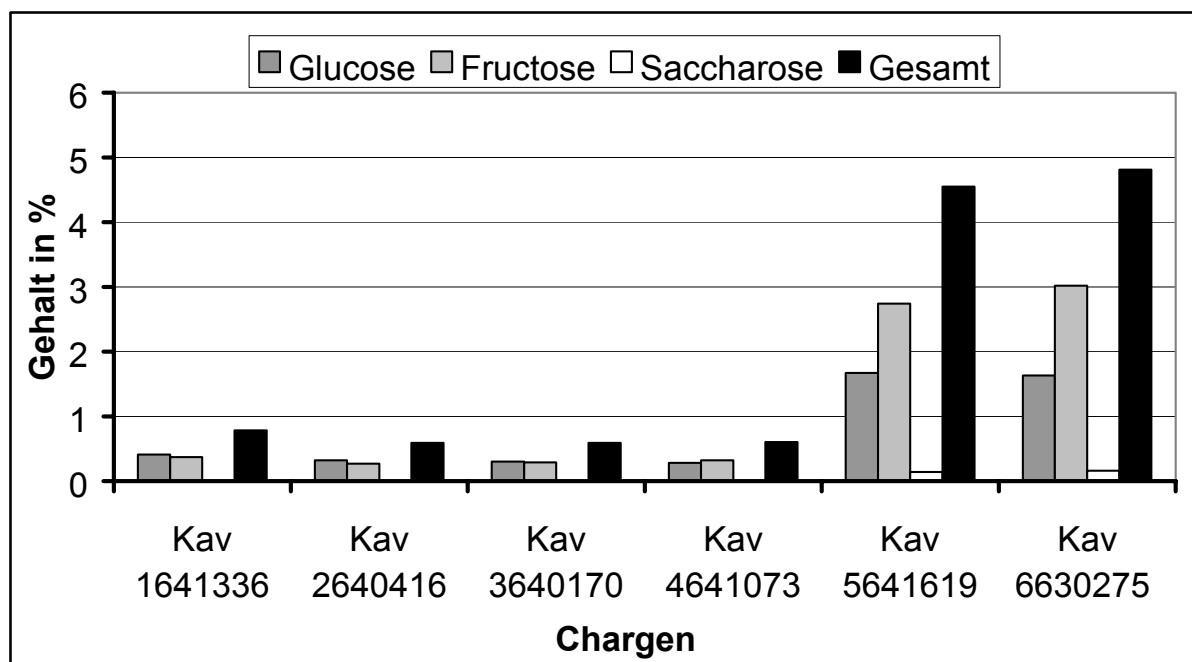


Abb. 4-4 Zuckergehalt in verschiedenen Chargen von Kava-Kava-Trockenextrakt

4.2 Hydrolyse der Zucker mit Trifluoressigsäure (TFA)

Um sicherzugehen, dass bei der Bestimmungsmethode keine Oligo- oder Polysaccharide, die ebenfalls für ihre Hygroskopizität bekannt sind, übersehen werden, werden die Extrakte einer Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA) unterzogen (Blom et al. 1990) und das erhaltene Hydrolysat mittels HPAEC-PAD untersucht (DeRuiter et al. 1992). Bei dieser Art der Hydrolyse werden sämtliche glykosidischen Bindungen von Substanzen, die in einem Pflanzenextrakt vorliegen, gespalten und daraus die monomeren Zucker erhalten.

4.2.1 Durchführung der TFA-Hydrolyse

Für die pflanzlichen Trockenextrakte wird eine Methode von Hardy et al. (1988) modifiziert verwendet. Dabei werden die Extrakte mit 2 N TFA gemischt und für 60 min bei 100 °C im Trockenschrank hydrolysiert. Für die Bestimmung der Kinetik der Hydrolyse werden die Proben insgesamt 140 min hydrolysiert und in regelmäßigen Abständen auf ihren Zuckergehalt hin untersucht.

4.2.2 Ergebnisse

Der Zuckergehalt in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. nach Hydrolyse mit TFA ist in Abb. 4-5 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass der Gehalt an Fructose und Glucose im Vergleich zu den Ausgangswerten deutlich erhöht ist. Dies hängt mit dem hydrolytischen Abbau der Saccharose zu eben diesen Monomeren zusammen. Bei der Extraktcharge ECC 606 ist die Steigerung am größten. Dies kann damit begründet werden, dass diese Charge den höchsten Gehalt an Saccharose besitzt. Rhamnose stammt neben Glucose aus dem hydrolytischen Abbau von Flavonoiden (hauptsächlich Rutin), die mit einem Gehalt von 1,6-2,7% in den Extrakten vorliegen (siehe Kapitel 2.2).

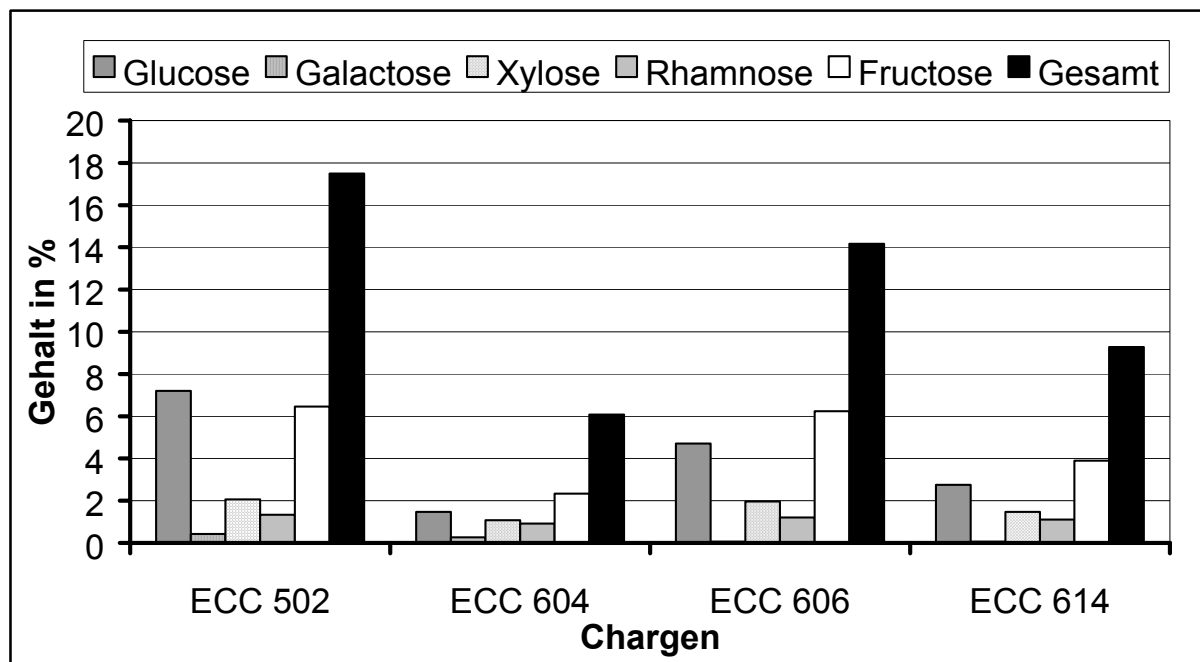


Abb. 4-5 Zuckergehalt in verschiedenen Chargen von *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakt nach TFA-Hydrolyse, bestimmt mit der HPAEC-PAD-Methode

Xylose und Galactose werden von Oligo- bzw. Polysacchariden freigesetzt, spielen aber auf Grund des geringen Gehaltes in den weiteren Betrachtungen keine Rolle. Generell kann davon ausgegangen werden, dass in den Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. keine größeren Mengen an Kohlenhydraten vorliegen, die nicht mit der oben aufgeführten isokratischen Bestimmungsmethode detektiert werden.

Bei der Untersuchung zur Kinetik der TFA-Hydrolyse werden folgende Aspekte deutlich (Abb. 4-6): Saccharose liegt von Beginn an nicht mehr in der Analyse vor, sondern wird bereits bei Raumtemperatur direkt nach Zugabe von TFA hydrolysiert. Die Hydrolyse der Flavonoide geschieht im Gegensatz dazu langsamer, da der Gehalt von Rhamnose erst nach etwa 60 min ansteigt. Die glykosidischen Bindungen innerhalb der Flavonoide scheinen stabiler als die im Disaccharid Saccharose (Banerji und Murti 1965). Der Fructosegehalt fällt nach einem anfänglichen Anstieg bei etwa 40 min kontinuierlich ab. Dies lässt sich mit der thermischen Labilität dieses Monosaccharids erklären (Haber und Hendrix 1948).

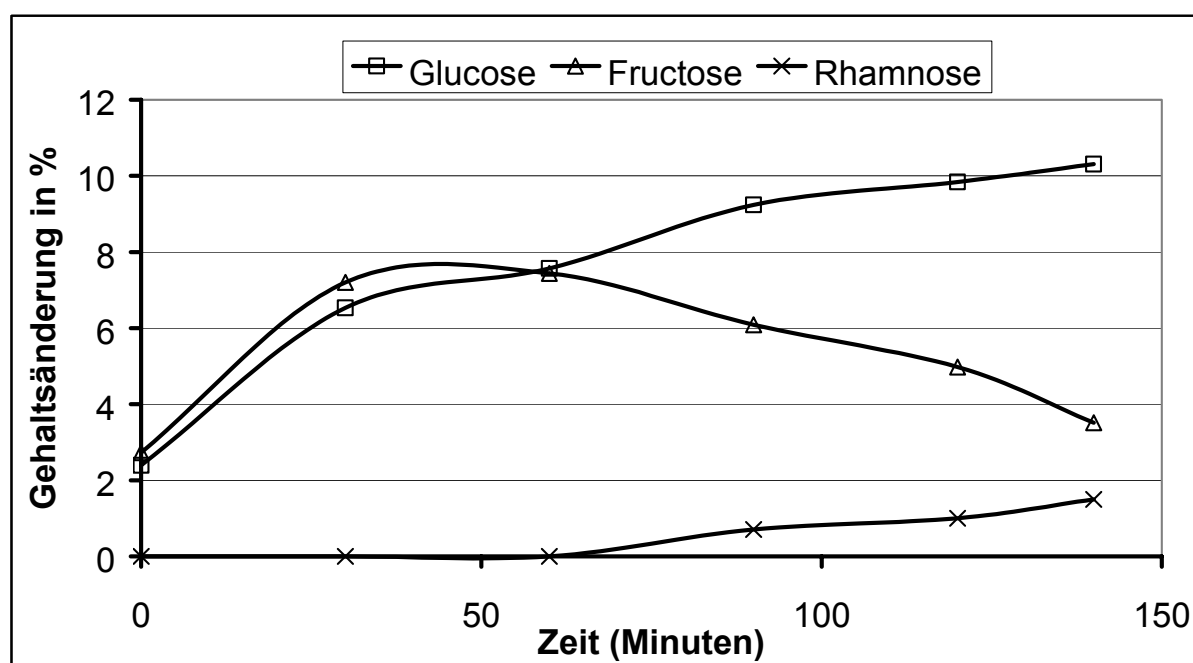


Abb. 4-6 Zeitlicher Verlauf der TFA-Hydrolyse eines Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. (Charge 502); Änderung des Gehalts von Fructose, Glucose und Rhamnose

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie mit gekoppelter gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) lässt sich der Gehalt an Mono- und Disacchariden in pflanzlichen Trockenextrakten schnell und präzise bestimmen. Dabei besitzt die Detektionsmethode im Vergleich zur Refraktionsindex-Detektion (RID) den Vorteil einer um drei Zehnerpotenzen höheren Empfindlichkeit. Der Gehalt an Kohlenhydra-

ten in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. kann jedoch keine ausreichende Begründung für die starke Hygroskopizität dieser Extraktzubereitungen liefern. Der Zuckergehalt korreliert sehr gut mit dem Gehalt an Restwasser nach Sorption und Desorption, gemessen mit der Methode der dynamischen Wasserdampfsorption (DVS, siehe Kapitel 6.3). Andere pflanzliche Trockenextrakte zeigen ähnliche Gehalte an Mono- und Disacchariden, verhalten sich jedoch bei der Verarbeitung viel unkomplizierter.

Auffällig hohe Zuckergehalte zeigen die Extraktzubereitungen einiger Wurzelndrogen (z.B. *Valeriana officinalis*). Dies lässt auf eine Speicherfunktion der Zucker, vor allem des Disaccharids Saccharose, schließen.

Mit Hilfe der TFA-Hydrolyse kann das Vorliegen höherer Zucker in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. ausgeschlossen werden. Hierbei findet lediglich eine Spaltung von Saccharose in Fructose und Glucose statt. Die Trennung der glykosidischen Bindungen in den Flavonoiden (v.a. Rutin) führt ebenfalls zu einer Erhöhung des Glucosegehalts und zum Auftreten des Monosaccharids Rhamnose.

KAPITEL 5

ANALYTIK DER ORGANISCHEN SÄUREN

In den verschiedenen Chargen der Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. wird ein sehr hoher Kaliumgehalt (etwa 9-13%, siehe Kapitel 3.4) festgestellt. Der molare Anteil der anorganischen Anionen (bestimmt durch Fa. Institut Fresenius) deckt nur etwa ein Drittel bis die Hälfte der Gegenionen des Kaliums ab. Aus diesem Grund und wegen den hygroskopischen Eigenschaften dieser Substanzen (Schmidt und Brögmann 1987), werden die organischen Säuren in den pflanzlichen Trockenextrakten mit Hilfe zweier verschiedener chromatographischer Methoden bestimmt. Yao et al. (1998) geben eine Aufstellung über ein mögliches Vorkommen von organischen Säuren in Pflanzen und diskutieren verschiedene Analysemethoden für deren Bestimmung.

5.1 Quantifizierung organischer Säuren mit Hilfe der Ionenausschlusschromatographie und gekoppelter Lichtstreuung (IEC-ELSD)

5.1.1 HPLC-Methode

Die erste verwendete Methode zur Quantifizierung der organischen Säuren ist die Anionenausschlusschromatographie mit gekoppelter Lichtstreuung (IEC-ELSD). Dieses universelle Detektionsprinzip kommt zur Anwendung, da es sich bei den meisten in Pflanzen vorkommenden organischen Säuren um nicht chromophore Moleküle handelt.

Probenaufarbeitung

Um die organischen Säuren von anderen Inhaltsstoffen der Extrakte abzutrennen, wird der HPLC-Analytik eine Festphasenextraktion (SPE) vorgeschaltet. In Vorversuchen hat sich herausgestellt, dass größere Mengen an organischen Säuren auf Materialien mit vereinzelt vorliegenden freien Silanolgruppen zurückgehalten werden. Aus diesem Grund wird für die nachfolgende Methode als hydrophobes Material eine C18-

Kieselgelphase verwendet, bei der die freien Silanolgruppen methyliert vorliegen („endcapped“). Bei der Anionenaustauscher-Kartusche, auf der die Säuren zurückgehalten werden, zeigt ein mit Acetat voräquilibriertes Material ebenfalls deutlich bessere Ergebnisse als herkömmliche Materialien. Die organischen Säuren werden mit 0,1 N Trifluoressigsäure (TFA) von der Anionenaustauscherkartusche eluiert, da TFA in einer geringeren Konzentration gleichzeitig als mobile Phase bei der HPLC verwendet wird.

Trennmethode

Als stationäre Phase wird eine Kationenaustausch-Säule (Aminex HPX-87H, Fa. Bio-Rad) verwendet. Die Trennmethode basiert unter anderem auf dem Prinzip des Donnan-Ausschlusses (Harlow und Morman 1964, Weiß 1991). Bei dieser Methode wird innerhalb des Materials die Hydrathülle der stationären Phase durch Sulfonsäuregruppen mit einer negativ geladenen Schicht begrenzt, die nur für undissoziierte Verbindungen durchlässig ist. Vollständig dissoziierte Säuren können aufgrund der gegenseitigen Abstoßung der negativen Ladungen die Schicht nicht durchdringen. Teilweise undissoziierte Verbindungen, wie die meisten organischen Säuren, zeigen eine vom jeweiligen pKs-Wert der Substanz abhängige Retention (Widiastuti und Haddad 1992). Als mobile Phase werden meist verdünnte Lösungen einer Mineralsäure verwendet, da diese zu einer besseren Trennschärfe im Vergleich zur Trennung mit reinem Wasser führen (Widiastuti und Haddad 1992).

Detektionsmethode

Bei der Lichtstreuungsdetektion handelt es sich um eine universelle Detektionsmethode im Bereich der HPLC (Onken und Berger 1998). Abb. 5-1 zeigt schematisch die Funktionsweise eines Lichtstreuungsdetektors. Zunächst wird der Säuleneffluent in einer Düse mit Hilfe von Stickstoff pneumatisch versprüht. Die entstehenden Tropfen werden in einem beheizten Rohr verdampft. Da die mobile Phase vollständig verdampfbar sein muss, wird an Stelle von Schwefelsäure 0,02 N TFA zur Trennung der Säuren eingesetzt (Lafosse et al. 1992). Im Anschluss daran werden die entstehenden Partikel mit dem Gasstrom in eine Detektionskammer transportiert und dort mit polychromati-

schem Licht bestrahlt. Die Intensität des Streulichtes wird von einem Photomultiplier aufgenommen und zeigt eine direkte Abhängigkeit zur Analytmenge.

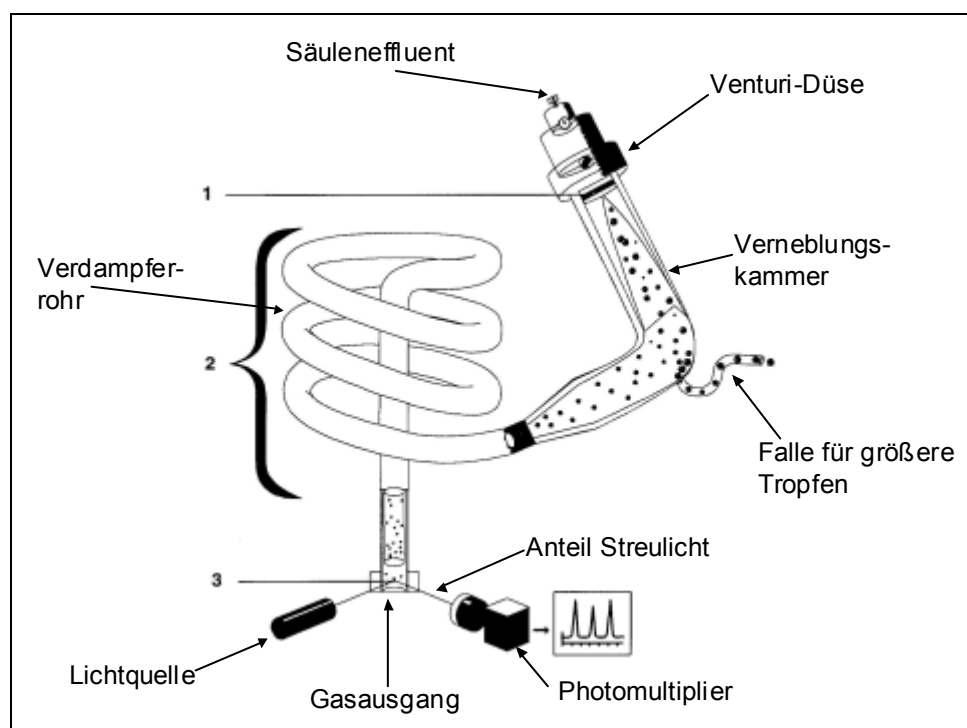


Abb. 5-1 Funktionsweise eines Lichtstreuendetektors

Auf dem Markt befinden sich sowohl Geräte mit polychromatischer als auch solche mit monochromatischer Lichtquelle (He-Ne-Laser), wobei die letzteren eine verbesserte Empfindlichkeit aufweisen sollen. Aufgrund vergleichender Messungen mit einem Lichtstreuendetektor mit Laserlichtquelle (Fa. Alltech, Ergebnisse werden hier nicht gezeigt), kann jedoch keine positive Aussage hinsichtlich der höheren Empfindlichkeit gemacht werden (vgl. Dreux et al. 1997).

5.1.2 Kalibrierung und Validierung der Methode

Ein sehr auffälliges Merkmal bei der Lichtstreuungsdetektion ist die nicht lineare Korrelation zwischen Analytkonzentration und Detektorantwort (Kibbey 1996). Zwischen diesen beiden Größen besteht vielmehr ein sigmoidaler Zusammenhang (Oppenheimer und Mourey 1982), der mit Hilfe von unterschiedlichen Streumechanismen in Abhängigkeit der Partikelgröße erklärt werden kann (Mourey und Oppenheimer 1984).

Aus diesem Grund wird bei Kalibrierungen die Peakfläche logarithmisch gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen, wie am Beispiel der Citronensäure in Abb. 5-2 gezeigt wird.

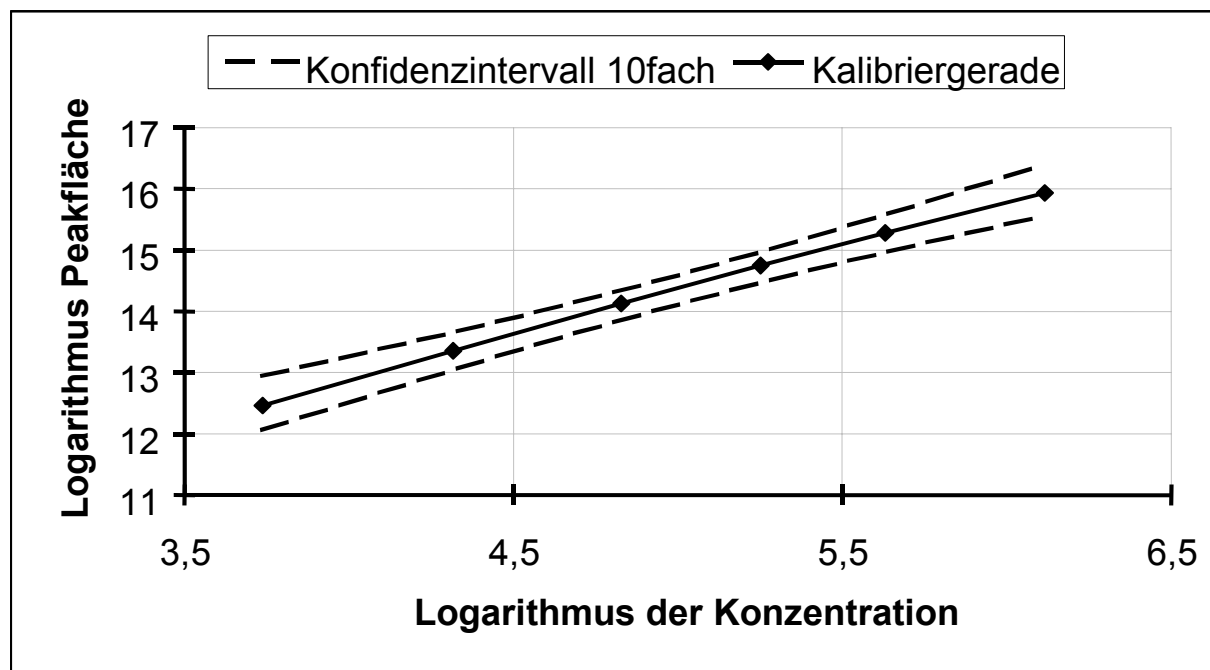


Abb. 5-2 Kalibriergerade von Citronensäure in doppeltlogarithmischer Auftragung

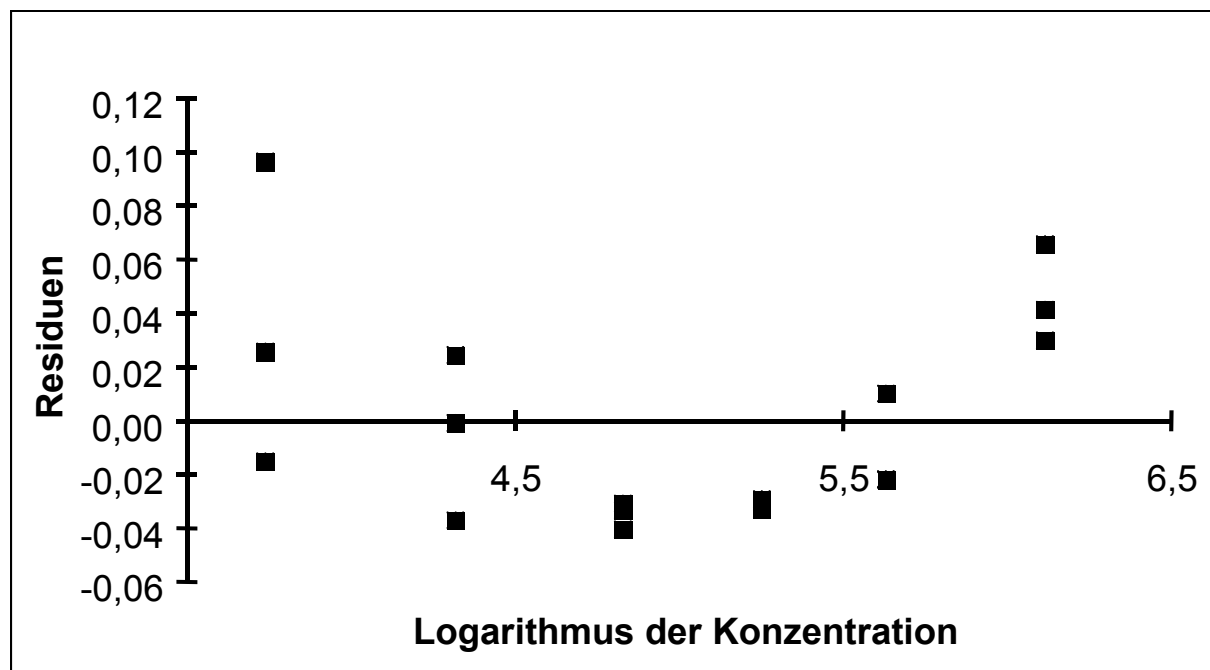


Abb. 5-3 Residuenplot der Kalibrierung von Citronensäure

Tab. 5-1 zeigt die Kalibrierungs- und Validierungsparameter der Bestimmung der organischen Säuren mit Hilfe der Anionenausschlusschromatographie mit gekoppelter Lichtstredetektion.

Tab. 5-1 Kalibrierungs- und Validierungsparameter der IEC-ELSD-Methode

Parameter	Citronensäure	Äpfelsäure	Weinsäure
Linearitätsbereich [mg/l]	42-453	49-474	63-506
Korrelationskoeffizient	0,99945	0,99292	0,99981
Steigung der Kalibriergeraden [AUC/(mg/l)]	1,46	1,04	1,44
Systempräzision (n=6)	VK=1,27%	VK=2,97%	VK=2,04%
Methodenpräzision (n=6)	VK=3,11%	VK=1,55%	VK=2,20%
Bestimmungsgrenze [mg/l]	19,8	61,3	26,8
Wiederfindungsraten [%]	102,6	98,9	nicht bestimmt

Die Steigungen der Regressionsgeraden sind nur vom Brechungsindex der jeweiligen Substanz abhängig (Kibbey 1996). Da dieser für alle organischen Substanzen in einem engen Bereich als konstant angenommen wird, sollten die Werte für die Steigungen theoretisch bei etwa 1,7 liegen (Stolyhwo et al. 1984). Für Citronen- und Weinsäure werden etwas flachere Regressionsgeraden bestimmt, wobei die Geraden dicht zusammen liegen. Die Geradensteigung bei der Bestimmung der Äpfelsäure ist deutlich flacher. Äpfelsäure besitzt auch die höchste Bestimmungsgrenze, was mit einer teilweisen Verdampfung der Substanz zusammenhängen könnte. Nach Kohler et al. (1997) kann durch die Erniedrigung der Verdampfungstemperatur eine Erhöhung der Empfindlichkeit bei der Bestimmung leichtflüchtiger Substanzen erreicht werden, jedoch wird in Folge dessen das Systemrauschen durch unzureichende Verdampfung der mobilen Phase höher, so dass mit einer Verdampfungstemperatur von 60 °C ein Kompromiss eingegangen wird und diese nicht weiter gesenkt werden kann.

5.1.3 Ergebnisse der Quantifizierung

Ein typisches Chromatogramm der Trennung auf einer Aminex HPX-87H-Säule (Fa. Bio-Rad) mit nachgeschalteter Lichtstredetektion ist in Abb. 5-4 dargestellt.

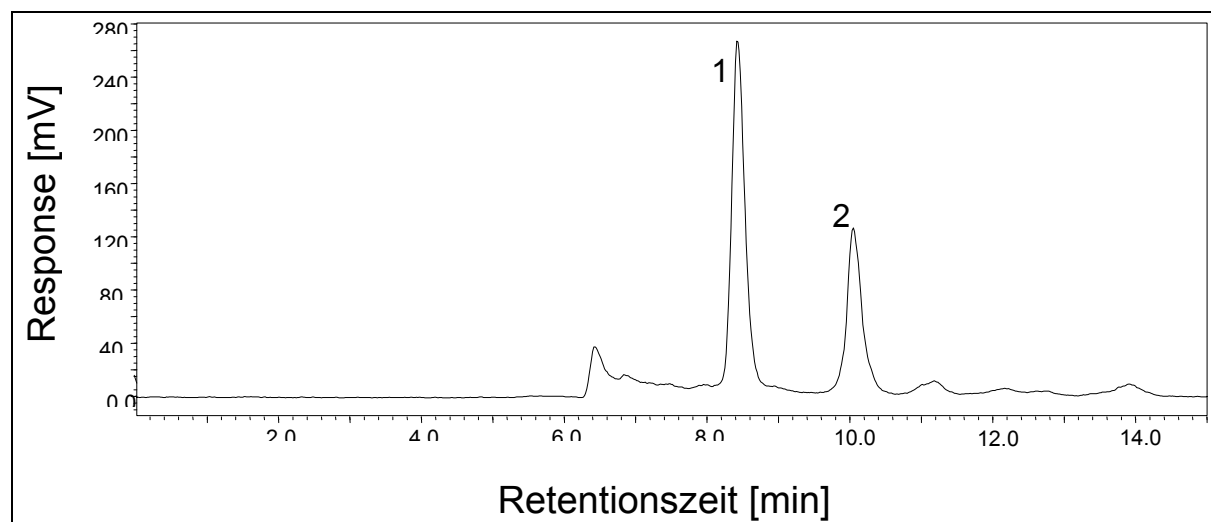


Abb. 5-4 Chromatogramm der Trennung von Citronensäure (1) und Äpfelsäure (2) eines pflanzlichen Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. mit IEC-ELSD

Mit Hilfe der IEC-ELSD-Bestimmung wird in verschiedenen Chargen des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. ein Gesamtsäuregehalt von etwa 6-8% bestehend aus Citronen- und Äpfelsäure ermittelt (Tab. 5-2). Weinsäure ist mit Hilfe dieser Methode nicht nachweisbar. Man erkennt keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen, die die unterschiedliche Hygroskopizität und das unterschiedliche technologische Verhalten erklären könnten.

Tab. 5-2 Gehalt an organischen Säuren in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham., bestimmt mit der IEC-ELSD-Methode (Gehalt \pm Standardabweichung, $n=4$)

Charge	Gehalt an Citronensäure in %	Gehalt an Äpfelsäure in %	Gesamtgehalt in %
ECC 604	$3,9 \pm 0,10$	$3,0 \pm 0,14$	$6,9 \pm 0,23$
ECC 614	$3,5 \pm 0,04$	$2,8 \pm 0,08$	$6,3 \pm 0,11$
ECC 306	$3,0 \pm 0,06$	$2,9 \pm 0,10$	$5,8 \pm 0,15$
ECC 606	$1,8 \pm 0,05$	$4,1 \pm 0,10$	$5,9 \pm 0,12$
ECC 502	$4,1 \pm 0,01$	$3,9 \pm 0,09$	$8,0 \pm 0,09$

In Tab. 5-3 ist der Gehalt der drei organischen Säuren in Weinlaub-Trockenextrakten aufgelistet. Bei den verschiedenen Chargen der Trockenextrakte von *Vitis vinifera* (Weinlaub) wird ein Gesamtgehalt von 4-13% bestimmt, wobei stärkere Schwankun-

gen im Vergleich zu den Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. auftreten.

Tab. 5-3 Gehalt an organischen Säuren in Trockenextrakten von *Vitis vinifera*, bestimmt mit der IEC-ELSD-Methode (Gehalt \pm Standardabweichung, $n=4$)

Charge	Gehalt an Citronensäure in %	Gehalt an Äpfelsäure in %	Gehalt an Weinsäure in %	Gesamtgehalt in %
WL 00120168	1,5 \pm 0,07	8,2 \pm 0,07	3,1 \pm 0,02	12,8 \pm 0,12
WL 99220827	1,3 \pm 0,03	5,6 \pm 0,09	3,7 \pm 0,03	10,6 \pm 0,09
WL 99220306	1,4 \pm 0,03	6,1 \pm 0,12	3,1 \pm 0,11	10,6 \pm 0,14
WL 98221121	1,0 \pm 0,04	2,3 \pm 0,05	2,0 \pm 0,02	5,3 \pm 0,03
WL 98221120	1,1 \pm 0,01	0,4 \pm 0,03	2,3 \pm 0,02	3,8 \pm 0,03
WL 99220599	1,3 \pm 0,02	4,9 \pm 0,07	4,0 \pm 0,05	10,2 \pm 0,10
WL 97220311	0,9 \pm 0,02	3,9 \pm 0,07	5,7 \pm 0,07	10,5 \pm 0,16

Die Säuregehalte liegen im Durchschnitt deutlich höher als bei den Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham.. Die Extrakte zeigen ein jedoch nicht annähernd so starkes hygroskopisches Verhalten. Dies schließt den Gehalt an Citronen- und Äpfelsäure als möglichen Grund für die Hygroskopizität und die damit verbundene schlechte Verarbeitbarkeit der *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakte aus.

Tab. 5-4 zeigt eine Liste von Säuregehalten in Trockenextrakten anderer Pflanzen. Diese besitzen vergleichbare Säuregehalte. Weinsäure lässt sich mit Hilfe dieser Methode nur in den Extrakten von *Vitis vinifera* und *Melissa officinalis* bestimmen.

Tab. 5-4 Gehalt an organischen Säuren in Trockenextrakten anderer Pflanzen, bestimmt mit der IEC-ELSD-Methode (*n.d.*=nicht detektierbar)

Pflanzenextrakt (Chargenanzahl)	Gehalt an Citronensäure in %	Gehalt an Äpfelsäure in %	Gehalt an Weinsäure in %	Gesamtgehalt in %
<i>Valeriana officinalis</i> (5)	1,2 – 1,7	3,0 – 3,6	n.d.	4,2 – 5,1
<i>Xysmalobium undulatum</i> (3)	0,8 – 0,9	2,0 – 4,0	n.d.	2,9 – 4,9
<i>Eleutherococcus senticosus</i> (4)	0,7 – 1,0	0,7 – 0,8	n.d.	1,3 – 1,7
<i>Melissa officinalis</i> (1)	0,8	1,4	2,1	4,3

5.2 Bestimmung der organischen Säuren mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Methode der gaschromatographischen Trennung und der anschließenden Massenspektrometrie wird im Hinblick auf die Bestimmung organischer Säuren bei aziden Stoffwechselstörungen bereits seit längerem eingesetzt (Jellum 1977). Die Vorteile liegen in der Strukturaufklärung bei gleichzeitiger Quantifizierung der Substanzen. Für die Bestimmung des Gehalts an Säuren in pflanzlichem Material wird die Methode der GC-MS ebenfalls erfolgreich angewendet (Englmaier 1980).

5.2.1 Methode der GC-MS

Vor der gaschromatographischen Trennung müssen die nicht flüchtigen organischen Säuren in leichtflüchtige Derivate überführt werden. Dies geschieht in aller Regel mit einem Silylierungsreagenz (Evershed 1993). Bei der hier beschriebenen Methode wird N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (BSTFA) verwendet, das den Vorteil von leichtflüchtigen Abbauprodukten bietet, die die Trennung der derivatisierten Säuren nicht beeinflussen. Des Weiteren kann die Silylierung mit diesem Reagenz bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Ein Problem bei der GC-MS-Analyse stellt die Probenaufbereitung dar. Da es sich bei dieser Methode um eine eher unempfindliche Bestimmungsmethode handelt, kann die Aufarbeitung der Extrakte nicht mittels Festphasenextraktion (SPE) durchgeführt werden. In der Literatur sind prinzipiell zwei Aufbereitungsmethoden beschrieben (Mardens et al. 1992), zum einen der Anionenaustausch und zum anderen die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, zumeist Ethylacetat. Ein Problem stellen dabei die geringen Wiederfindungsraten einiger organischer Säuren dar. Thompson und Markey (1975) und Boujet et al. (1982) favorisieren auf Grund der höheren Wiederfindungsraten die Methode des Anionenaustausches, wobei sie auch den höheren Zeitaufwand erwähnen. Für Citronen- bzw. Milchsäure werden bei Suh et al. (1997) nach Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat Wiederfindungsraten von 12% bzw. 38% ermittelt. Merkel und Jungk (1973) und Wadman et al. (1976) finden nach Ausschütteln mit Ethylacetat für Glycerinsäure lediglich 37-47% bzw. 6-25% der Substanz in der organischen Phase.

5.2.2 Überprüfung der Richtigkeit der Methode

Bei der hier beschriebenen Methode werden die organischen Säuren mit Hilfe einer Kombination beider Aufbereitungsverfahren, Anionenaustausch und Ethylacetat-Extraktion, abgetrennt und für die nachfolgende GC-MS-Analyse silyliert. Der Grund dafür liegt in der leichten Verdampfbarkeit von Ethylacetat und der zu fordernden Abwesenheit von Wasser bei der Silylierung. Die niedrigen und schwankenden Wiederfindungsraten können durch eine externe Kalibrierung, bei der die Standardsubstanzen dieselbe Aufbereitung durchlaufen wie die Trockenextraktzubereitungen, vernachlässigt werden. Die Richtigkeit der Methode wird mit Hilfe von 50%, 100% und 150% Glycerinsäurezusatz zu einem Trockenextrakt mit bekanntem Gehalt an Glycerinsäure ermittelt. Die Wiederfindungsraten des Glycerinsäurezusatzes werden mittels GC-MS bestimmt (Abb. 5-5). Die gespikten Lösungen durchlaufen dabei dieselbe Probenaufarbeitung wie der Ausgangsextrakt.

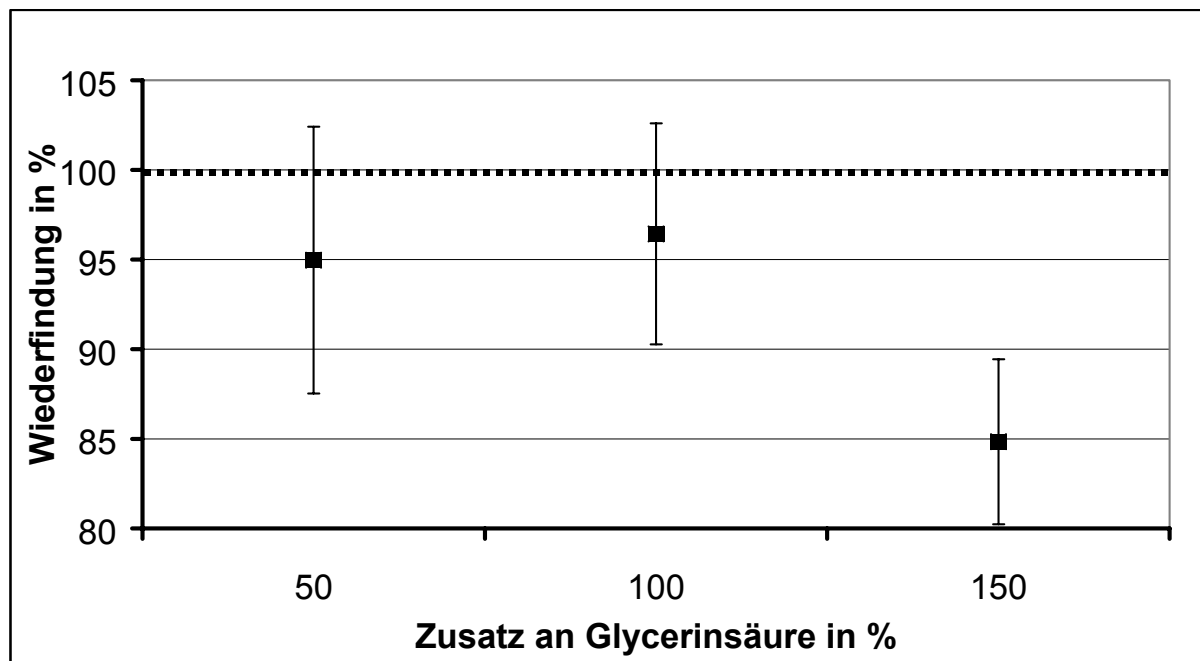


Abb. 5-5 Wiederfindungsraten von Glycerinsäure nach Zusatz von 50%, 100% und 150% zum Trockenextrakt von ECC 606

Man kann erkennen, dass das Ionenaustauschermaterial ab einem Zusatz von 150% Glycerinsäure zum Extrakt deutliche Überlastungserscheinungen zeigt.

An den relativ großen Vertauensbereichen ist die hohe Schwankungsbreite der Methode erkennbar. Dies hängt mit der manuellen Injektion der Probelösungen zusammen. Aus diesem Grund stellt die Gehaltsbestimmung der organischen Säuren lediglich eine halbquantitative Abschätzung des Gehaltes dar.

5.2.3 Ergebnisse der Quantifizierung

Abb. 5-6 zeigt ein typisches Chromatogramm der GC-MS-Bestimmung des Trockenextraktes ECC 606 mit der Zuordnung charakteristischer Peaks.

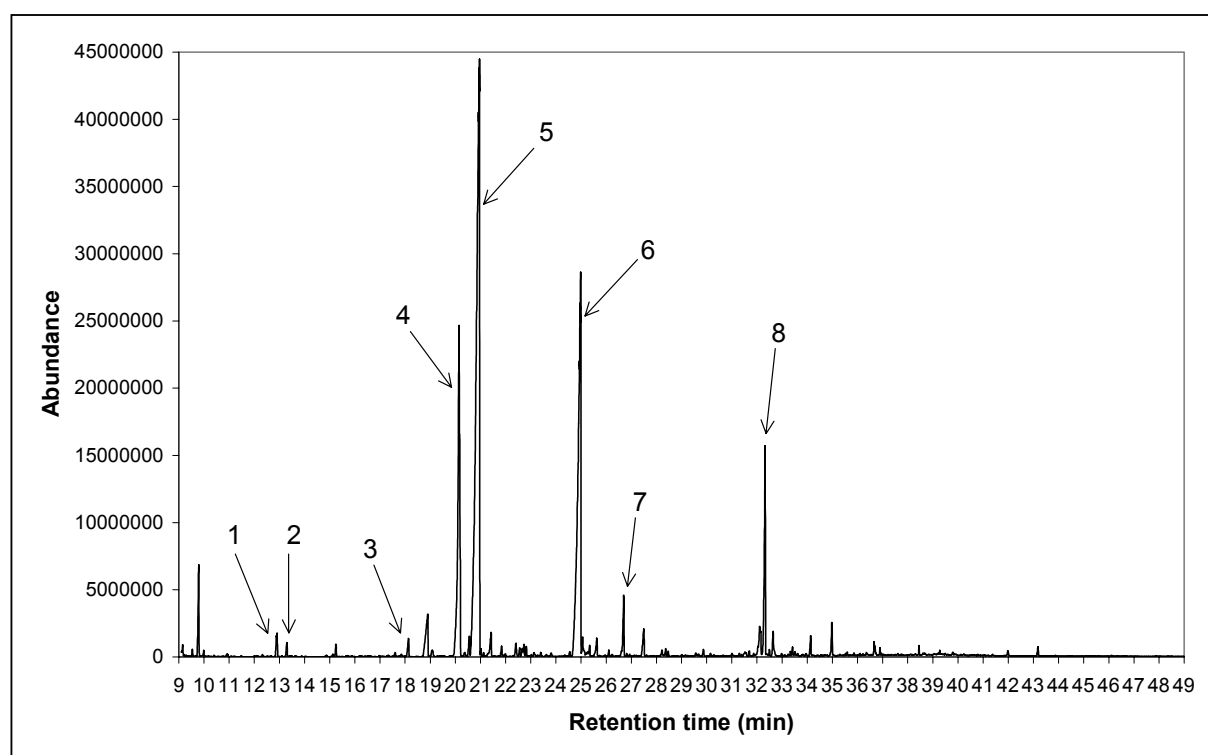


Abb. 5-6 Gaschromatogramm der Fraktion der organischen Säuren im Trockenextrakt von *Eschscholtzia californica* Cham. (Charge 606) nach Silylierung mit BSTFA. Peaknachweis: 1 = Milchsäure, 2 = Glykolsäure, 3 = Benzoessäure, 4 = Bernsteinsäure, 5 = Glycerinsäure, 6 = Äpfelsäure, 7 = Threonsäure und 8 = Citronensäure

Eine Auflistung aller im Trockenextrakt ECC 606 gefundenen Pflanzensäuren mit Retentionszeiten und typischen Molmassen der Fragmente zeigt Tab. 5-5. Wenn kein Gehalt angegeben ist (n.q.), steht keine Referenzsubstanz zur Verfügung. Abb. 5-7 zeigt ein Massenspektrum der silylierten Glycerinsäure.

Tab. 5-5 Mit der GC-MS-Methode detektierte und quantifizierte Säuren und andere Substanzen im Trockenextrakt von *Eschscholtzia californica* Cham. (Charge 606)

Substanz	Retentionszeit (min)	Wichtige Massenpeaks (Molmasse)	Gehalt in %	Peakfläche in %	Bemerkungen
Milchsäure	12,9	117, 191, 207	< 0,1	0,6	ubiquitär
Glykolsäure	13,3	161, 177, 205	< 0,1	0,3	ubiquitär
Lävulinsäure	14,9	130, 145, 188	n.q.	< 0,1	
β-Milchsäure	15,3	116, 177, 219	n.q.	0,3	
Malonsäure	17,0	233, 307, 248	n.q.	< 0,1	
Benzoessäure	18,1	77, 105, 135, 179, 194	0,3	0,5	Verunreinigung Ionenaustauscher
Nicotinsäure	18,9	78, 106, 136, 180, 195	n.q.	4,9	
Glycerol	19,1	103, 133, 147, 175, 205, 218	n.q.	0,3	neutrale Substanz
Thymol	20,0	149, 191, 222	n.q.	< 0,1	neutrale Substanz
Bernsteinsäure	20,2	75, 129, 172, 247, 262	1,2	5,0	
Glycerinsäure	21,0	103, 133, 189, 205, 292, 322	12,1	41,3	Hauptbestandteil
Threonolacton	21,9	101, 147, 163, 203, 247, 262	n.q.	0,2	neutrale Substanz
6-Hydroxycarbonsäure	22,4	117, 130, 147, 189, 261, 276	n.q.	0,4	
Äpfelsäure	25,0	189, 233, 245, 265, 335, 350	5,3	22,1	ubiquitär
5-Oxoprolin	25,6	133, 156, 273	n.q.	0,5	Aminosäure
Sumikisäure	26,1	197, 243, 271, 286	n.q.	0,3	5-Hydroxymethyl, 2-Furansäure
Threonsäure	26,7	292, 319, 409, 424	n.q.	1,5	2,3,4-Trihydroxybuttersäure
2-Hydroxyglutarsäure	26,8	116, 203, 231, 247, 321, 349	n.q.	< 0,1	
Weinsäure	28,5	189, 219, 292, 305, 333, 423	0,1	0,1	mit ELSD nicht nachgewiesen
Citronensäure	32,3	211, 273, 305, 347, 375, 465,	3,3	4,9	ubiquitär
Phthalsäure	34,2	104,149,278	n.q.	0,9	Verunreinigung Ionenaustauscher

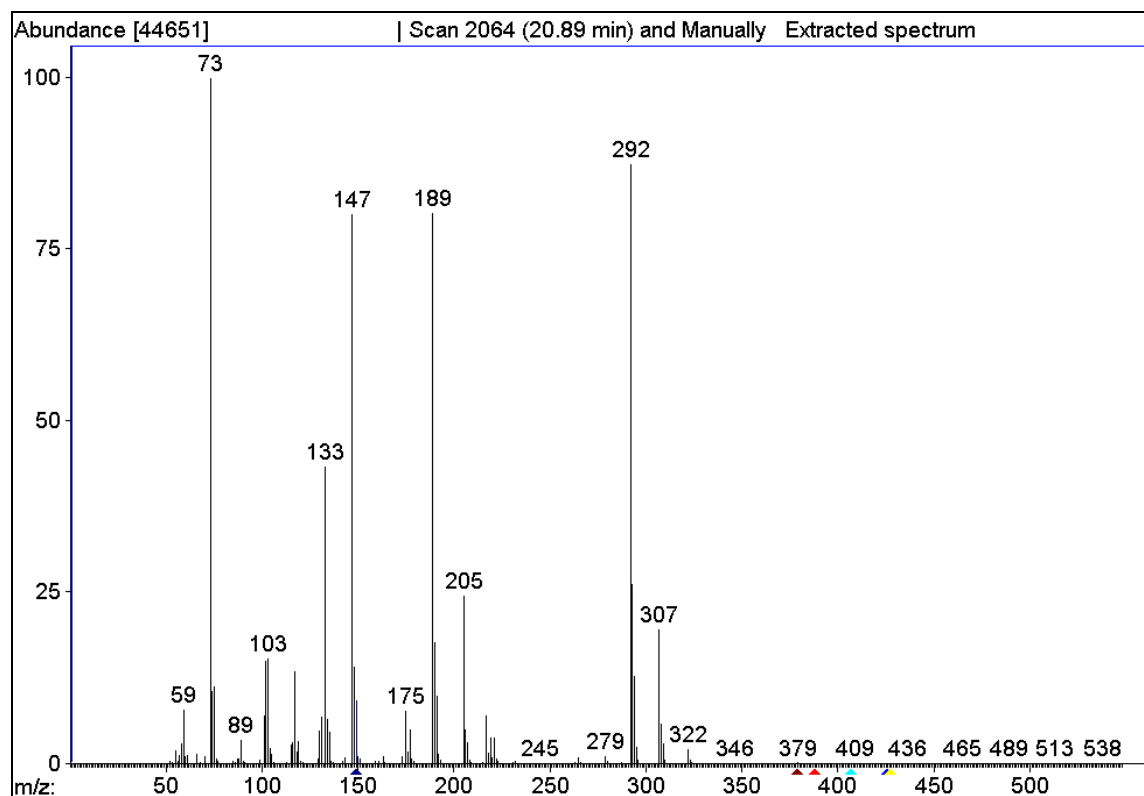


Abb. 5-7 Massenspektrum von Glycerinsäure, silyliert mit BSTFA

Neben den mit Hilfe der IEC-ELSD-Methode bestimmten Säuren Citronen- und Äpfelsäure werden mit der Methode der GC-MS zusätzlich Glycerinsäure mit einem Gehalt von 12% und andere Substanzen mit einem geringeren Anteil detektiert. Diese werden mit Hilfe einer Spektrenbibliothek durch Vergleich der Fragmentmuster oder mit Hilfe einer Literaturdatenbank, die GC-MS-Spektren von organischen Säuren tabellarisch aufgelistet enthält (Mamer et al. 1971), identifiziert. Benzoe- und Phthalsäure sind als Verunreinigungen des Ionenaustauschermaterials zu betrachten (Ng et al. 2001). Mit Hilfe dieser Methode gelingt es, Weinsäure mit einem durchschnittlichen Gehalt von 0,1% im Trockenextrakt ECC 606 nachzuweisen. Den anderen Substanzen wird eine geringere Bedeutung beigemessen, da die Peakflächen nur einen sehr geringen Anteil ausmachen.

Eine Übersicht des mit der GC-MS-Methode abgeschätzten Gehalts an organischen Säuren in drei verschiedenen Trockenextraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. (Abb. 5-8) zeigt einen deutlichen Unterschied im Gehalt an Glycerinsäure.

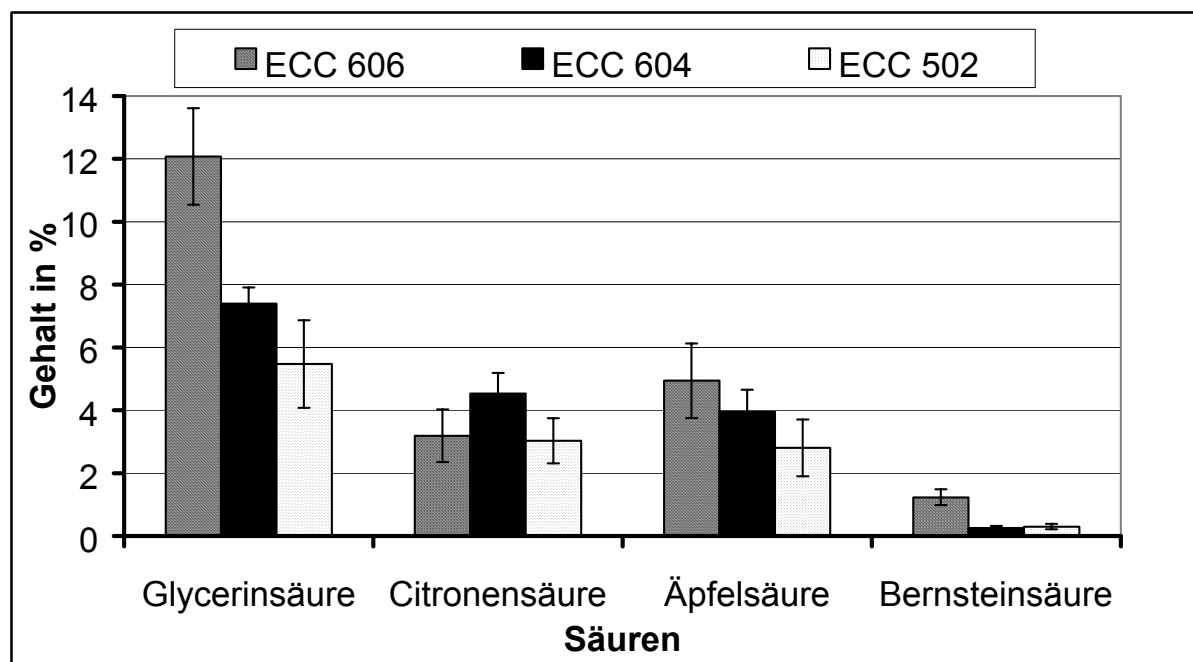


Abb. 5-8 Gehalt an organischen Säuren in pflanzlichen Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham., ermittelt mit der GC-MS-Methode

Im Trockenextrakt ECC 606 liegt fast die doppelte Menge Glycerinsäure im Vergleich zu den anderen Extraktchargen vor. Außer den genannten Säuren sind noch Milchsäure und Glykolsäure im Bereich von 0,02-0,08% in den Extrakten enthalten. Die sehr hohen Schwankungsbreiten der Bestimmungsmethode (VK von 5-26%) hängen mit der manuellen Injektion der Probelösungen zusammen und sind vergleichbar mit Literaturdaten (Ng et al. 2001, VK 2-14%). Tab. 5-6 zeigt eine Zusammenfassung der ermittelten Gehalte an organischen Säuren in Trockenextrakten anderer Pflanzen.

Tab. 5-6 Gehalt an organischen Säuren in pflanzlichen Trockenextrakten

	Gehalt an Glycerinsäure [%]	Gehalt an Citronensäure [%]	Gehalt an Äpfelsäure [%]	Gehalt an Bernsteinsäure [%]	Gehalt an Weinsäure [%]
WL 00120167	0	2,4	8,8	1,0	1,3
Bal 5640389	0,04	1,5	1,0	0,01	0
Mel 5640167	0,19	0,8	1,0	0,3	2,0
Kav 6630275	0,05	0	0,05	0,03	0
Eleu 161308	0	0,9	0,3	0	0
Xyb 4498/B1	0	0,6	1,9	0,2	0,08

Glycerinsäure kann mit Hilfe dieser Bestimmungsmethode in den Trockenextrakten anderer Pflanzen nicht oder nur mit einem sehr geringen Gehalt nachgewiesen werden.

5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Anionenausschlusschromatographie mit gekoppelter Lichtstredetektion stellt ein analytisches Verfahren dar, mit dessen Hilfe Citronen-, Äpfel- und Weinsäure in pflanzlichen Trockenextrakten präzise und schnell quantifiziert werden können, auch wenn die Empfindlichkeit zwei Zehnerpotenzen höher liegt als bei der Zuckerbestimmung mit Hilfe der HPAEC-PAD-Methode (siehe Kapitel 4). Als sehr wichtig hat sich auch in diesem Zusammenhang die Probenaufbereitung herausgestellt. Hier wird das Verfahren der Festphasenextraktion angewendet, wobei mit einer hydrophoben Phase die lipophilen Bestandteile zurückgehalten und mit einer Anionenaustauscherkartusche die organischen Säuren separiert werden.

Mit dem ermittelten Gehalt von Citronen- und Äpfelsäure können die unterschiedlichen Hygroskopizitäten der pflanzlichen Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. nicht erklärt werden, da diese einen kaum voneinander unterschiedlichen Gehalt der beiden Säuren aufweisen und andere pflanzliche Trockenextrakte (z.B. von *Vitis vinifera*) ebenfalls vergleichbare Gehalte aufweisen.

Das universelle Prinzip der Lichtstredetektion lässt sich im Prinzip auf jede nicht chromophore Substanzklasse anwenden. Ein Nachteil stellt allerdings die relative Flüchtigkeit einzelner Analyten, wie z.B. der Glycerinsäure, dar. Diese wird unter den eingestellten Bedingungen nicht detektiert, da sie teilweise oder ganz verdampft wird. Daher wird die Gehaltsbestimmung mit Hilfe einer GC-MS-Methode als Ergänzung zu der oben genannten IEC-ELSD-Methode durchgeführt. Hierbei werden die Säuren silyliert und damit in leichtflüchtige Derivate überführt. Die Glycerinsäure wird dabei voll erfasst, jedoch stellt hier die niedrige und schwankende Wiederfindungsrate ein gewisses Problem dar. Durch identische Aufbereitung der Referenzlösungen kann dies jedoch ausgeglichen werden.

In Extrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. liegt der Glycerinsäuregehalt bei 5-12% und somit im Vergleich zu den anderen Pflanzenextrakten deutlich höher. Die Charge ECC 606 zeigt einen um den Faktor zwei höheren Gehalt als die anderen Ex-

traktchargen. Das Vorkommen von Glycerinsäure in diesen hohen Konzentrationen könnte damit eine Erklärung für die sehr starke Hygroskopizität und die damit verbundene schlechte Verarbeitbarkeit der Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. liefern.

Ein Hinweis auf mögliche Gründe der vermehrten Anreicherung von Glycerinsäure in den oberirdischen Teilen von *Eschscholtzia californica* Cham. findet sich in der Literatur nicht.

KAPITEL 6

PHYSIKALISCH-CHEMISCHE

CHARAKTERISIERUNG DER EXTRAKTE

Nicht allein das chemische Spektrum der Inhaltsstoffe in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham., sondern auch ihre physikalischen Eigenschaften können bei der Erklärung der unterschiedlichen hygroskopischen Eigenschaften der Extrakte eine Rolle spielen. So können z.B. Zucker sowohl in kristalliner als auch in amorpher Form vorkommen (Roos 1993), wobei das Wasserdampfsorptionsverhalten einen signifikanten Unterschied in den physikalischen Eigenschaften dieser beiden verschiedenen Formen darstellt. Im Vergleich zu kristallinen Zuckern zeigen amorphe Kohlenhydrate ein wesentlich stärkeres hygroskopisches Verhalten und sorbieren selbst bei geringen Feuchten erheblich mehr Wasser (Cammenga und Zielasko 1996). Amorphe Substanzen können temperaturabhängig in ihre kristallinen Formen überführt werden (Hancock und Dalton 1999), was die Eigenschaften von pharmazeutischen Produkten bei der Verarbeitung und der Lagerung stark beeinflussen kann.

Nach Saleki-Gerhardt et al. (1994) entstehen amorphe Bereiche in Substanzen als Unordnung im kristallinen Aufbau bei vielen pharmazeutischen Prozessen, wie z.B. beim Mahlen, bei verschiedenen Trocknungsmethoden wie der Sprüh- oder Gefriertrocknung und bei der Tablettierung.

Für die Detektion und Quantifizierung des Kristallinitätsindex (KI), bzw. des amorphen Anteils pharmazeutischer Produkte stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung (Maasz und Beyer 1987), wobei jede der Bestimmungsmethoden Vor- und Nachteile besitzt. Die Bestimmung der Dichte liefert bei geringem Aufwand recht genaue Ergebnisse. Durch Adsorption von Wasser an den Oberflächen oder durch Verlust von Kristallwasser können jedoch falsche Werte für KI bestimmt werden. Thermoanalytische Verfahren wie die Differentialthermoanalyse (DTA) oder die dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) ermöglichen sowohl qualitative als auch quantitati-

ve Kristalluntersuchungen, zeigen aber Schwächen bei der Untersuchung von Substanzgemischen, wie z.B. pflanzlichen Trockenextrakten. Mikroskopisch-optische Verfahren, wie die Polarisationsmikroskopie erlauben eine nur eingeschränkte quantitative Aussage. Die Methode der Röntgendiffraktometrie stellt das am häufigsten angewandte Verfahren zur Bestimmung des KI dar. Der Einsatz der Lösungskalorimetrie und der Vergleich mit anderen Methoden wird bei Gao und Rytting (1997) beschrieben. Naini et al. (1998) charakterisieren mit Hilfe der Methoden der DSC und der Röntgendiffraktometrie sprühgetrocknete Zucker im Hinblick auf ihren Einsatz in Pulverinhalaten und vergleichen diese mit den kristallinen Formen der Kohlenhydrate.

Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. und anderer Pflanzen werden mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) und Röntgendiffraktometrie untersucht, um eventuell auftretende Unterschiede im Vorliegen amorpher und kristalliner Formen zu bestimmen. Zusätzlich wird ein Gerät zur dynamischen Wasserdampfsorption (DVS) eingesetzt. Mit Hilfe dieses Verfahrens sollen Unterschiede im Wasserdampfsorptions- bzw. -desorptionsverhalten der Trockenextrakte herausgestellt werden. Dieses Verfahren wird von Hogan und Buckton (2001) zusammen mit der Nahen Infrarotspektroskopie (NIR) erfolgreich zur Bestimmung des Anteils amorpher Strukturen in verschiedenen Lactoseproben eingesetzt.

6.1 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) der Extrakte

Amorphe Substanzen unterscheiden sich von kristallinen Stoffen durch das Fehlen eines scharfen, charakteristischen Schmelzpeaks. Bei amorphen Stoffen treten im Gegensatz zu kristallinen Substanzen keine Kristallgitterkräfte auf, so dass es bei Erwärmung zu einem Erweichen bis zur vollständigen Verflüssigung (Glasumwandlung) kommt. Te Booy et al. (1992) bestimmen die Schmelzenergie von gefriergetrockneten Mischungen aus Saccharose und anderen Substanzen mit Hilfe von DSC und beurteilen ausgehend davon die physikalische Stabilität der Mischungen.

6.1.1 Durchführung

Im Folgenden wird das Verhalten zweier Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. während einer DSC-Untersuchung bei einer Heizrate von 20 K/min beschrieben. Die angewandte Methode erfolgt in Anlehnung an eine für Johanniskraut-Trockenextrakte beschriebene DSC-Bestimmung von Rocksloh (1999).

6.1.2 Ergebnisse der DSC-Untersuchungen

In Abb. 6-1 sind die Aufheizkurven zweier Extraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. dargestellt. Es lassen sich keine großen Unterschiede zwischen den beiden Kurven erkennen. In beiden Diagrammen tritt eine endotherme Stufe eines Glasübergangs mit einer Onset-Temperatur bei etwa -1 °C auf, die bei Extraktcharge ECC 606 (a) etwas deutlicher ausgeprägt ist. Dies bedeutet, dass die Bestandteile in pflanzlichen Trockenextrakten überwiegend im amorphen Zustand vorliegen, was durch die Art der Trocknung durchaus erklärbar ist. Außerdem ist jeweils ein breiter endothermer Peak der Wasserabgabe bei etwa 95 °C zu erkennen. Ab etwa 180 °C setzen Schmelz- bzw. Zersetzungsvorgänge ein, auf deren Darstellung verzichtet wird. Insgesamt lassen sich durch die DSC-Untersuchungen keine Unterschiede zwischen diesen beiden Extraktchargen erkennen, die ihr stark unterschiedliches hygroskopisches Verhalten erklären lassen.

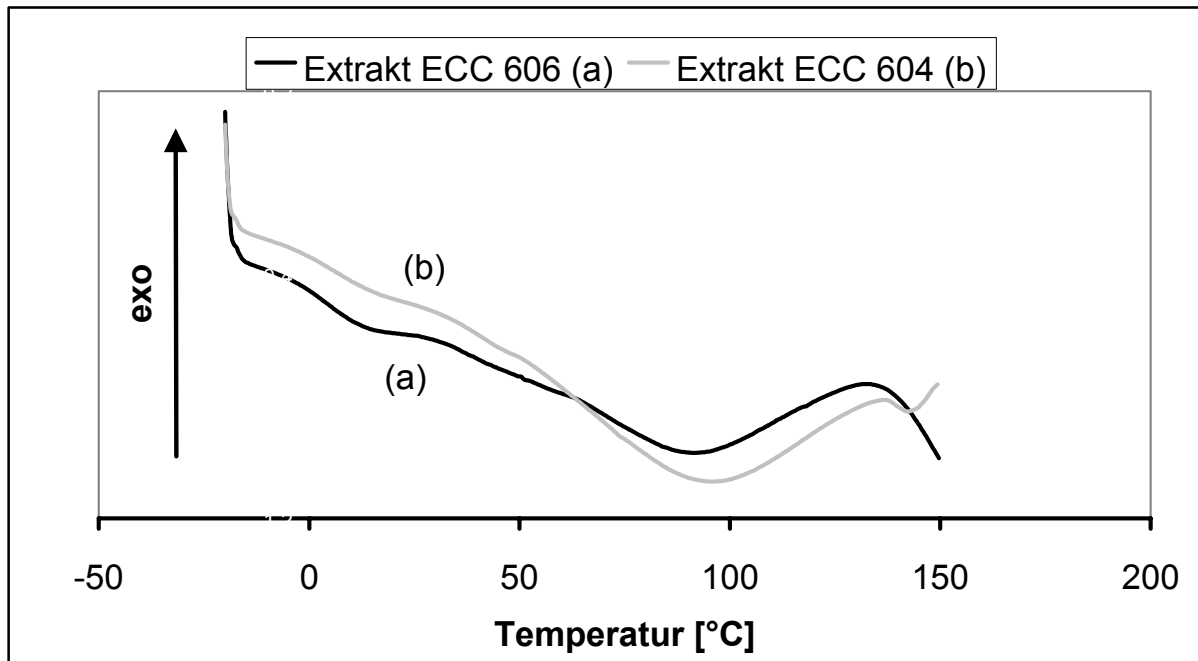


Abb. 6-1 DSC-Aufheizkurven zweier Extraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. (Aufheizrate 20 K/min)

6.2 Röntgendiffraktometrie der Extrakte

Die Röntgenbeugung stellt ein gängiges Verfahren in der Pharmazie dar (Beyer und Maasz 1987). Mit ihrer Hilfe lassen sich amorphe und kristalline Bereiche in Substanzen oder Mischungen bestimmen (Beyer 1991), sowie der Kristallinitätsindex von Stoffen oder Stoffgemischen ermitteln. Röntgenbeugung tritt auf, wenn ein monochromatischer Röntgenstrahl auf seinem Weg durch ein Kristallgitter Elektronenhüllen der Gitterbausteine zu Schwingungen anregt. Diese strahlen kugelförmige Primärwellen derselben Wellenlänge ab. Bei einer Überlagerung von Primärwellen kommt es zu Interferenzen, die eindeutige Rückschlüsse auf den Gitteraufbau der kristallinen Substanzen zulassen. Amorphe Stoffe streuen Röntgenstrahlung nicht kohärent, sondern bilden diffuse Beugungslinien aus, die durch ein breites Maximum gekennzeichnet sind. Solche diffusen Beugungsmuster amorpher Substanzen werden als Halos bezeichnet.

6.2.1 Durchführung

Die Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. und andere Pflanzenextrakte werden mit einem Transmissionsröntgendiffraktometer auf das Vorliegen von kristallinen bzw. amorphen Anteilen untersucht. Dabei wird die Probe während der Messung kontinuierlich senkrecht zum Röntgenstrahl gedreht, um Textureffekte, d.h. eine Anordnung von plättchen- oder nadelförmigen Substanzen in ihrer Vorzugsrichtung, zu kompensieren (Maasz und Beyer 1987). Da auch die Partikelgröße der Probe einen Einfluss auf die Bestimmung besitzen kann, werden die Trockenextrakte vor der Messung in einer Reibschale homogen verrieben.

6.2.2 Ergebnis der Röntgendiffraktometrie

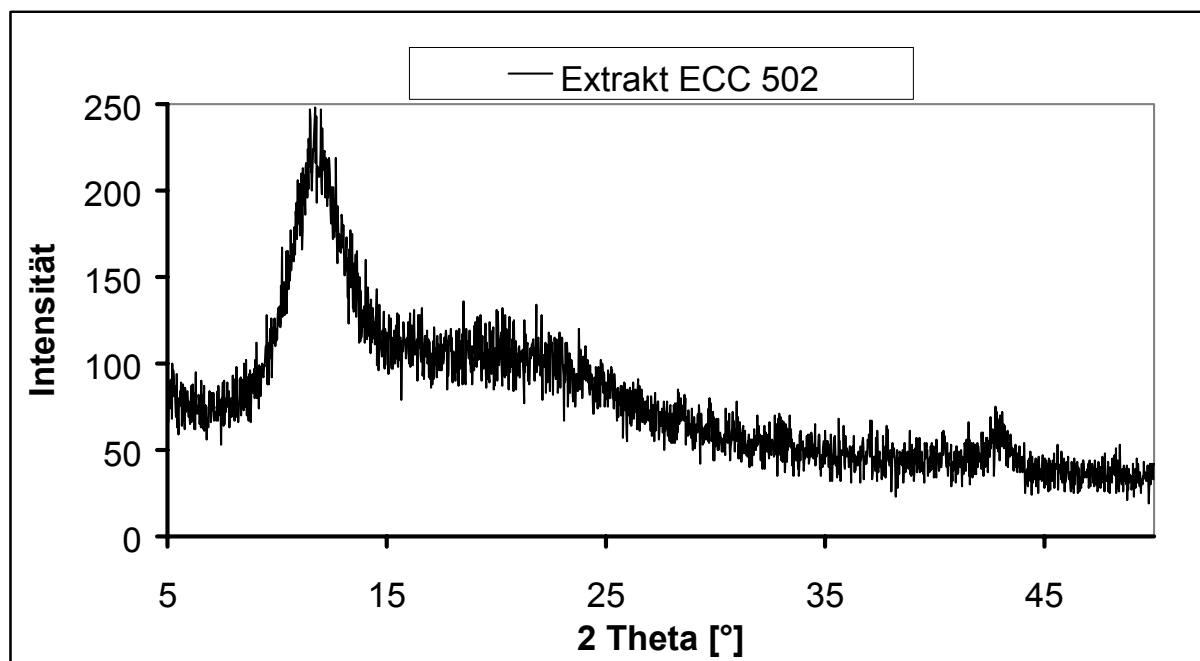


Abb. 6-2 Röntgendiffraktogramm der Charge ECC 502 eines Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham.

Auf Grund der Trocknungsart der Extrakte ist ein großer Anteil amorpher Strukturen in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. und anderen Pflanzenextrakten zu erwarten. Die Nachweisgrenze für kristalline Strukturen in einer amorphen Matrix liegt bei 5-10% (Maasz und Beyer 1987).

Abb. 6-2 zeigt das typische Röntgenbeugungsmuster eines pflanzlichen Trockenextraktes am Beispiel der Extraktcharge ECC 502. Das Diffraktogramm zeigt keinerlei kristalline Anteile. Es sind lediglich zwei deutlich ausgeprägte Halos bei $2\Theta=12^\circ$ und 43° zu erkennen, die auf ein amorphes Vorliegen der Extraktbestandteile hindeuten. Dieses Beugungsmuster erhält man bei nahezu allen untersuchten Trockenextrakten (z.B. von *Valeriana officinalis* und *Vitis vinifera*). Die einzige Ausnahme bei den gesamten untersuchten Proben stellt Charge ECC 604 des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. dar, deren Röntgendiffraktogramm in Abb. 6-3 abgebildet ist.

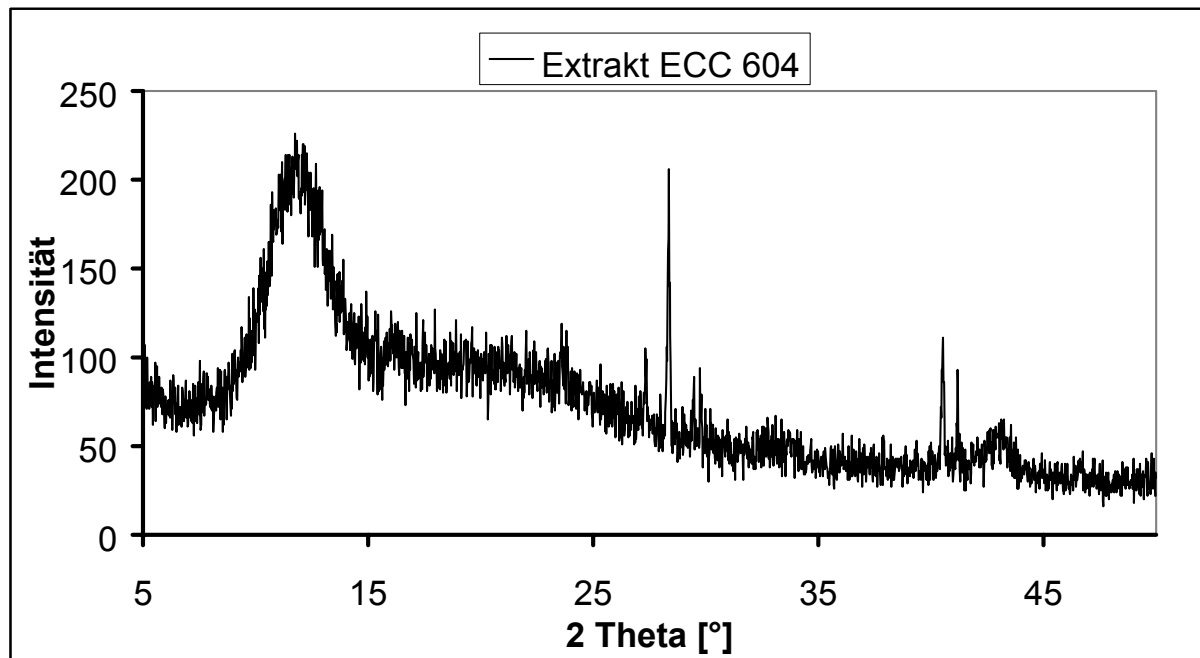


Abb. 6-3 Röntgendiffraktogramm der Charge ECC 604 eines Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham.

Hierbei lassen sich neben den für amorphe Anteile typischen Halos deutlich scharfe Peaks bei $2\Theta=28^\circ$, 40° und 41° erkennen, die auf ein kristallines Vorliegen einer oder mehrerer Komponenten in dieser Extraktcharge schließen lassen. Vergleiche mit den Beugungsmustern gängiger Inhaltsstoffe, wie Zucker oder organische Säuren, zeigen keine Übereinstimmung der Diffraktogramme mit den Peaks von Extrakt ECC 604. Lagert man diesen Extrakt etwa eine Woche bei einer relativen Feuchte von 60% und trocknet ihn anschließend im Exsikkator, werden die Peaks der kristallinen Anteile um fast das Doppelte erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass amorphe Anteile der In-

haltsstoffe durch adsorbiertes Wasser eine beschleunigte Kristallisation erfahren. Hier dient Wasser als Weichmacher, der die Glasübergangstemperatur der amorphen Strukturen erniedrigt und somit eine Kristallisation fördert (Roos 1993).

Da es sich bei Extraktcharge ECC 604 um einen relativ gut zu verarbeitenden Extrakt handelt, könnte das vermehrte Vorliegen kristalliner Anteile in diesem Extrakt eine Rolle spielen. Es stellt sich die Frage, um welche kristallinen Bestandteile es sich dabei handelt. Eine Möglichkeit stellt Kaliumglycerat dar, dass in großen Mengen im Extrakt ECC 604 vorkommt (siehe Kapitel 5.2.3). Bedauerlicherweise kann vom Kaliumsalz der Glycerinsäure kein kristallines Referenzprodukt erhalten werden, da sämtliche Syntheseversuche auf Grund der starken Hygroskopizität der Substanz fehlschlugen.

6.3 Dynamische Wasserdampfsorptionsanalyse (DVS) der Extrakte

Sorption und Desorption von Wasserdampf spielen bei vielen Verfahren in der Pharmazie eine bedeutende Rolle. So ist die Kenntnis der Wasserdampfaufnahme einer Substanz oder einer Arzneiform bei der Herstellung, Verpackung und Lagerung von Arzneimitteln von entscheidender Bedeutung (Kontny 1988). Eine vielfach durchgeführte Methode der Bestimmung des Wasserdampfsorptionsverhaltens stellt die Lagerung von Proben in Exsikkatoren dar, in denen mit Hilfe von gesättigten Salzlösungen (Hygrostaten) eine definierte relative Feuchte eingestellt wird. Diese Methode wird als sehr ungenau und zeitintensiv beschrieben (Teoh et al. 2001). Aus diesem Grund sind seit einigen Jahren Geräte in der Entwicklung, die mit Hilfe von Mikrowaagen auch geringste Massenänderungen durch Wasserdampfsorption detektieren können (Roberts 1999). Dabei werden die verschiedenen relativen Feuchten über eine Regelung der Massenströme von getrockneter und befeuchteter Luft eingestellt (Bergren 1994, Teng et al. 1991).

6.3.1 Durchführung

Das Verhalten der Wasserdampfsorption und -desorption pflanzlicher Trockenextrakte wird mit Hilfe eines vollautomatisierten Analysengerätes (DVS) untersucht, das bei Levoguer und Williams (1999) beschrieben ist. Dabei wird mit Hilfe einer Mikrowaa-

ge die Wasserdampfsorption der Trockenextrakte durch Massenänderungen mit einer Genauigkeit von 10 µg untersucht. Beim DVS-Verfahren kann die relative Feuchte sowohl kontinuierlich geändert (Rampe), als auch im Stufenmodus nach einer gewissen Zeit erhöht oder erniedrigt werden (Wadsö und Markova 2001). Bei den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wird im Stufenmodus gearbeitet. Nach kompletter Trocknung der Extrakte bei einer relativen Feuchte (r.F.) von 0% wird die Feuchte in 10%-Stufen gesteigert, wobei jede Stufe über 4 Stunden angelegt wird. Die relative Feuchte wird von 0-60% r.F. gesteigert und anschließend das Desorptionsverhalten in umgekehrten Schritten untersucht. Während den Untersuchungen herrschen isotherme Bedingungen bei 25 °C.

6.3.2 Ergebnisse der DVS-Untersuchungen

Abb. 6-4 (Seite 63 oben) zeigt die Wasserdampfsorptions- bzw. -desorptionskurven der fünf Chargen des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham., ermittelt mit Hilfe der Methode der DVS.

Bei der Wasserdampfaufnahme lässt sich kein großer Unterschied zwischen den einzelnen Extraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. erkennen. Alle Extrakte zeigen eine Massenzunahme von etwa 16%, bedingt durch Wasserdampfsorption. Unterscheiden lassen sich die Kurven allerdings hinsichtlich ihres Desorptionsverhaltens. Während die Chargen ECC 614 und ECC 604 lediglich etwa 1,5% Wasser nach Trocknung bei 0% r.F. zurückhalten, lässt sich Charge ECC 502 nur bis zu einem Restwassergehalt von etwa 8% trocknen.

In Tab. 6-1 werden die Werte für die Wasserdampfsorption bzw. -desorption mit den Zuckergehalten der einzelnen Trockenextrakte korreliert.

Tab. 6-1 Vergleich des Wassersorptions- und -desorptionsverhaltens verschiedener Trockenextrakte mit ihrem Gesamtzuckeranteil

Extrakt / Charge	Wassergehalt nach Sorption [%]	Wassergehalt nach Desorption [%]	Gesamtzuckeranteil [%]
ECC 502	16,67	8,06	13,3
ECC 606	16,13	5,95	10,2
ECC 306	15,79	2,58	8,6
ECC 614	17,14	1,5	5,6
ECC 604	15,85	1,6	2,6
Bal 4641051	9,72	6,68	29,9
Mel 5640167	11,11	7,59	9,6
Gin 1254/512	4,67	0,9	8,4
WL 98220027	10,65	1,77	11,4
WL 97220011	10,66	2,67	14,8
WL 97221287	11,37	1,95	9,4
WL 97220311	12,62	2,22	8,4
Kava 6630275	3,64	-0,35	4,81
Kava 3640170	1,1	-0,26	0,59
Xys 38830/1	10,74	2,30	14,3
Xys 38830/2	11,16	2,57	14,6

Die Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. zeigen die höchsten Werte der Wasserdampfsorption im Vergleich zu anderen pflanzlichen Extrakten, lassen jedoch wie oben erwähnt kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen erkennen. Korreliert man den Restwassergehalt nach Desorption in % mit dem Gesamtzuckeranteil in % (siehe Kasten in Tab. 6-1), erhält man für die Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. einen Korrelationskoeffizienten von 0,909. Die Extrakte anderer Pflanzen zeigen diese Korrelation allerdings nicht. So zeigen in DVS-Versuchen z.B. die Extrakte von *Valeriana officinalis* und *Panax ginseng* im Verhältnis zu ihren recht hohen Zuckeranteilen eine geringe Hygroskopizität.

Kava-Kava-Extrakte stellen ebenfalls Extraktzubereitungen mit einer vergleichsweise sehr geringen Hygroskopizität dar. Die Extrakte von *Piper methysticum* nehmen bei einem Zuckeranteil von bis zu 4,8% bei einer relativen Feuchte von 60% nur etwa

3,5% Wasser auf und geben nach Trocknung das gesamte adsorbierte Wasser wieder ab (Abb. 6-5).

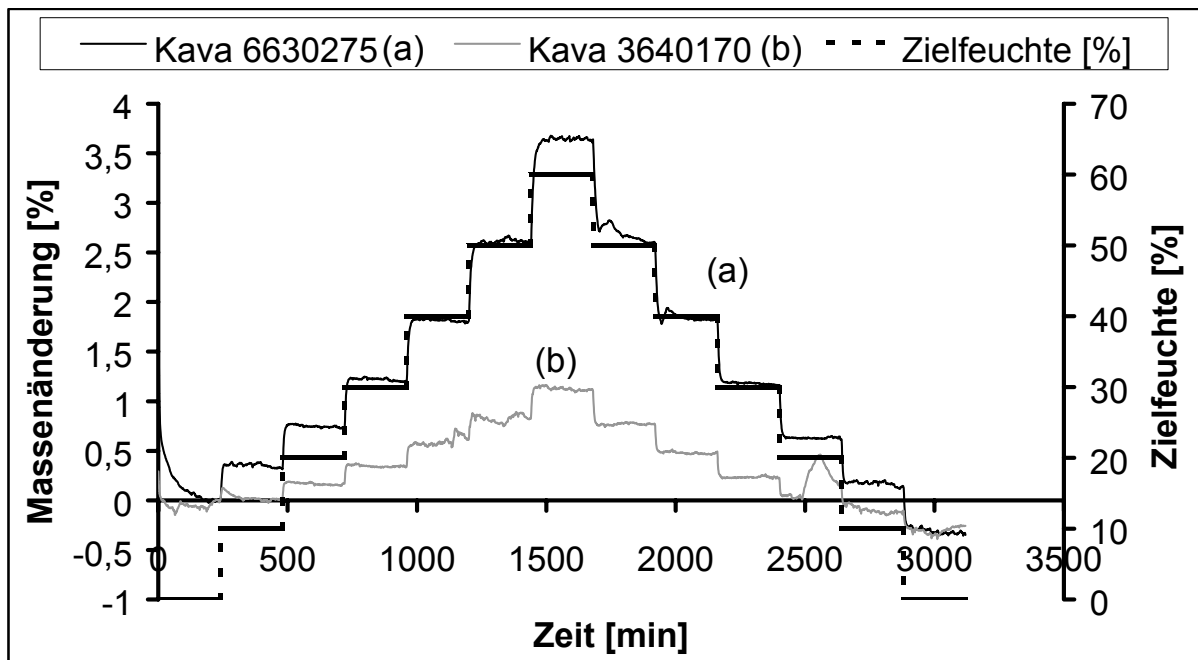


Abb. 6-5 DVS-Kurven der Wasserdampfsorption und -desorption der Trockenextrakte von *Piper methysticum* (Kava-Kava)

Durch die relativ geringen Werte der Wasseraufnahme der Trockenextrakte von *Piper methysticum* fallen die Schwankungen der Massenänderung viel stärker ins Gewicht. Insgesamt lässt sich hier ein gewisser Einfluss des Zuckergehaltes auf die Hygroskopizität der Extrakte erkennen, da die Charge, die weniger Zucker enthält (Kav 3640170) auch eine geringere Wasseraufnahme aufweist.

6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Analyse der Extrakte mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) zeigt keinen Unterschied zwischen den Chargen ECC 604 und ECC 606 des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham.. Mit dieser Methode lässt sich kein unterschiedlicher Wert für den Kristallinitätsindex dieser beiden Chargen detektieren.

Die Röntgendiffraktometrie zeigt zwar Unterschiede zwischen verschiedenen Extraktchargen, die Ergebnisse können jedoch die Unterschiede im hygroskopischen Verhalten nicht erklären. So lässt der relativ unkompliziert zu verarbeitende Extrakt ECC 604 kristalline Muster erkennen, die durch feuchte Lagerung und nachfolgende Trocknung

noch verstärkt werden. Die Extrakte anderer Pflanzen zeigen allerdings nur amorphe Muster in Form von diffusen Halos. Da diese Extrakte nur eine geringe Hygroskopizität aufweisen, muss die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe bei der Ausbildung hygroskopischer Eigenschaften eine größere Rolle im Vergleich zu deren physikalischem Zustand spielen.

Die Methode der dynamischen Wasserdampfsorption (DVS) ist eine präzise und zeitsparende Messung des isothermen Wasserdampfsorptions- bzw. -desorptionsverhaltens von pflanzlichen Trockenextrakten. Der Restwassergehalt nach Desorption von Adsorptivwasser scheint in gewisser Weise mit dem Gesamtzuckergehalt dieser Extrakte zu korrelieren. Dies ist allerdings bei anderen pflanzlichen Extrakten nur bedingt der Fall. Die Gehalte an organischen Säuren hingegen, und hierbei vor allem der Gehalt an Glycerinsäure, lassen keine Korrelation mit der Wassersorption und -desorption der verschiedenen Chargen des *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextraktes erkennen. Es kann also keine Substanzgruppe allein für die Hygroskopizität der Trockenextrakte verantwortlich gemacht werden, sondern ein Zusammenspiel verschiedener Inhaltsstoffe, wie z.B. der Zucker und der organischen Säuren, spielen bei der Ausbildung hygroskopischer Eigenschaften eine Rolle.

Die DVS-Untersuchungen der von Ionen befreiten Extrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. werden in Kapitel 8.1.3 aufgeführt.

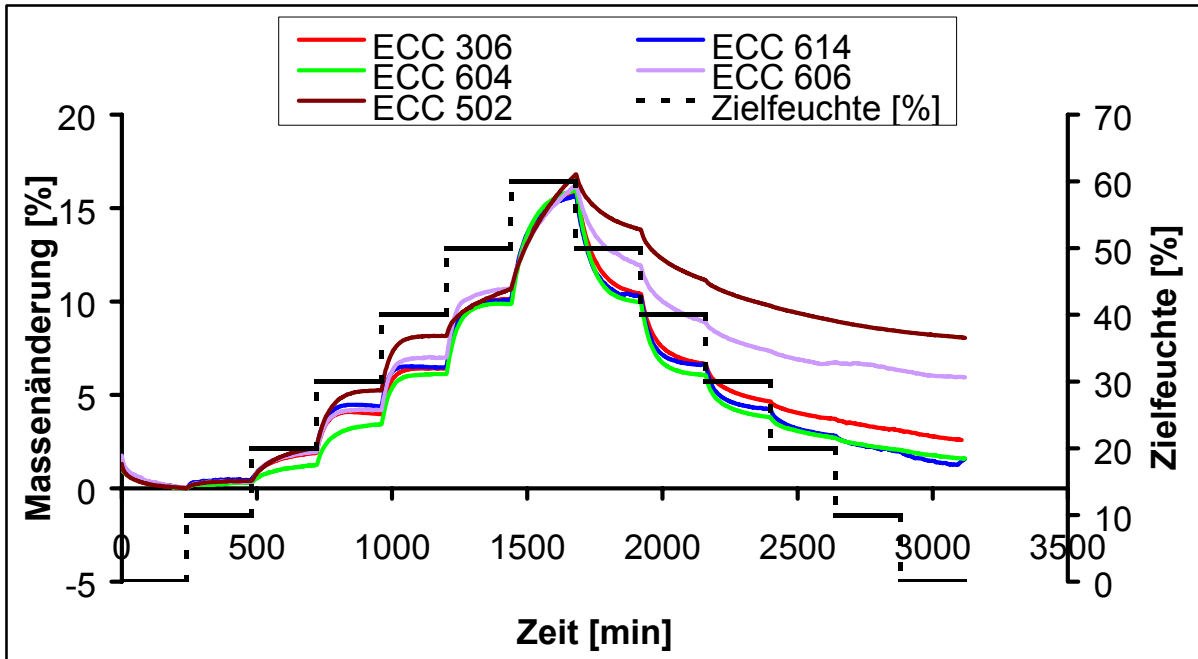


Abb. 6-4 Ergebnisse der DVS-Bestimmung der Wasserdampfsorption und -desorption von Trockenextrakten aus *Eschscholtzia californica* Cham.

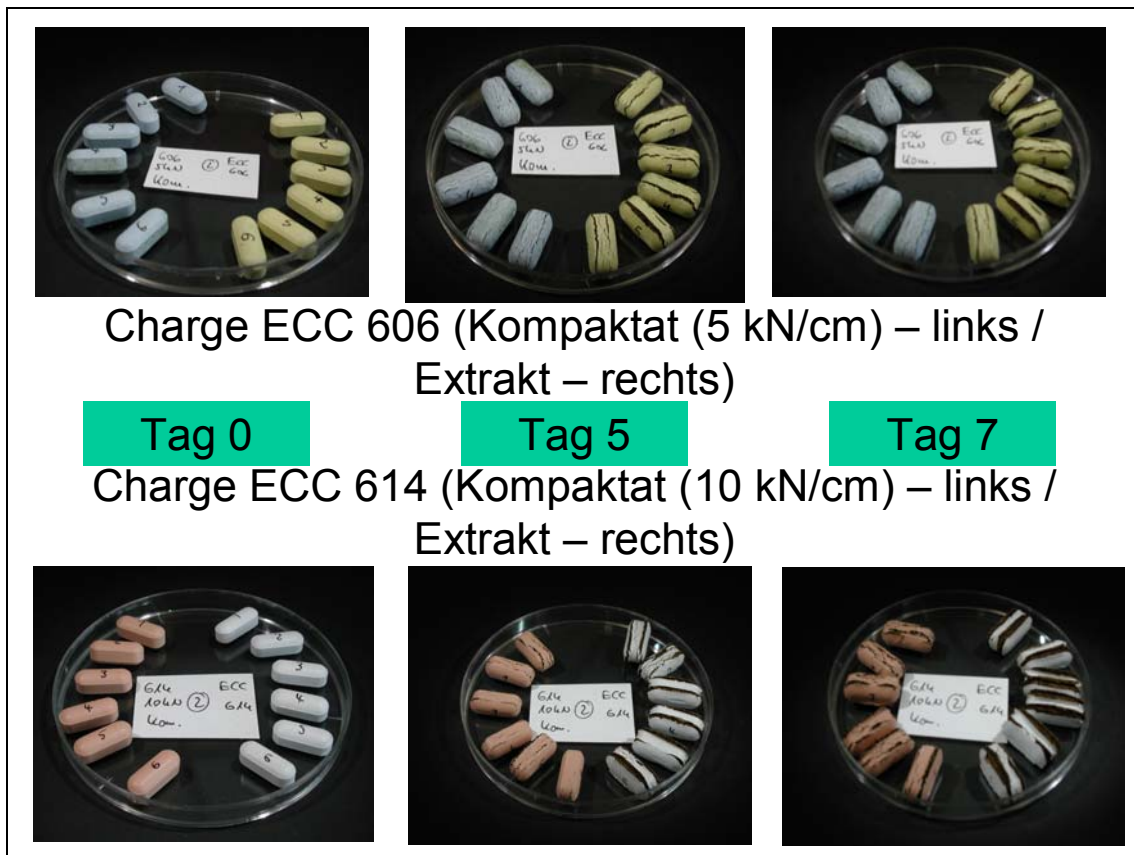


Abb. 7-13 Vergleich der „Stabilität“ von Kompaktat- und Extraktfilm-tabletten nach Lagerung bei 25 °C und 60% r.F.

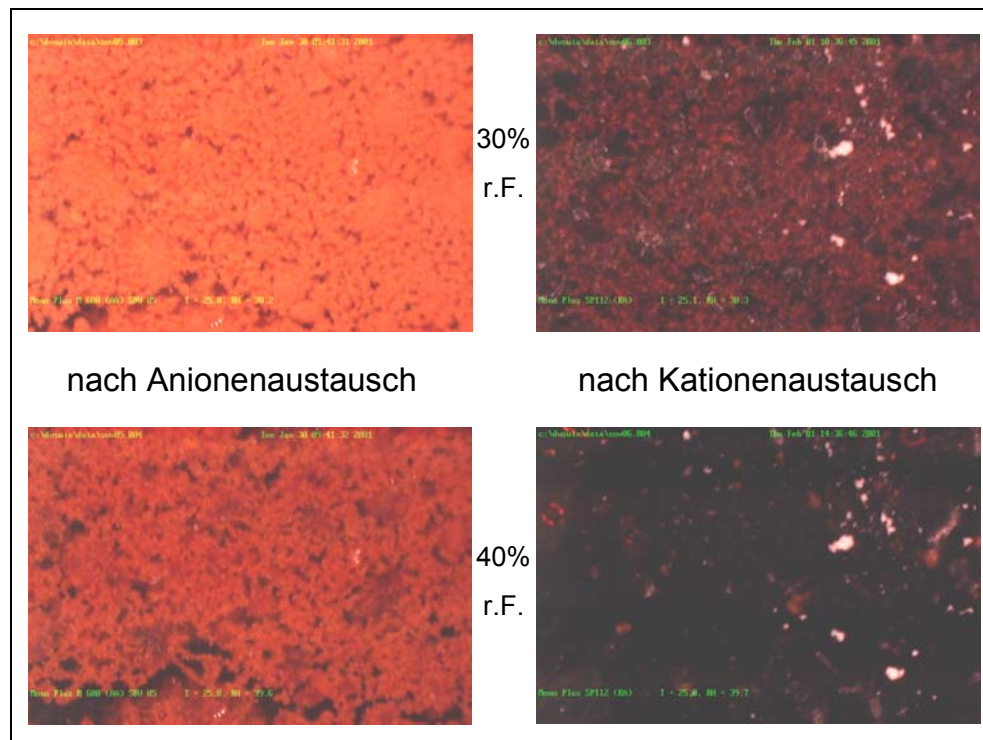


Abb. 8-2 Digitalaufnahmen der modifizierten, von Anionen bzw. Kationen befreiten Extrakte von ECC 606 bei der DVS-Bestimmung nach 30% bzw. 40% r.F.



Abb. 8-5 Vergleich der „Stabilität“ von Extraktfilmtabletten der Charge ECC 606 nach Entfernung der Anionen bzw. Kationen unter Lagerung bei 25 °C und 60% r.F.

KAPITEL 7

KOMPAKTIERUNG, TABLETTIERUNG, COATING UND

STABILITÄT DER ERHALTENEN FILMTABLETTEN

Pulvermischungen mit Partikeln geringer Größe zeigen oft Schwierigkeiten in der Weiterverarbeitung (Rumpf 1974). So führt eine unzureichende Fließfähigkeit dieser Pulver z.B. zu einer schlechten Dosierungsgenauigkeit bei der Tablettierung, bedingt durch eine schwankende Matrizenfüllung. Ein hoher Feinanteil in einer Tablettiermischung begünstigt außerdem das Kleben der Mischung an den Presswerkzeugen. Des weiteren führen Schüttgüter mit einem hohen Schüttvolumen zu einer erhöhten Staubentwicklung und aus den resultierenden voluminösen Produkten ergeben sich hohe Frachtkosten.

Bei der Tablettierung im pharmazeutischen Bereich wird aus diesen Gründen oft ein Granulationsschritt vorgeschaltet, der sich auch positiv auf die Tablettiereigenschaften der zu verpressenden Substanzen auswirkt (Arnaud et al. 1998). So wird die Fließfähigkeit von Pulvern durch den Partikel Aufbau im Zuge einer Granulation signifikant verbessert. Des weiteren kann durch den Einsatz hydrophiler Bindemittel eine bessere Benetzbarkeit und damit eine gesteigerte Freisetzungsrates lipophiler Bestandteile der Mischung erreicht werden. Die durch eine Granulation verbesserte Tablettierbarkeit führt zu Tabletten mit einer höheren Bruchfestigkeit und einer niedrigeren Friabilität.

Die hygroskopischen Eigenschaften von Trockenextrakten schließen eine Feuchtgranulation unter Einsatz von Wasser oder wässrigen Granulierflüssigkeiten aus. In der Literatur sind mehrere Verfahren der Tablettierung pflanzlicher Extrakte mit oder ohne vorgeschaltetem Granulationsschritt beschrieben. So tablettieren Plaizier-Vercammen und Bruwier (1986) sprühgetrocknete Extrakte von *Harpagophytum procumbens*. Palma et al. (1999) beladen verschiedene Pflanzenextrakte mit kolloidalem amorphem Siliciumdioxid und erzielen dadurch verbesserte Fließ- und Kompressionseigenschaften der Produkte bei der nachfolgenden Direkttablettierung. Eine Feuchtgranulation

von *Plantago lanceolata*-Trockenextrakten mit einer Mischung aus Aceton und Isopropanol beschreiben Diaz et al. (1997). Der Einsatz von organischen Lösungsmitteln bringt jedoch die bekannten Nachteile der Brennbarkeit und Explosivität, sowie eine erhöhte Umweltbelastung mit sich.

Die Walzenkompaktierung, also die Verdichtung von Pulvern zwischen zwei gegenläufigen Presswalzen, stellt als Trockengranulierungsmethode eine Alternative für die Granulation pflanzlicher Trockenextrakte dar (Rocksloh 1999).

7.1 Kompaktierung der Extrakte

7.1.1 Einleitung

Bei der Trockengranulation unterscheidet man grundsätzlich zwischen den Verfahren der Walzenkompaktierung und der Brikettierung. Die letztgenannte Methode, also die Herstellung größerer Tabletten oder Briketts unter starkem Druck mit anschließendem Zerkleinerungsschritt, wird von Keymer (1969) für die Herstellung von Trockengranulaten aus pflanzlichen Extrakten angewendet. Der Einsatz eines Walzenkompaktors bietet im Gegensatz zur Brikettierung jedoch Vorzüge hinsichtlich einer kontinuierlichen Produktion und einer verbesserten Kontrolle des aufgewendeten Drucks und der Verweilzeit des Materials zwischen den Walzen (Falzone et al. 1992).

Herrmann (1973) und Miller (1997) geben einen umfassenden Überblick über die Grundlagen des Kompaktierens von Pulvern zwischen zwei Walzen. Die Agglomerate entstehen dabei durch eine Annäherung der Teilchen unter Kraftereinwirkung und durch das dadurch bedingte Auftreten hoher Van-der-Waals-Kräfte (Bakele 1992). Die erhaltenen Kompaktate besitzen im Vergleich zu den Ausgangspartikeln verbesserte Fließeigenschaften, höhere Schüttdichten und weisen einen verminderten Staubanteil auf (Cohn et al. 1966).

Generell bestehen Walzenkompaktoren aus den drei Bereichen der Zuführ-, der Kompaktier- und der Granuliereinheit (Shlieout et al. 2000). Die Produktzuführung kann entweder mittels eines Freifalltrichters oder mit Hilfe von Förderschnecken geschehen, wobei die erstgenannte Methode einen größeren Walzendurchmesser erfordert und auf den Einsatz frei fließender Stoffe begrenzt ist, was vor einer Granulation in der Regel

nicht der Fall ist (Johanson 1996). Daher sind vor allem Förderschnecken im Einsatz, die für eine gleichmäßige Produktzufuhr in den Einzugsbereich der beiden Walzen sorgen und das Pulver dabei entlüften und vorverdichten (Miller 1994). Die Konstruktion der Produktzuführung variiert, ebenso wie der Aufbau der Kompaktiereinheit, von Hersteller zu Hersteller. In der vorliegenden Arbeit kommt ein GMP Mini-Pactor (Fa. Gerteis) zum Einsatz, bei dem das Produkt mit Hilfe von zwei Schnecken in die Kompaktierzone gefördert wird. Die horizontale Dosierschnecke sorgt für den Transport des Pulvers vom Vorratsbehälter zur vertikalen Stopfschnecke, die ihrerseits das Material zwischen die beiden Walzen fördert (Abb. 7-1).

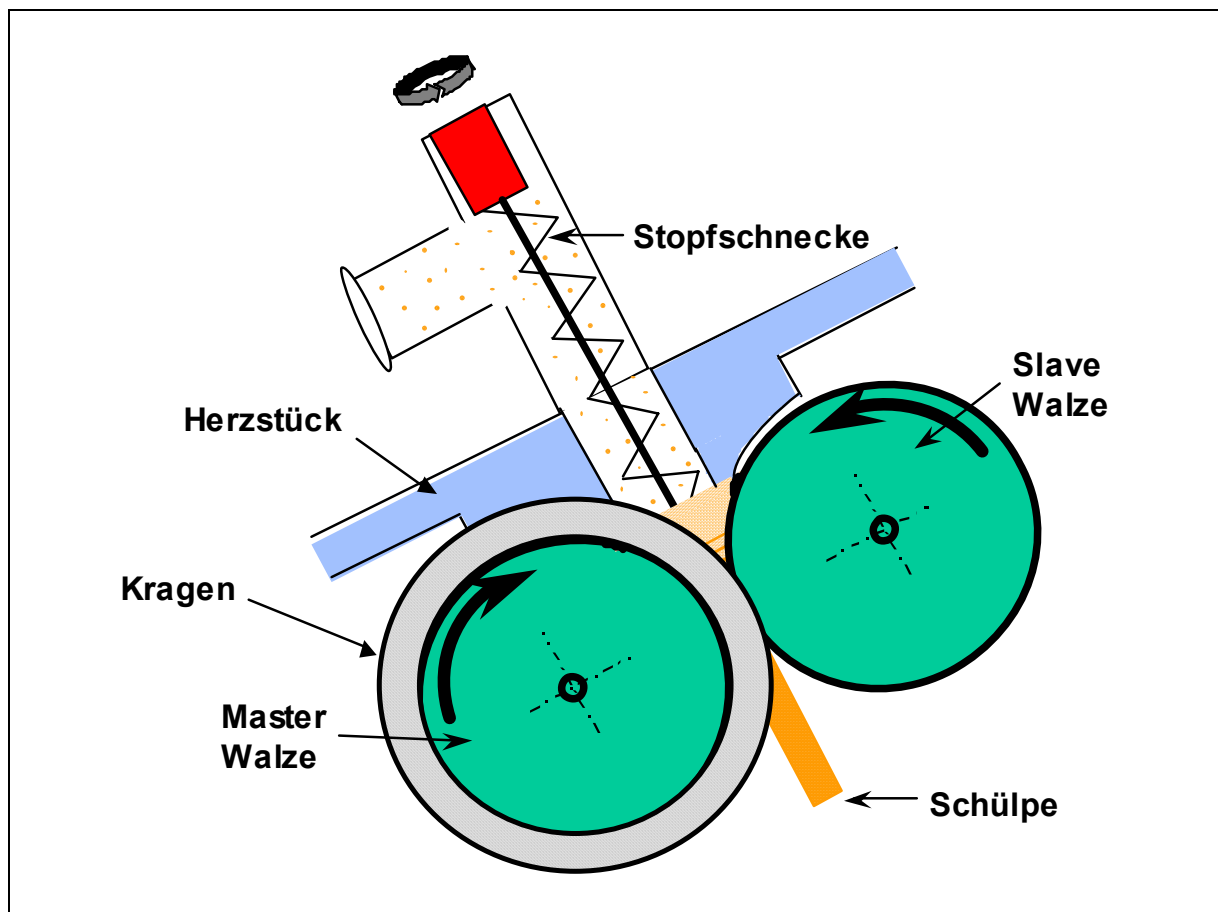


Abb. 7-1 *Detailansicht der Kompaktierzone des GMP Mini-Pactors¹*

Die Kompaktierwalzen des Kompaktors der Fa. Gerteis sind in einem Winkel von 30° gegen die Horizontale angeordnet, was einen positiven Einfluss auf einen gleichmäßigen Produkttransport hat (Shlieout et al. 2000). Eine Walze ist fest montiert (Master-

¹ Für die Überlassung der Abbildung danke ich Herrn Dr. R. Lammens (Fa. Bayer)

walze), während die andere (Slavewalze) in einem Hydraulikzylinder beweglich gelagert ist (Abb. 7-1).

Über die hydraulische Kraftübertragung auf die Slavewalze kann die eingestellte Kompaktierkraft bei konstanter Spaltbreite aufrechterhalten werden. Seitlich an der Masterwalze sind Kragen montiert, die für eine gleichbleibende Kraftverteilung über die gesamte Walzenbreite sorgen, was wiederum die Gleichmäßigkeit der Qualität der erhaltenen Schülpen und damit der Kompaktate positiv beeinflusst (Funakoshi et al. 1977). Dem Kompaktierprozess ist ein Siebgranulator mit einer Maschenweite von 1 mm nachgeschaltet, der für die Zerkleinerung der Schülpen sorgt und somit den eigentlichen Granulierschritt im Prozess darstellt. Beim verwendeten GMP Mini-Pactor ist durch Regelung der Geschwindigkeiten von Stopf- und Dosierschnecke, der Umdrehungsgeschwindigkeiten der beiden Walzen sowie des Granulators und der dabei jeweils auftretenden Drehmomente eine optimale Prozesskontrolle möglich. Sowohl Kompaktierkraft als auch Spaltbreite werden über den gesamten Prozessverlauf konstant gehalten und aufgezeichnet. Eine ausführliche Beschreibung dieses Kompaktors findet sich bei von Eggelkraut-Gottanka (2001).

7.1.2 Beobachtungen

Mit Hilfe des GMP Mini-Pactors werden drei verschiedene Chargen eines Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. kompaktiert und die erhaltenen Kompaktate hinsichtlich ihrer Partikelgrößenverteilung und Fließeigenschaften untersucht. Ein Zusatz von 2% Magnesiumstearat zu den Extrakten ist notwendig, um ein Kleben von Trockenextraktmaterial an den Walzenoberflächen zu verhindern.

Im Laufe des Kompaktierprozesses werden deutliche Unterschiede in der Verarbeitbarkeit einzelner Chargen beobachtet. Während sich die Chargen ECC 604 und ECC 614 über den gesamten Kraftbereich der Kompaktierung (5-20 kN/cm) problemlos zu Schülpen verarbeiten lassen, zeigt Charge ECC 606 bereits bei einer Kompaktierkraft von 10 kN/cm eine deutliche plastische Verformung, die zu einer unansehnlichen und klebrigen Schülpe führt. Abb. 7-2 zeigt die erhaltenen Schülpen verschiedener Chargen des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham., die das unterschiedliche Kompaktierverhalten deutlich aufzeigen.



*Abb. 7-2 Unterschiede im Kompaktierverhalten verschiedener Extraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakt am Beispiel der unterschiedlich ausgebildeten Schülpfen*

Abb. 7-3 zeigt einen Ausschnitt der Aufzeichnung der Prozessparameter, erhalten bei der Kompaktierung von Extraktcharge ECC 606 mit einer Kompaktierkraft von 5 kN/cm. Über die laufend aufgezeichneten Parameter lassen sich folgende Vorgänge sehr gut verdeutlichen: Im Gegensatz zu den Chargen ECC 604 und ECC 614 ist im Verlauf der Kompaktierung von Charge ECC 606 eine automatische Regelung auf eine konstante Spaltbreite nicht möglich, da auf Grund der plastischen Verformung des Extraktes die Schwankungen der Spaltbreite zu hoch sind, um von der Hydraulik ausgeglichen werden zu können. Der Kompaktierprozess von Charge ECC 606 lässt sich bei einer Kraft von 5 kN/cm manuell noch regeln. Bei Kräften oberhalb von 15 kN/cm ist kein geregeltes Arbeiten mehr möglich und der Prozess muss auf Grund massiver Ablagerungen an der Stopfschnecke und einer in Folge davon inakzeptablen Erhöhung des Drehmomentes der Schnecke abgebrochen werden, so dass bei den unten aufge-

fürten Ergebnissen für Extraktcharge ECC 606 lediglich Granulate, hergestellt bis zu einer Kompaktierkraft von 10 kN/cm, aufgeführt werden.

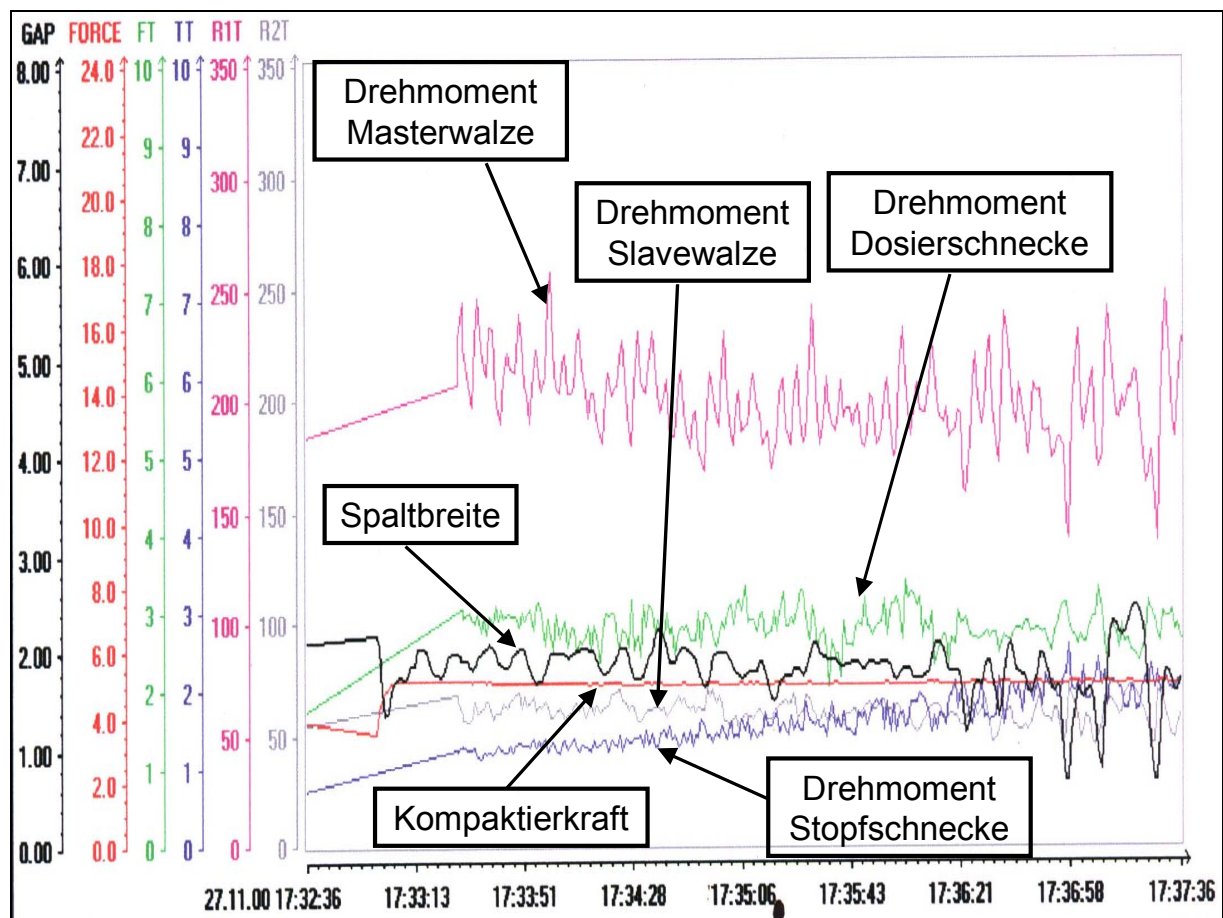


Abb. 7-3 Parameter der Prozesssteuerung, aufgenommen bei der Kompaktierung von Charge ECC 606 bei einer Kraft von 5 kN/cm, die die Erhöhung des Stopfschneckendrehmomentes und die starken Schwankungen der Spaltbreite aufzeigen

7.2 Pulvertechnologie, Partikelgrößenbestimmung

Die erhaltenen Kompaktate werden sowohl pulvertechnologisch als auch hinsichtlich ihrer Teilchengrößenverteilung untersucht und die Ergebnisse mit denen der Ausgangsextraktpulver verglichen.

7.2.1 Durchführung der pulvertechnologischen Bestimmungen

Die Schütt- und Stampfdichte von Extrakten und Granulaten sowie der daraus resultierende Hausnerfaktor werden analog den Arzneibuchmethoden ermittelt. Der Bö-

schungswinkel der Kompaktate wird mit der Trichtermethode nach Dr. Pfrengle (DIN 53916) bestimmt, während die Extraktpulver auf Grund ihrer mangelnden Fließfähigkeit einer Untersuchung mittels der Sieb-Kegel-Methode unterzogen werden.

7.2.2 Ergebnisse der Pulvertechnologie

Der Hausnerfaktor errechnet sich aus dem Quotienten von Stampf- und Schüttdichte und stellt ein Maß für die Kompressibilität einer Substanz dar. Er sollte im Idealfall bei Werten von 1 oder wenig darüber liegen. Je näher der Hausnerfaktor dem Idealwert 1 kommt, um so besser sind die Kompressionseigenschaften der zu tablettierenden Substanz. In Abb. 7-4 sind die Hausnerfaktoren von Kompaktaten der verschiedenen Trockenextraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. denen der Ausgangsextrakte gegenübergestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit werden die Extraktpulver ebenfalls mit 2% Magnesiumstearat versetzt.

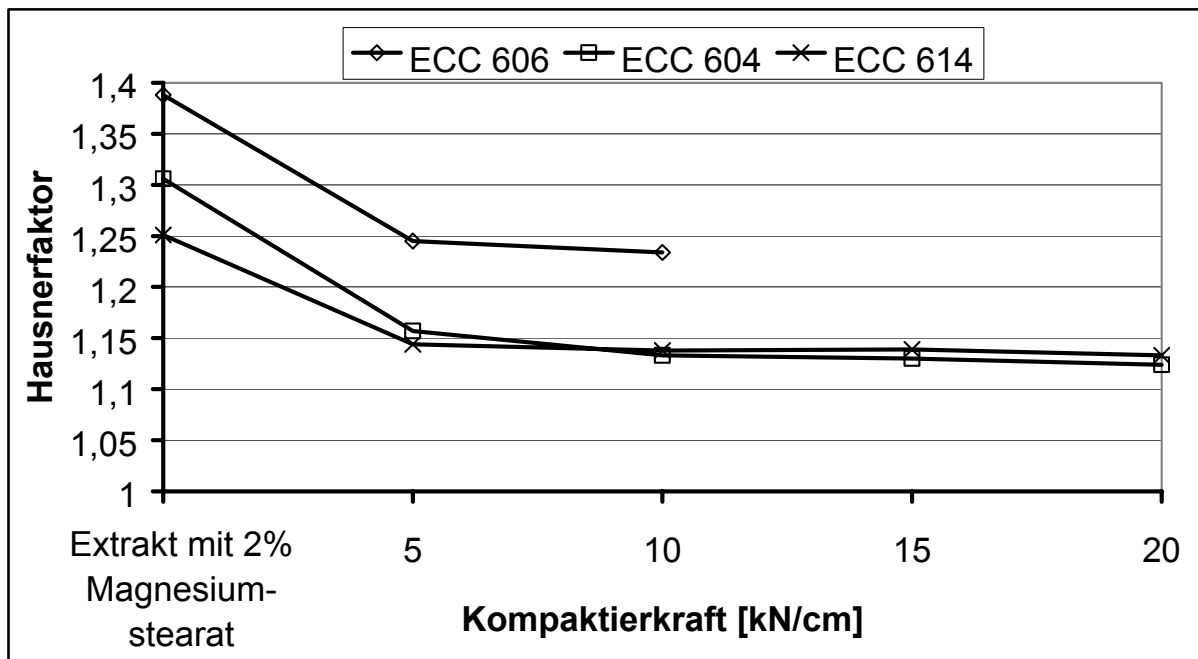


Abb. 7-4 Hausnerfaktoren der Kompaktate in Abhängigkeit von der aufgewendeten Kompaktierkraft ($n=2$)

Es lässt sich bei allen drei Chargen eine deutliche Erniedrigung der Hausnerfaktoren der Kompaktate im Vergleich zu den Ausgangsextrakten erkennen. Diese werden von Werten zwischen 1,25 und 1,4 auf durchschnittlich 1,16 gesenkt. Die Extraktcharge ECC 606 lässt hierbei extrem schlechte Werte für den Hausnerfaktor erkennen, die

sich nach der Kompaktierung zwar verbessern, aber dennoch nur im Bereich der beiden anderen Originalextrakte liegen.

Je kleiner der Böschungswinkel, um so besser fließfähig ist ein Pulver oder eine Pulvermischung. In Abb. 7-5 sind die Ergebnisse der Böschungswinkeluntersuchungen von Extrakten und Kompaktaten dargestellt, wobei deutliche Unterschiede in deren Fließverhalten sichtbar werden.

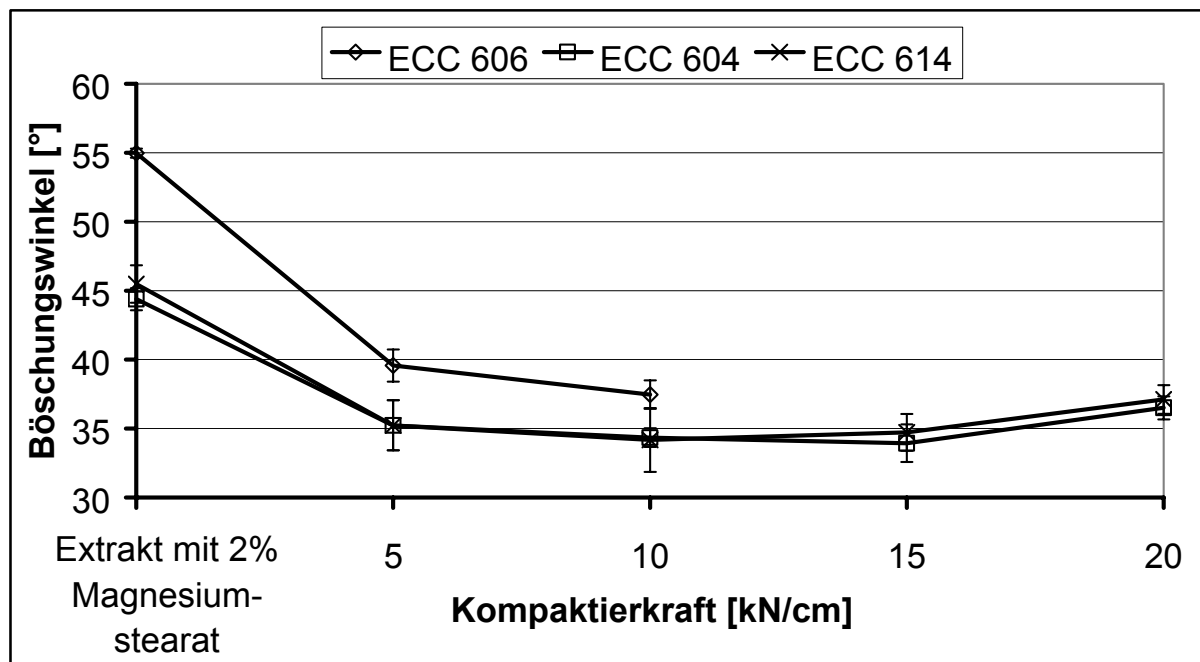


Abb. 7-5 Böschungswinkel der Kompaktate im Vergleich zu den Originalextrakten in Abhängigkeit von der Kompaktierkraft ($n=3$)

Die Ergebnisse der Bestimmung des Böschungswinkels lassen eine deutliche Verbesserung der Fließeigenschaften durch die Kompaktierung erkennen. Die optimale Kompaktierkraft scheint im Hinblick auf die Fließfähigkeit bei Werten zwischen 10 und 15 kN/cm zu liegen, da sich bei einer Kraft von 20 kN/cm wieder größere Böschungswinkel ergeben. Allgemein liegen die Böschungswinkel der Kompaktate mit Werten um die 35° noch in einem relativ hohen Bereich. Sowohl der Originalextrakt als auch die Kompaktate von Charge ECC 606 stellen bei dieser pulvertechnologischen Bestimmung wiederum Produkte mit einer extrem schlechten Fließfähigkeit dar.

7.2.3 Durchführung der Partikelgrößenbestimmung

Die Teilchengrößenanalyse der Extraktpulver und der Kompaktate wird mit einem Laserbeugungsspektrometer der Fa. Malvern durchgeführt.

7.2.4 Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung

Tab. 7-1 zeigt die durchschnittlichen mittleren Partikelgrößen (d_{50}) der Extrakte und Kompaktate, hergestellt aus verschiedenen Chargen des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham..

Tab. 7-1 d_{50} -Werte [μm] der drei verschiedenen Extraktchargen und der daraus hergestellten Kompaktate

Extraktcharge	Kompaktierkraft [kN/cm]	d_{50} [μm]
ECC 606	Extrakt	94,7
	5	404,9
	10	464,6
ECC 604	Extrakt	78,4
	5	354,2
	10	511,7
	15	500,1
	20	522,0
ECC 614	Extrakt	95,2
	5	508,3
	10	526,6
	15	593,5
	20	625,3

Parrott (1981) bestimmt nach Kompaktierung verschiedener Stoffe und Granulierung der erhaltenen Schülpen mit einem 1 mm-Sieb mittels Siebanalyse d_{50} -Werte von Kompaktaten, die bei etwa 700 μm liegen. Für sprödebrüchige Substanzen, wie z.B. Dicalciumphosphate, werden mittlere Korngrößen von etwa 440-480 μm gefunden, die sich auf eine erhöhte Fragmentierungsneigung dieser Substanzen zurückführen lassen.

Die d_{50} -Werte der Kompaktate von *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakten liegen bei 500–600 μm , so dass es sich bei den untersuchten Extrakten um Substanzen mit teilweise sprödebrüchigem Verhalten handelt.

Gegenüber den Originalextrakten liegen die gemessenen Partikelgrößen der Kompaktate bei etwa fünffach höheren Werten. Es lässt sich zeigen, dass bei höheren Kompaktierkräften größere d_{50} -Werte resultieren. Trotzdem findet sich bei den Korngrößenanalysen der Kompaktate ein signifikanter Feinanteil von Partikeln mit einer Größe von unter 100 μm , der vermehrt bei mit niedrigeren Kompaktierdrücken hergestellten Kompaktaten auftritt. Als gravierenden Nachteil der Walzenkompaktierung sehen Ingelbrecht und Remon (1998) die Produktion einer größeren Menge von Feinanteil, der unkompaktiert zwischen Walze und Abdichtung durch den Prozess gelangt. Dies kann durch die Laserbeugungsbestimmung der Korngrößenverteilung bestätigt werden und ist auch während des Prozesses visuell erkennbar. Ein zu hoher Feinanteil in einer Pulvermischung beeinflusst die Fließeigenschaften dieser Mischung negativ (Elbicki und Tardos 1998). Hiermit können die noch relativ schlechten pulvertechnologischen Eigenschaften der erhaltenen Kompaktate mit dem erhöhten Feinanteil erklärt werden.

7.3 Tablettierung der Extrakte und Kompaktate mit anschließendem Coating der Tabletten

Im Folgenden wird untersucht, welchen Einfluss die Kompaktierung auf die Tablettiereigenschaften der Extrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. besitzt und wie sich die Parameter Bruchfestigkeit und Zerfallszeit der Tabletten in Abhängigkeit von der aufgewendeten Presskraft ändern.

7.3.1 Tablettierung

Sowohl Extraktpulver als auch Kompaktate unterschiedlicher Kompaktierkraft werden auf einer Rundlauftablettenpresse zusammen mit Hilfsstoffen (u.a. mikrokristalliner Cellulose als Füllstoff) verarbeitet. Die Vorteile der mikrokristallinen Cellulose gegenüber anderen Hilfsstoffen für die Verwendung als Füllstoff bei der Tablettierung

hygroskopischer Pflanzenextrakte sind bei Gupta et al. (1981) aufgeführt. Den Extrakten werden aus Gründen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse, v.a. hinsichtlich der Presskraft-Zerfallszeit-Profile, 2% Magnesiumstearat zugesetzt, um dieselbe Zusammensetzung wie die der Kompaktatabletten zu erreichen. Die Rezeptur der Tabletten ist in Tab. 9-10 in Kapitel 9.6.7 aufgeführt.

7.3.1.1 Beobachtungen

Schon bereits während der Tablettierung zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den extraktpulverhaltigen und den kompaktathaltigen Tablettiermischungen. Während mit den Mischungen der Originalextrakte auf Grund der sehr schlechten Fließfähigkeit nur eine unregelmäßige Befüllung der Matrizen erzielt werden kann, verbessert die Walzenkompaktierung die Handhabung und Verarbeitbarkeit der Trockenextrakte wesentlich. Das einzige Problem, welches gelegentlich auftritt, ist eine leichte Entmischungstendenz, die auf die unterschiedlichen Partikelgrößen der Kompaktate und der als Füllstoff verwendeten mikrokristallinen Cellulose zurückzuführen ist. Hier müsste eine Mengenoptimierung des Verhältnisses von Granulat zu Füllstoff erfolgen. Die Gleichförmigkeit der Masse nach Ph. Eur. 2002, 2.9.5. ist jedoch in allen Fällen gewährleistet.

7.3.1.2 Eigenschaften der Tabletten

Abb. 7-6 zeigt typische Presskraft-Bruchfestigkeits-Profile von extrakthaltigen im Vergleich zu kompaktathaltigen Tablettiermischungen.

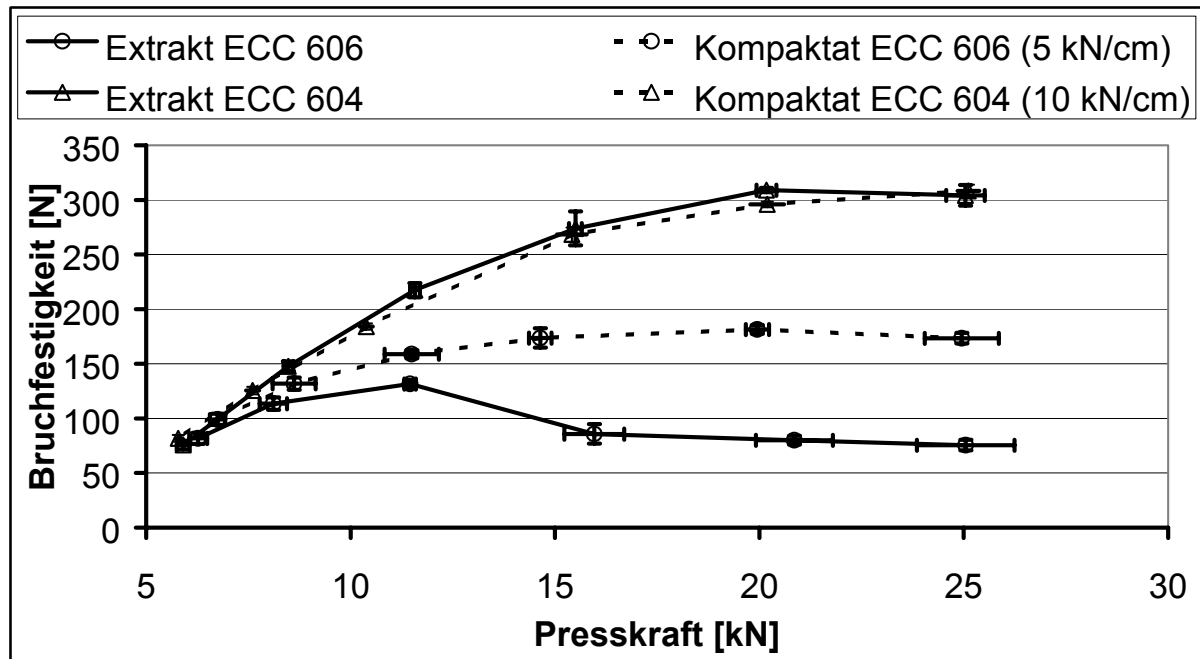


Abb. 7-6 Vergleich der Presskraft-Bruchfestigkeits-Profile von kompaktathaltigen Mischungen mit denen der Ausgangsextrakte zweier verschiedener Chargen von *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakt

Charge ECC 606 lässt sich in Form des Extraktpulvers sehr schlecht verpressen. Bereits bei einer Presskraft von etwa 12 kN beginnen die Tabletten zu deckeln und ab etwa 16 kN ist eine problemlose Tablettierung nicht mehr möglich. Ein weiteres Problem stellen starke Klebetendenzen der extrakthaltigen Mischung dar, die bereits nach kurzer Zeit zu Kraterbildung an den Tablettenoberflächen führen und eine manuelle Reinigung der Stempelflächen notwendig machen. Schaut man sich im Vergleich dazu das Profil der kompaktathaltigen Mischung von Extrakt ECC 606 an, lässt sich eine deutlich verminderte Deckelneigung erkennen. Außerdem zeigt diese Mischung nur noch eine geringe Klebetendenz, so dass über den gesamten Presskraftbereich die Tablettierung gut möglich ist. Einen weiteren Hinweis auf die Verbesserung der Tablettiereigenschaften durch Kompaktierung geben die horizontalen Fehlerbalken, die als 95%-ige Konfidenzintervalle der Presskräfte ein Maß für Presskraftschwankungen während des Prozesses darstellen. Diese sind bei der Extrakttablettierung deutlich ausgeprägter als bei der Herstellung der Kompaktattabletten. Bei Extraktcharge ECC 604 unterscheiden sich die Profile der Mischungen von Ausgangsextrakt und Kompaktat in ihrem Verlauf dagegen nur unwesentlich.

Den Einfluss der Kompaktierkraft auf die Presskraft-Bruchfestigkeits-Profile bei der Tablettierung von Charge ECC 614 ist in Abb. 7-7 dargestellt. Es lässt sich eine deutliche Verbesserung der Tablettiereigenschaften durch die Kompaktierung, unabhängig von der angelegten Kompaktierkraft, erkennen. Die Kompaktierkraft besitzt also keinen Einfluss auf die Bruchfestigkeit der Kompaktattabletten. Zur gleichen Schlussfolgerung gelangen auch Murray et al. (1998).

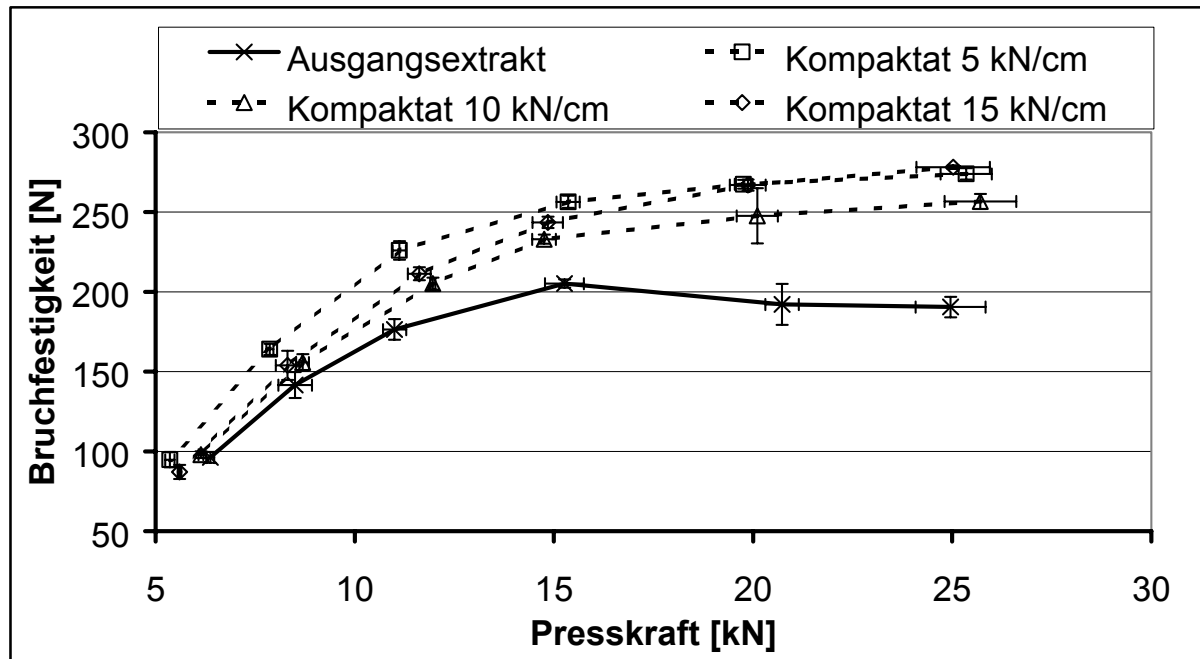


Abb. 7-7 Vergleich der Presskraft-Bruchfestigkeits-Profile von mit verschiedener Kompaktierkraft hergestellten Kompaktaten von Charge ECC 614 mit denen des Ausgangsextraktes

Die Presskraft-Zerfallszeit-Profile der Kompaktate zweier Chargen werden in Abb. 7-8 den Profilen der Ausgangsextrakte gegenübergestellt.

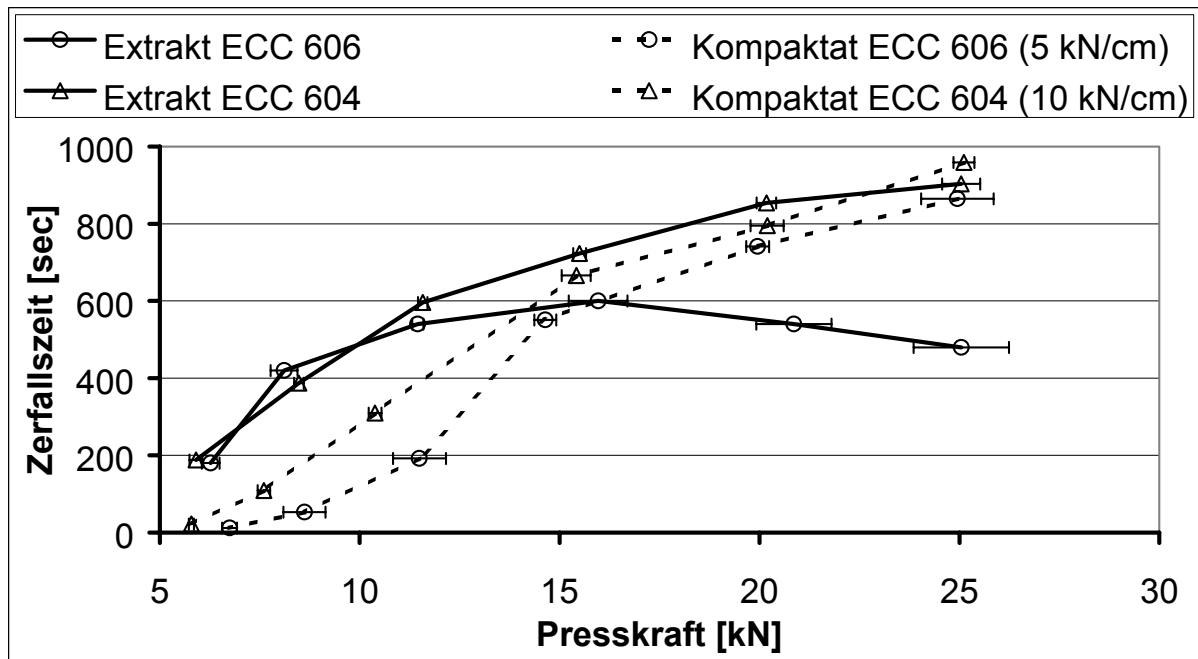


Abb. 7-8 Vergleich der Presskraft-Zerfallszeit-Profile von kompaktathaltigen Mischungen mit denen der Ausgangsextrakte von zwei verschiedenen Chargen von *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakt

Die Zerfallszeit von Tabletten auf Basis pflanzlicher Trockenextrakte stellt generell einen problematischen Parameter dar, da sich durch Quellungsvorgänge im Inneren des Tablettenkerns nach Kontakt mit Wasser eine klebrige Masse bildet, die nur extrem langsam zerfällt (Keymer 1969). Durch das Kompaktieren der Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. lässt sich eine deutliche Reduktion der Zerfallszeiten, v.a. im unteren Presskraftbereich, erkennen. So werden die Zerfallszeiten der Kompaktattabletten im Vergleich zu denen der Extrakttabletten bei einer Presskraft von 10 kN mehr als halbiert. Dieser Effekt wird von Rocksloh et al. (1999) bei der Untersuchung der Einwirkung des Kompaktierens auf die Zerfallszeiten von Johanniskraut-Drageekernen ebenfalls beschrieben. Die Kurve des Originalextraktes ECC 606 zeigt ab einer Presskraft von 10 kN eine deutliche Abflachung, die sich mit der mechanischen Instabilität der Tabletten durch eine erhöhte Deckelneigung begründen lässt und keine echte Verbesserung der Zerfallszeit darstellt.

7.3.2 Coating

Für das anschließende Filmcoating mit einem Überzug aus Hydroxypropylcellulose aus ethanolischer Lösung werden Tabletten verwendet, die bei einer Presskraft von etwa 15 kN produziert werden. Diese zeigen ausreichende Bruchfestigkeiten bei Zerfallszeiten kleiner als 15 min.

7.4 Stabilitätsuntersuchungen der Filmtabletten

Um den Einfluss des Kompaktierens auf die hygroskopischen Eigenschaften der Extrakte und der daraus gefertigten Tabletten zu untersuchen, werden die Filmtabletten bei zwei verschiedenen Bedingungen gelagert. Die Lagerung geschieht in Exsikkatoren, in denen mit gesättigten Salzlösungen eine konstante Umgebungsfeuchte eingestellt wird. Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur befinden sich diese Exsikkatoren in Umlufttrockenschränken. Tab. 7-2 zeigt eine Übersicht über Temperatur und relative Feuchte der beiden Lagerbedingungen.

Tab. 7-2 Lagerungsbedingungen der extrakt- bzw. kompaktathaltigen Filmtabletten (nach Grimm 1985)

Klimatische Bedingung	Temperatur	Relative Feuchte (Hygrostatenlösung)	Bezeichnung
Gemäßigt	21 °C	45% r.F. (Kaliumcarbonat)	„Trocken“
Subtropisch	25 °C	60% r.F. (Ammoniumnitrat)	„Feucht“

Von jeder Charge werden jeweils sechs Filmtabletten bei beiden Bedingungen eingelagert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wird die Änderung von Höhe und Gewicht bestimmt.

Vergleicht man die Extrakttabletten der einzelnen Extraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. miteinander, so zeigt sich bei der Darstellung der Gewichtszunahme durch Wassersorption über der Lagerungszeit ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Extraktchargen (Abb. 7-9).

Während Filmtabletten der Extraktcharge ECC 606 unter feuchten Bedingungen von 25 °C und 60% r.F. durch Wasseraufnahme ihr Gewicht um etwa 9% steigern, nehmen die Tabletten der anderen Extrakte nach 6 Tagen Lagerung nur etwa 6% Wasser auf. Diese Unterschiede werden bei der Wassersorptionsanalyse der Trockenextrakte mit Hilfe des DVS-Verfahrens in der Art und Weise nicht erhalten (Kapitel 6.3.2). Bei der dort angelegten stufenförmigen Steigerung der relativen Feuchte nehmen alle Chargen von *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakt bei einer relativen Feuchte von 60% etwa 16% Wasser auf. Die in Abb. 7-9 ersichtlichen Unterschiede ergeben sich demnach erst nach Tablettierung und Filmcoating der einzelnen Extraktchargen. Unter trockenen Bedingungen von 21 °C und 45% r.F. verhalten sich die vier untersuchten Tablettenchargen ähnlich und die Tabletten nehmen etwa 2 bis 3% Wasser auf.

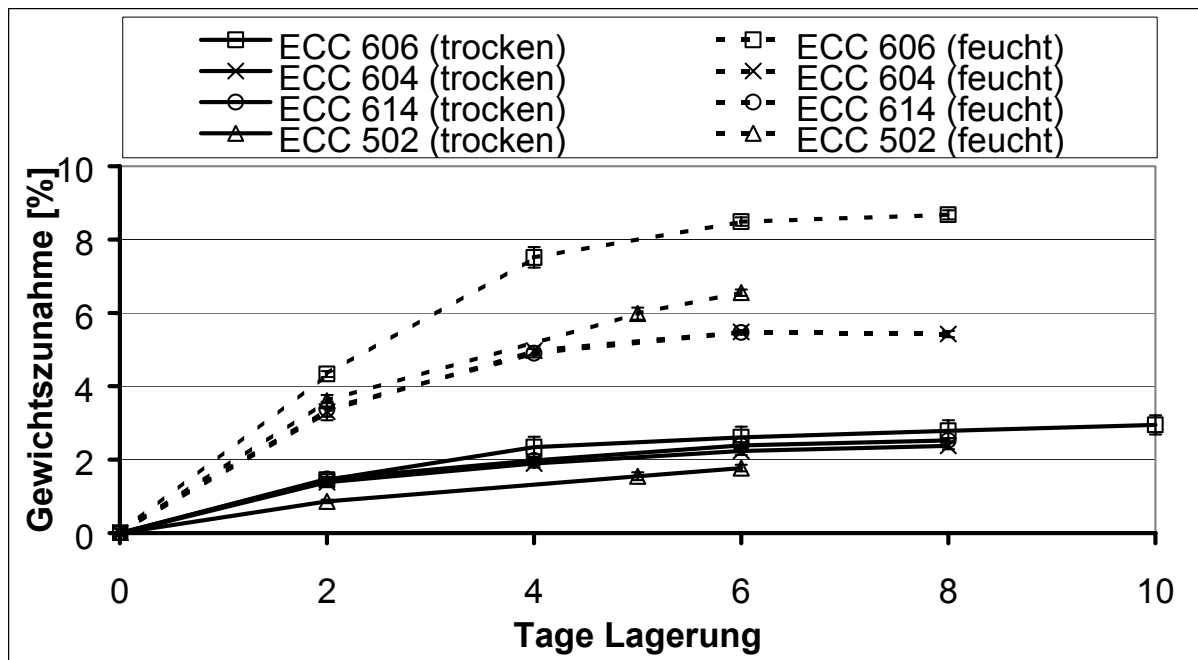


Abb. 7-9 Vergleich der Gewichtszunahme von Extrakttabletten verschiedener Chargen eines *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextraktes bei Lagerung unter verschiedenen Bedingungen

In Abb. 7-10 sind die dazugehörigen Höhenänderungen der Filmtabletten dargestellt. Hierbei wird erkennbar, dass die unterschiedliche Hygroskopizität der Filmtabletten keinen Einfluss auf die durch Feuchteaufnahme bedingte Höhenänderung der extrakt-haltigen Filmtabletten besitzt. Die Tabletten der verschiedenen Extraktchargen zeigen

eine ungefähr gleiche Zunahme der Tablettenhöhe, sowohl bei Lagerung unter feuchten als auch unter trockenen Bedingungen.

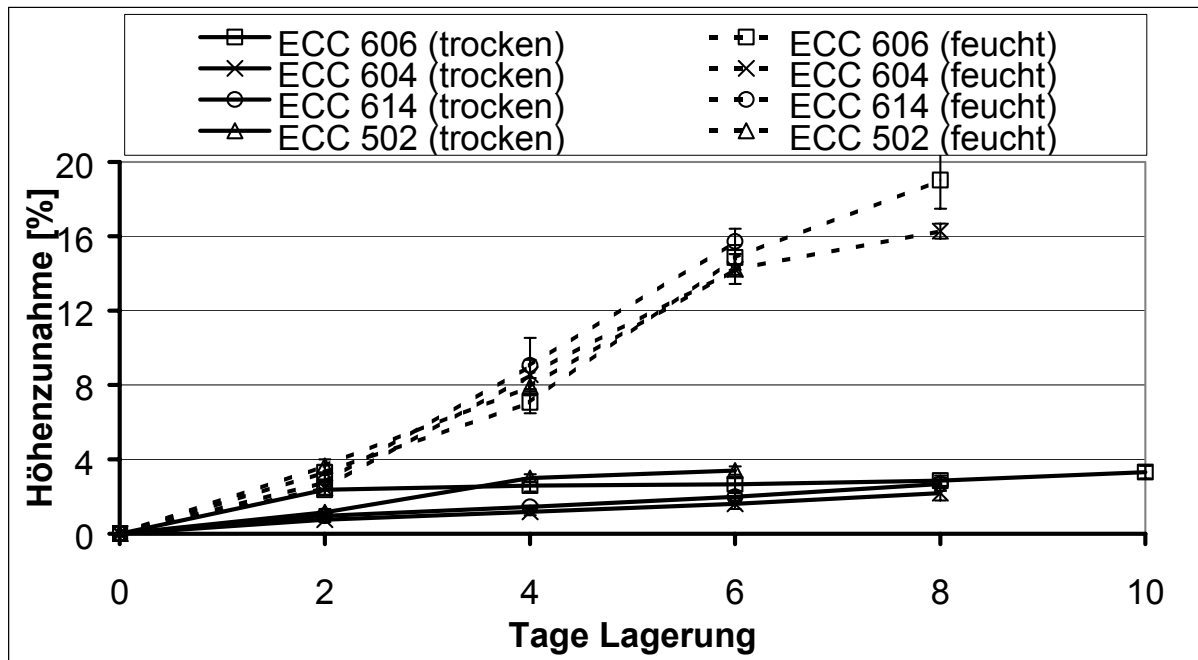


Abb. 7-10 Vergleich der Höhenzunahme von Trockenextrakttabletten verschiedener Chargen eines *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextraktes bei Lagerung unter verschiedenen Bedingungen

Vergleicht man die überzogenen Kompaktattabletten mit den Filmtabletten der Extrakte, so erhält man folgende Ergebnisse für die Gewichts- bzw. Höhenzunahme der Filmtabletten. In Abb. 7-11 ist die prozentuale Änderung des Gewichts von überzogenen Kompaktattabletten der Gewichtsänderung von Filmtabletten dreier Ausgangsextrakte gegenübergestellt. Die Unterschiede, die bei den Originalextrakten auftreten, werden durch den Prozess der Kompaktierung praktisch nivelliert. Die Kompaktattabletten sorbieren im Vergleich zu den Tabletten aus den Originalextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. das Wasser nicht nur langsamer, sondern nehmen insgesamt auch weniger an Gewicht durch Feuchteaufnahme zu. Dieser Effekt lässt sich durch den Partikelbau nach Kompaktierung erklären. Durch eine Verringerung der freien Oberfläche werden geringere Mengen Wasser langsamer aufgenommen.

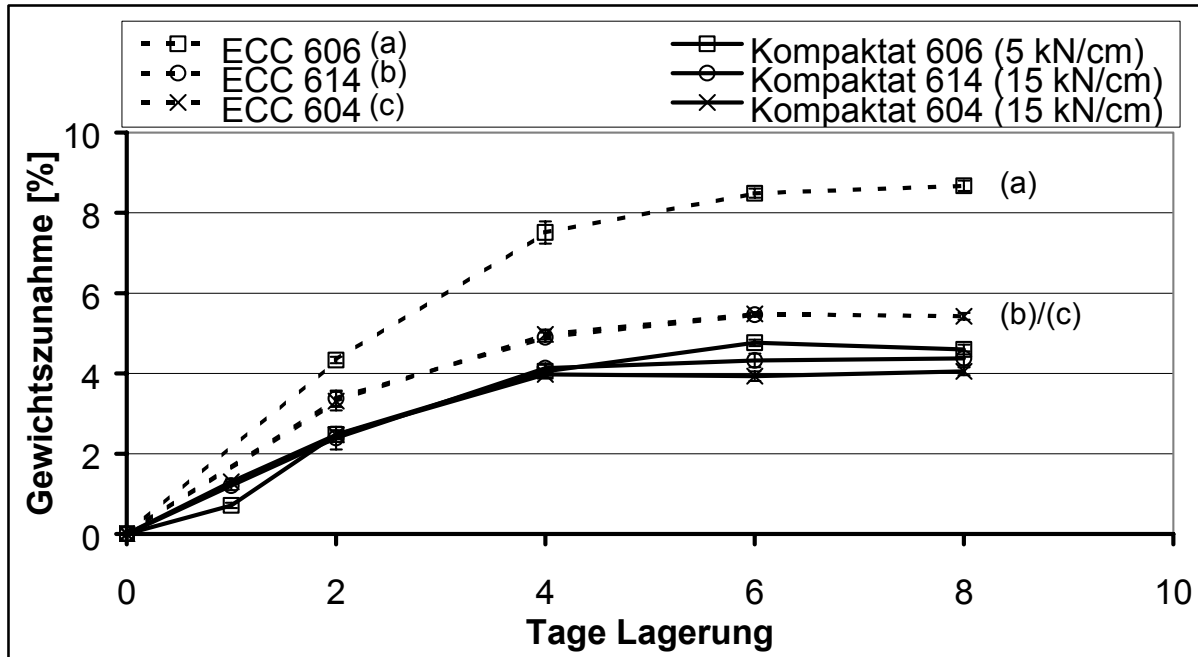


Abb. 7-11 Vergleich der Gewichtszunahme von überzogenen Kompaktattabletten mit der von Extrakttabletten bei 25 °C und 60% r.F. („feuchte“ Bedingungen)

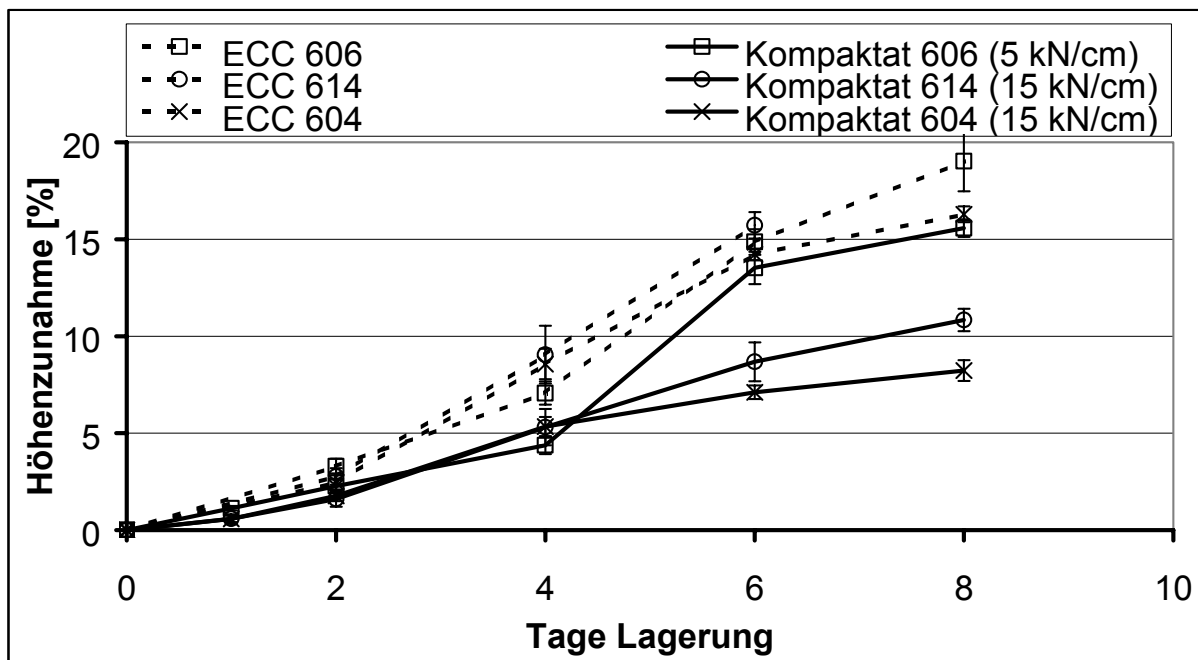


Abb. 7-12 Vergleich der Höhenzunahme von überzogenen Kompaktattabletten mit der von Extrakttabletten bei 25 °C und 60% r.F. („feuchte“ Bedingungen)

In Abb. 7-12 sind die Höhenzunahmen der überzogenen Extrakt- und Kompakttabletten von drei verschiedenen Chargen des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. bei feuchter Lagerung (25 °C/60% r.F.) gegenübergestellt. Bei den Chargen ECC 604 und ECC 614 ist eine deutliche Verbesserung der Platzneigung der Filmtabletten durch eine Kompaktierung zu erkennen. Die überzogenen Kompakttabletten von Charge ECC 606 zeigen nach einer anfänglichen Verbesserung nach etwa sechs Tagen Lagerung bei feuchten Bedingungen eine annähernd vergleichbare Platzneigung im Vergleich zu den Tabletten der drei Originalextraktchargen.

Digitalaufnahmen der unterschiedlichen Chargen von Filmtabletten, nach verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen, machen dieses Verhalten deutlich (Abb. 7-13 auf Seite 63 unten).

Durch die Aufnahmen ist der Einfluss der Kompaktierung auf die Stabilität der Filmtabletten bei Lagerung unter feuchten Bedingungen deutlich zu erkennen. So berichten auch Gaedcke und Steinhoff (2000) über eine Verminderung der Hygroskopizität pflanzlicher Trockenextrakte durch Kompaktierung. Kompaktate enthaltende Filmtabletten nehmen verhältnismäßig weniger Feuchtigkeit auf und zeigen auch eine deutlich geringere Platzneigung im Vergleich zu Filmtabletten auf Basis von Originalextrakten.

7.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es zeigt sich, dass die Kompaktierung eine praktikable Granulationsmethode für pflanzliche Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. darstellt und Produkte mit verbesserten Eigenschaften liefert. Es zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede im Kompaktierverhalten zwischen einzelnen Chargen des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham.. Während bei zwei Chargen (ECC 604 und ECC 614) der Kompaktierprozess über den gesamten Kraftbereich gut durchführbar ist, kommt es bei der Kompaktierung von Charge ECC 606 zu großen Spaltschwankungen auf Grund der plastischen Verformung des Extraktes ab einer Kompaktierkraft von etwa 10 kN/cm und somit zum sofortigen Abbruch des Prozesses. Dieses Verhalten lässt sich mit dem hohen Gehalt an Glycerinsäure erklären, der im Extrakt ECC 606 mit 12% mehr als das Doppelte des Gehaltes im Vergleich zu anderen Chargen ausmacht.

Insgesamt lässt sich durch die Ergebnisse der Tablettierung zeigen, dass der Prozess des Kompaktierens pflanzlicher Trockenextrakte die unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Chargen zwar nicht komplett aufheben kann, aber zumindest weitgehend auszugleichen vermag.

Die Zerfallszeit ist bei den kompaktathaltigen Tabletten im Vergleich zu den extrakt-haltigen Tabletten deutlich erniedrigt.

Mit Hilfe der Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen kann eine weitere positive Auswirkung des Kompaktierens auf das Verhalten von Trockenextrakten aus *Eschscholtzia californica* Cham. gezeigt werden. Die Folgen der Hygroskopizität, hier vor allem das Platzen der hergestellten Filmtabletten der Trockenextraktchargen, können zwar nicht gänzlich verhindert werden, werden durch den Prozess der Kompaktierung jedoch deutlich vermindert. Dies ist auf eine Reduktion der freien Extraktoberfläche und damit auf eine verminderte Wasserdampfsorption zurückzuführen.

KAPITEL 8

ENTFERNUNG VON IONEN ZUR VERBESSERUNG

DER EXTRAKTEIGENSCHAFTEN

Im Folgenden sollen die Auswirkungen der in Kapitel 5.2.3 beschriebenen hohen Gehalte an Glycerinsäure in Pflanzenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. auf das hygroskopische Verhalten dieser Extrakte und der daraus hergestellten Extraktfilmtabletten untersucht werden. Durch den Austausch der Anionen bzw. Kationen aus Extrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. soll festgestellt werden, welchen Einfluss Ionen auf die Hygroskopizität der pflanzlichen Trockenextrakte besitzen. Harnischfeger und Stumpf (1991) beschreiben die Entfernung hygroskopischer Bestandteile aus *Crataegus*-Extrakten. Dabei stellen sie einen deutlichen Einfluss auf bestimmte Extrakteigenschaften, wie beispielsweise die Wasseraufnahme, fest. So nimmt etwa der Ausgangsextrakt bereits bei einer relativen Feuchte von 20% Wasser aus der Umgebung auf, während der von seinen hygroskopischen Inhaltsstoffen befreite Weißdornextrakt erst ab einer relativen Feuchte von 40% deutlich Feuchtigkeit aufnimmt.

8.1 Ionenaustausch und Sprühtrocknung der Extrakte

Charge ECC 606 des Extraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. wird sowohl mit Anionen- als auch mit Kationenaustauscherharzen in einer Glassäule von Ionen befreit. Die Eluate werden mit einem Laborsprühtrockner getrocknet und die Produkte für die weiteren Verfahrensschritte verwendet. Bei der Sprühtrocknung der von Ionen befreiten Extrakte zeigen sich erste deutliche Unterschiede. Während der von Anionen befreite Extrakt, ähnlich wie der Ausgangsextrakt, nach der Sprühtrocknung als relativ trockenes Produkt anfällt, lässt sich das Eluat aus dem Kationenaustauscherharz nur relativ schlecht trocknen. Es stellt eine schnell zerfließende und zähe Masse dar. Aus diesem Grund ist die sofortige Lagerung dieses sprühgetrockneten Produktes unter trockenen Bedingungen notwendig.

8.2 DVS-Untersuchungen der modifizierten Extrakte

Die DVS-Untersuchungen der modifizierten, von Ionen befreiten, Extrakte erhärten die bei der Sprühtrocknung erwähnten Beobachtungen. Die DVS-Bestimmungen werden analog den Untersuchungen der Ausgangsextrakte durchgeführt (Kapitel 6.3.1). Zur Vergleichbarkeit der Eigenschaften der einzelnen Produkte wird der Ausgangsextrakt in Wasser suspendiert und anschließend sprühtrocknet. Eventuell auftretende physikalische Änderungen, wie z.B. die Partikelgröße oder -oberfläche, werden hierdurch ausgeglichen.

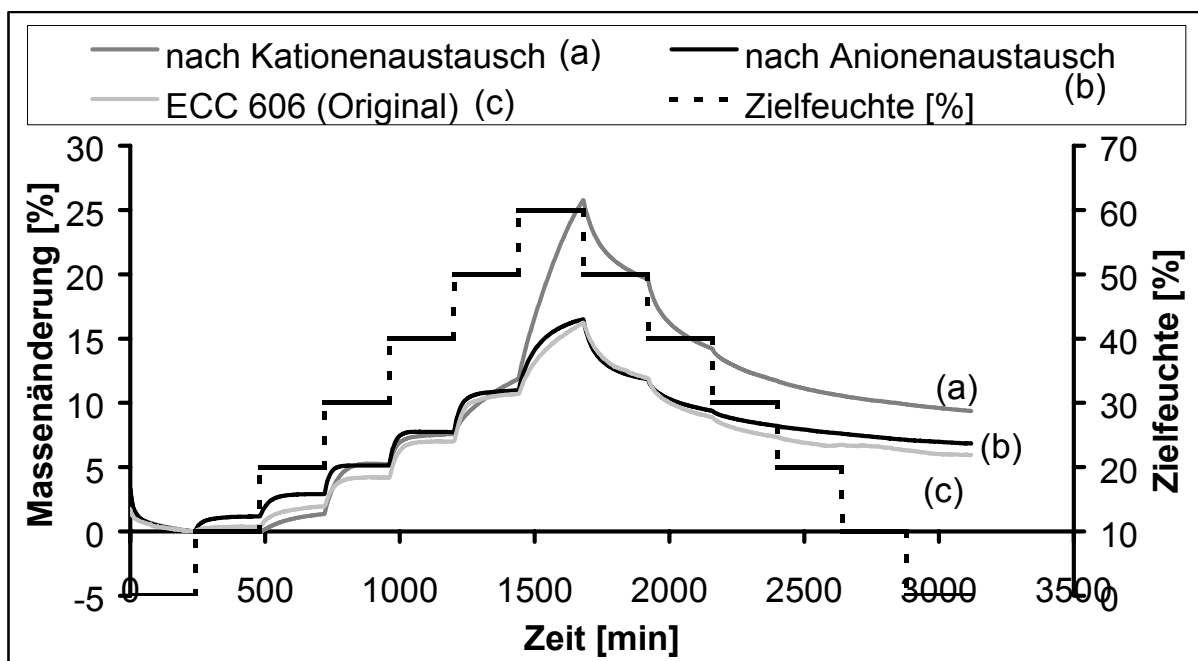


Abb. 8.1 Wasserdampfsorptions- und -desorptionskurven der modifizierten, von Ionen befreiten Trockenextrakte von Charge ECC 606 im Vergleich zum Originalextrakt, bestimmt mit der DVS-Methode

In Abb. 8-1 lässt sich ein deutlicher Einfluss der Entfernung der unterschiedlich geladenen Substanzen auf die hygroskopischen Extrakteigenschaften von Charge ECC 606 des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. erkennen. Der von Kationen befreite Extrakt (a) zeigt eine deutlich stärkere Wasserdampfaufnahme bis 60% r.F. im Vergleich zum sprühtrockneten Originalextrakt (c). Mit einer Massenzunahme von etwa 25% sorbiert er fast das Doppelte an Wasserdampf im Vergleich zum Ausgangsextrakt und hält nach Trocknung bei 0% r.F. auch signifikant mehr Feuchtigkeit im Produkt zurück. Die von Anionen befreite Extraktzubereitung (b)

zeigt bei den DVS-Untersuchungen im Gegensatz dazu eine mit dem Originalextrakt vergleichbare Wasseraufnahme. Sowohl bei der schrittweisen Wasserdampfsorption als auch bei der schrittweisen Trocknung zeigen die Kurven vor und nach Entfernung der Anionen einen vergleichbaren Verlauf.

Die im DVS-Gerät eingebaute Digitalbildfunktion, die nach bestimmten Zeiten und relativen Zielfeuchten eine Aufnahme der Probe erlaubt, zeigt ebenfalls signifikante Unterschiede im Aussehen der von Ionen befreiten Extraktzubereitungen im Verlauf der DVS-Untersuchungen (Abb. 8-2 auf Seite 64 oben).

Während der von Anionen befreite *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakt der Charge ECC 606 nach den Feuchteschritten von 30% und 40% r.F. seine pulverförmige Struktur beibehält, zeigt der Extrakt, der nach Kationenaustausch gewonnen wird, bereits nach der Stufe von 30% r.F. einen deutlichen Zusammenbruch der Struktur. Bei höheren relativen Feuchten (ab 40% r.F.) beginnt das Produkt auf Grund seiner sehr starken Hygroskopizität zu zerfließen.

Von Czetsch-Lindenwald (1968) beschreibt das Zerfließen verschiedener pflanzlicher Trockenextrakte bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten als eines der Hauptprobleme hygroskopischer Substanzen und führt sogenannte kritische relative Feuchten auf, deren Überschreitung deutliche Schäden am Material oder dessen Zerfließen bedeuten. Insgesamt wird durch die Ergebnisse der DVS-Untersuchungen eine nach Entfernung der Kationen deutlich erhöhte Hygroskopizität des Trockenextraktes ECC 606 von *Eschscholtzia californica* Cham. festgestellt.

8.3 Tablettierung und Coating

Die Auswirkungen der Entfernung von Kationen bzw. Anionen auf die Eigenschaften von Filmentabletten aus Extrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. werden in Tablettierversuchen und anschließenden Stabilitätsuntersuchungen ermittelt.

Auf Grund der sehr geringen Produktmengen werden die sprühgetrockneten Zubereitungen der von Ionen befreiten Extrakte auf einer Exzentertablettenpresse zu Oblong-Tabletten mit einer den mit der Rundlauf-tablettenpresse hergestellten Tabletten (Kapitel 7.3.1) vergleichbaren Geometrie verpresst. Zur Elimination der Presskraft als mög-

lichem Einflussparameter bei den nachfolgenden Stabilitätsuntersuchungen werden die modifizierten Extrakte ebenfalls bei einer Kraft von 15 kN verpresst.

Die Extrakttabletten werden anschließend im Dragierkessel mit einem Hydroxypropylcellulose-Film bei den in Kapitel 7.3.2 beschriebenen Parametern überzogen. Zur Auffüllung der Produktmenge auf ein Gewicht von 1,5 kg werden Placebo-Kerne mit einer ähnlichen Geometrie verwendet, die zur späteren Unterscheidung von den Extrakttabletten eine Bruchrille besitzen.

8.4 Stabilitätsuntersuchungen der Filmtabletten

Die erhaltenen Filmtabletten werden zwei Stunden bei 30 °C getrocknet und anschließend bei zwei verschiedenen klimatischen Bedingungen eingelagert und die Änderung von Gewicht und Höhe untersucht (siehe Kapitel 7.4). Dabei werden je nach Verfügbarkeit drei bis sechs Filmtabletten bei jeder der beiden Bedingungen gelagert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht.

Vergleicht man die Filmtabletten der von Ionen befreiten Extrakte mit denen des Originalextraktes ECC 606, so werden bei der Darstellung der Gewichtszunahme über der Lagerzeit die oben erwähnten Tendenzen hinsichtlich der unterschiedlichen Hygroskopizität der Produkte bestätigt (Abb. 8-3). Im Gegensatz zu den DVS-Ergebnissen nehmen jedoch Filmtabletten aus von Anionen befreiten Extrakt unter beiden klimatischen Bedingungen deutlich weniger Wasser im Vergleich zu Filmtabletten des Originalextraktes auf.

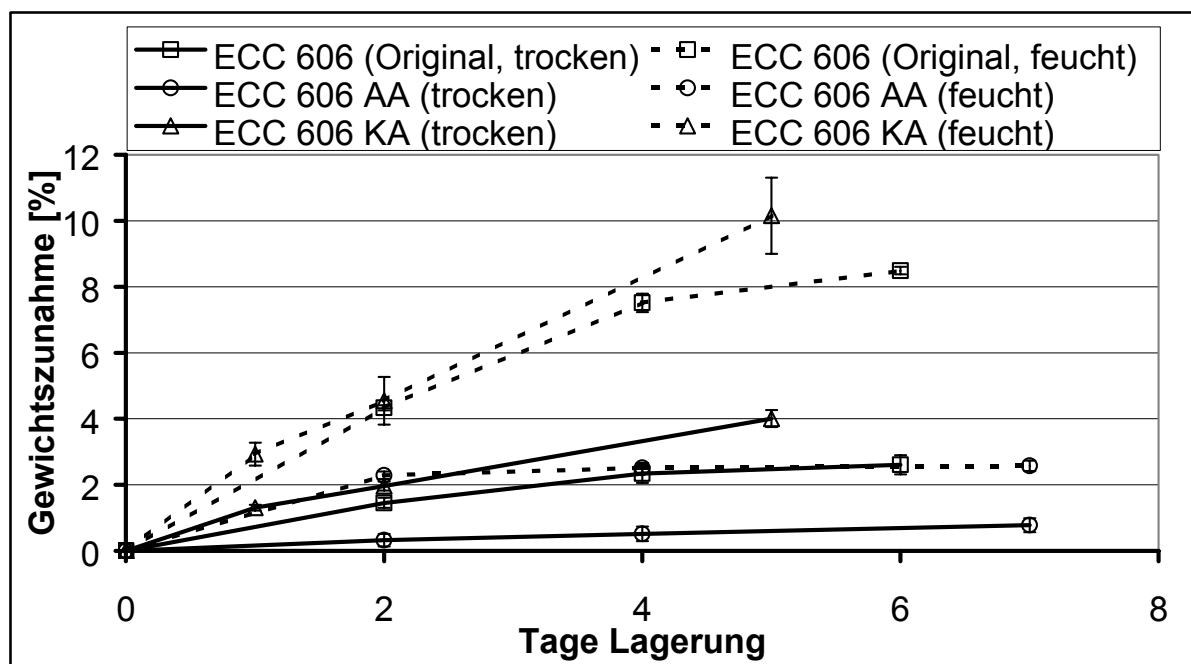


Abb. 8-3 Vergleich der Gewichtszunahme von Filmtabletten, hergestellt aus einem von Anionen (AA) bzw. Kationen (KA) befreiten Trockenextrakt ECC 606 mit denen des Ausgangsextraktes

Während die DVS-Untersuchungen keine Unterschiede beim Verlauf der Gewichtszunahme zwischen Original- und von Anionen befreitem Extrakt bis zu einer relativen Feuchte von 60% aufweisen, lassen sich bei Filmtabletten, die aus diesen beiden Produkten hergestellt werden, deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Wasserversorption bei 60% r.F. erkennen. Die Gründe sind in den zugesetzten Hilfsstoffen oder den angewendeten Verfahren zu suchen. Von Kationen befreite Extrakttabletten zeigen eine erhöhte Massenzunahme, wie sich ja bereits bei den DVS-Ergebnissen gezeigt hat.

Der Vergleich der Höhenzunahme (Abb. 8-4) der verschiedenen Filmtabletten bestätigt die Tendenz der Gewichtszunahme. Während Filmtabletten mit von Kationen befreitem Extrakt im Vergleich zu denen des Ausgangsextraktes, vor allem unter feuchten Bedingungen, eine erheblich größere Höhenzunahme zeigen, wird durch die Entfernung der Anionen die Platzneigung der Filmtabletten signifikant erniedrigt. Extraktfilmtabletten, die ein von Anionen befreites Extraktprodukt enthalten, nehmen nach einer Lagerdauer von 7 Tagen unter feuchten Bedingungen (25 °C/60% r.F.) nur etwa 6% an Höhe zu. Die Höhenzunahme bei 21 °C und 45% r.F. beträgt sogar nur etwa 1,5%.

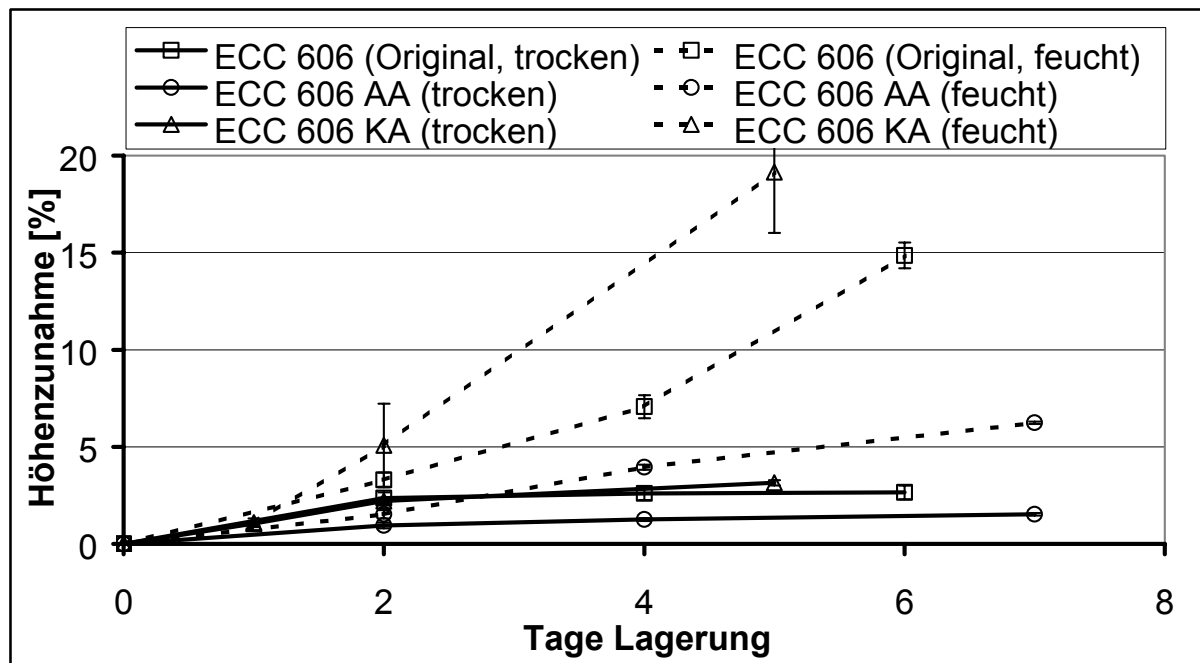


Abb. 8-4 Vergleich der Höhenzunahme von Filmtabletten, hergestellt aus einem von Anionen (AA) bzw. Kationen (KA) befreiten Trockenextrakt ECC 606 mit denen des Ausgangsextraktes

Die Ergebnisse lassen eine deutlich erhöhte Stabilität der von Anionen befreiten Extrakttabletten im Vergleich zu den überzogenen Tabletten des Ausgangsextraktes erkennen, was sich auch in den unten aufgeführten Digitalaufnahmen der Filmtabletten zeigt (Abb. 8-5 auf Seite 64 unten). Mit Hilfe dieser Aufnahmen kann die signifikant verbesserte Stabilität von Filmtabletten, die von Anionen befreiten Extrakt enthalten, deutlich gemacht werden. Während die Filmtabletten des von Anionen befreiten Extraktes erst nach 4 Tagen kleinere Risse aufweisen, die sich nicht vergrößern, platzen Filmtabletten aus von Kationen befreitem Extrakt bereits nach einer Lagerdauer von 2 Tagen. Diese gravierenden Stabilitätsprobleme nehmen bereits nach 5 Tagen Ausmaße an, die eine völlige Zerstörung der Filmtabletten bis zur Unkenntlichkeit zur Folge haben.

Untersuchungen anderer Extrakte zeigen keinerlei Platzneigung der daraus hergestellten Filmtabletten. So lassen sich zum Beispiel bei überzogenen Tabletten eines Extraktes von *Vitis vinifera* nach 5 Tagen Lagerung bei 25 °C und 60% r.F. keine Risse oder andere qualitätsbeeinträchtigende Merkmale finden (Abb. 8-5, unten rechts (Seite 64 unten)).

Um den Einfluss der Anionen und hierbei vor allem der Glycerinsäure auf die Hygroskopizität der Extrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. und deren Folgen weitergehend zu untersuchen, wird dem von Anionen befreiten Extrakt der Charge ECC 606 die mittels GC-MS quantifizierte Menge an Glycerinsäure (etwa 12%) hinzugefügt und die erhaltene Mischung sprühgetrocknet. Das getrocknete Produkt wird zu Tabletten verpresst, welche anschließend mit einem Film aus Hydroxypropylcellulose überzogen werden. Die Ergebnisse der Gewichts- bzw. Höhenzunahme im Zuge der Stabilitätsuntersuchungen von Filmtabletten dieses von Anionen befreiten und anschließend mit Glycerinsäure gespikten Extraktes werden in Abb. 8-6 und Abb. 8-7 dargestellt.

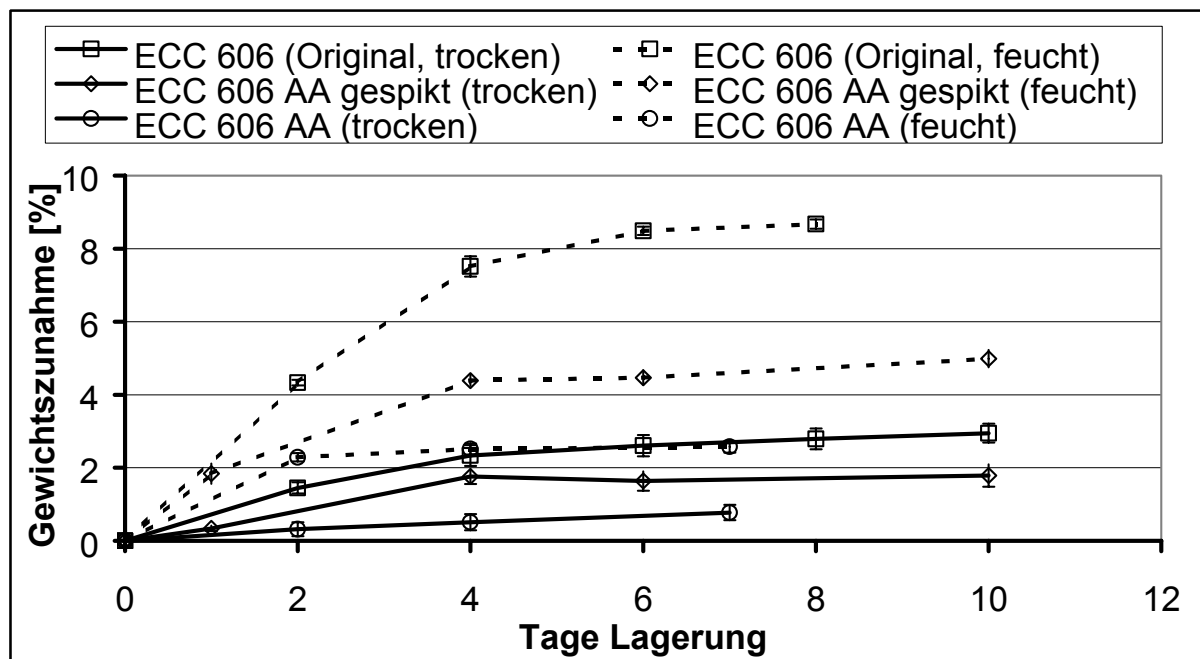


Abb. 8-6 Gewichtszunahme von Filmtabletten aus mit Glycerinsäure gespiktem Extrakt ECC 606 (AA gespikt) im Vergleich zum Originalextrakt ECC 606 und zum anionenausgetauschten Extrakt ECC 606 (AA)

Filmtabletten des von Anionen befreiten Extraktes, dem anschließend Glycerinsäure zugesetzt wird, zeigen eine signifikant höhere Wasserversorption unter beiden Lagerbedingungen im Vergleich zu den anionenausgetauschten Extrakttabletten (Abb. 8-6). Das Ausmaß der Gewichtszunahme liegt jedoch niedriger als das der Originalextrakttabletten.

Der Vergleich der Höhenzunahme von Filmtabletten der mit Glycerinsäure gespikten Extraktzubereitung mit denen des Ausgangsextraktes und denen des von Anionen befreiten Extraktes zeigt ein vergleichbares Ergebnis (Abb. 8-7). Filmtabletten des mit Glycerinsäure gespikten Extraktes zeigen eine dem Originalextrakt vergleichbare Höhenzunahme. Die Platzneigung dieser Tabletten ist jedoch weitaus stärker ausgeprägt als die der überzogenen Tabletten des von Anionen befreiten Extraktes, so dass von einem Einfluss der Glycerinsäure auf die verminderte Stabilität der Filmtabletten aus *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextrakten ausgegangen werden kann.

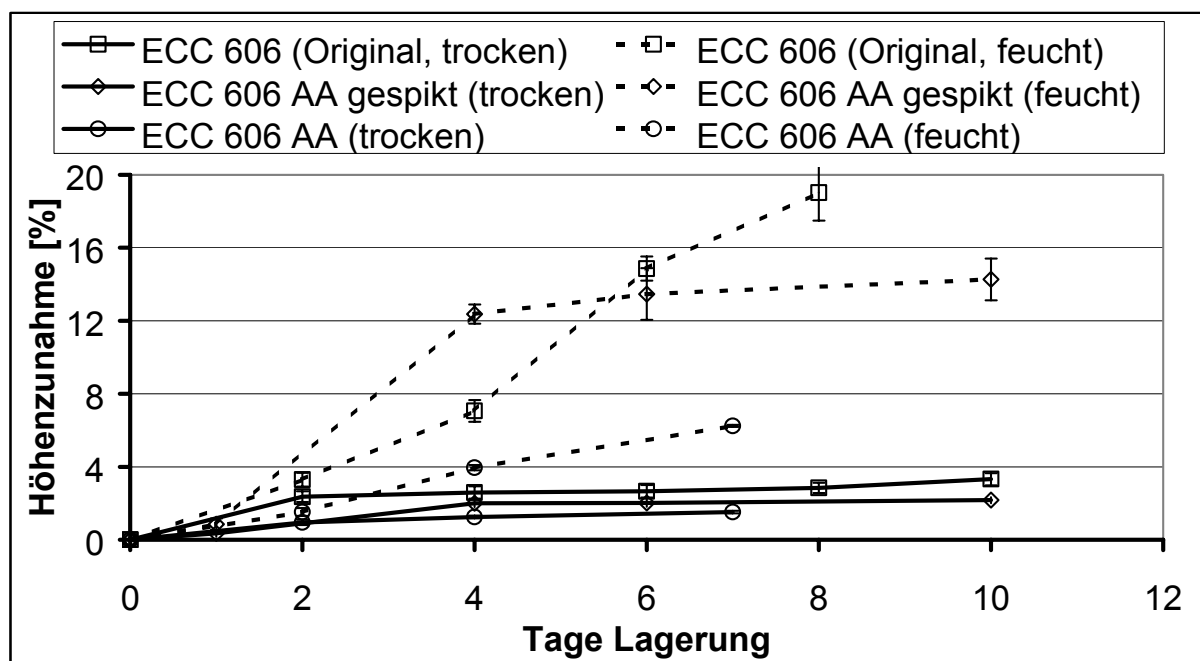


Abb. 8-7 Höhenzunahme von Filmtabletten aus mit Glycerinsäure gespiktem Extrakt ECC 606 (AA gespikt) im Vergleich zum Originalextrakt ECC 606 und zum anionenausgetauschten Extrakt ECC 606 (AA)

8.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Ionenaustauschversuche und der anschließenden Lagerung von Filmtabletten der modifizierten Extraktzubereitungen lassen den deutlichen Einfluss erkennen, den organische Säuren, und hier vor allem die Glycerinsäure, auf die Hygroskopizität der Extrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. und deren galenische Auswirkungen besitzen. Während von Anionen befreite Extrakttabletten bei der Untersuchung der Gewichts- bzw. Höhenänderung deutlich bessere Resultate im Ver-

gleich zu den Ausgangsextrakttabletten zeigen, ist die Hygroskopizität und damit die Platzneigung der Filmtabletten aus von Kationen befreiten Extrakten signifikant erhöht. Die DVS-Untersuchung dieses Produktes zeigt eine ebenfalls deutlich erhöhte Wasserdampfsorption des sprühgetrockneten Eluats aus dem Kationenaustauscher.

Eine mögliche Begründung für diese Vorgänge könnte die durch Entfernung von Kationen vermehrte Bildung freier Säuren aus den vorliegenden Salzen darstellen, die zu Substanzen mit einer erhöhten Hygroskopizität führt (Schmidt und Brögmann 1987).

Setzt man der von Anionen befreiten Extraktzubereitung die entfernte Menge Glycerinsäure wieder zu, verschlechtern sich deren Eigenschaften, wie z.B. die Platzneigung der daraus gefertigten Filmtabletten. Dies lässt auf eine ursächliche Beteiligung der Glycerinsäure an den negativen Eigenschaften der Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. schließen.

Durch den Zusatz von Glycerinsäure zu den zuvor von Anionen befreiten Extraktzubereitungen werden allerdings die Gewichts- und Höhenzunahmen der Ausgangsextrakttabletten nicht ganz erreicht, so dass Glycerinsäure die schlechten Eigenschaften der Trockenextrakte mit Sicherheit nicht allein hervorruft, sondern weitere Substanzen eine Rolle im hygroskopischen Verhalten der Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. spielen.

KAPITEL 9

EXPERIMENTELLER TEIL

9.1 Materialien

Tab. 9-1 Extrakte

Extrakte (Ch.-B.)	Hersteller / Lieferant	Kurzbezeichnung
<i>Eschscholtzia californica</i> Cham.		
502490	Fa. Müggenburg	ECC 502
604770	Fa. Müggenburg	ECC 604
606770	Fa. Müggenburg	ECC 606
614020/1	Fa. Müggenburg	ECC 614
306740	Fa. Müggenburg	ECC 306
<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Rupr. et Maxim.) Maxim.		
161308, 161178, 8821583, 98221270	Fa. Birkenweg	Eleu
<i>Melissa officinalis</i> L.		
4640060, 5640167	Fa. Finzelberg	Mel
<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.		
1254/397, 1254/426, 1254/512	Fa. Pharmaton	Gin
<i>Piper methysticum</i> G. Forst. (Kava-Kava)		
1641336, 2640416, 3640170, 4641073, 5641619, 6630275	Fa. Finzelberg	Kav
<i>Valeriana officinalis</i> L.		
4641051, 4641029, 5640138, 5640389, 6644864	Fa. Finzelberg	Bal
<i>Vitis vinifera</i> L. (Weinlaub)		
102/99, 103/99, 97220011, 97220311, 97221287, 98220027, 98221121, 99220306, 99220419, 99220599, 99220827, 00120167, 00120168	Fa. Finzelberg	WL
<i>Xysmalobium undulatum</i> L.		
4498/B1, 38830/1, 38830/2	Fa. Indena	Xys

Tab. 9-2 Standardsubstanzen

<i>Substanz</i>	<i>Chargenbezeichnung</i>	<i>Hersteller / Lieferant</i>
Apfelpektin	383032/1	Fa. Fluka
D,L-Äpfelsäure	K25914582	Fa. Merck
Benzoesäure	K90805436	Fa. Merck
Bernsteinsäure	S26122	Fa. Merck
Citronensäure-Monohydrat	K9164944	Fa. Merck
D (-)-Fructose	K20889221	Fa. Merck
Galacturonsäure-Monohydrat	Art.-Nr. 48280	Fa. Fluka
D (+)-Glucose (wasserfrei)	K25835437	Fa. Merck
Glycerinsäure 40% (w/w)	FIH01	Fa. Tokyo Kasei Kogyo
Glycolsäure	S27653	Fa. Merck
Kaliumchlorid	TA638435	Fa. Merck
Milchsäure 80% (w/w)	77H1690	Fa. Sigma
L (-)-Rhamnose-Monohydrat	Art.-Nr. 1.0736	Fa. Merck
Saccharose	Art.-Nr. 001010	Fa. Südzucker
L (+)-Weinsäure	K25384002	Fa. Merck
D (+)-Xylose	L328889	Fa. Merck

Tab. 9-3 Lösungsmittel und Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Chargenbezeichnung</i>	<i>Hersteller / Lieferant</i>
Aceton	Art.-Nr. 1.00020	Fa. Merck
Acetonitril	I990930	Fa. Merck
Ammoniumeisen-(III)-sulfat Dodecahydrat	Art.-Nr. 1.03776	Fa. Merck
Ammoniumnitrat	9947203	Fa. Fisher Scientific
N,O-bis(trimethylsilyl)- trifluoroacetamid (BSTFA)	93031/1	Fa. Fluka
n-Butanol	Art.-Nr. 1.01988	Fa. Merck
Carbazol	Art.-Nr. 8.20255	Fa. Merck
Dichlormethan	K28119944	Fa. Merck
Eisessig	Art.-Nr. 100062	Fa. Merck
Ethanol 96%	100971	Fa. Merck
Ethylacetat	K27290323	Fa. Merck
Helium 4.6	9808PL	Fa. Messer Griesheim

n-Hexan	I996091	Fa. Merck
Kaliumcarbonat	60220	Fa. Riedel-de Haën
Methanol	K29095807	Fa. Merck
Natriumhydroxid 50% (w/w)	Art.-Nr. 7067	Fa. J.T. Baker
Natriumhydroxid-Rotuli	235C216698	Fa. Merck
Natriumsulfat wasserfrei	60220	Fa. Riedel-de Haën
Salzsäure 36%	K16876117	Fa. Merck
Schwefelsäure, konz.	K27582431	Fa. Merck
Stickstoff	Hausleitung	Fa. Boehringer Ingelheim
Trifluoressigsäure	93620	Fa. Riedel-de Haën
Vanillin	K25739410	Fa. Merck
Wasser	Milli-Q	Fa. Millipore

Tab. 9-4 Hilfsstoffe zur Tablettierung

<i>Substanz</i>	<i>Chargenbezeichnung</i>	<i>Hersteller / Lieferant</i>
Aerosil R972	2251	Fa. Degussa-Hüls
Avicel PH 101	6629	Fa. FMC / Lehmann & Voss
Kollidon CL	36-0185	Fa. BASF
Magnesiumstearat	190151	Fa. Bärlocher

Tab. 9-5 Hilfsstoffe für das Filmcoating

<i>Substanz</i>	<i>Chargenbezeichnung</i>	<i>Hersteller / Lieferant</i>
Ethanol 96%	100971	Fa. Merck
Farbstofflacke (versch.)	Verschiedene	Fa. BASF
Hydroxypropylcellulose (Klucel LF Pharm)	7309	Fa. Hercules
Macrogol 6000	97/138388	Fa. Hüls
Micro-Talc	92092223	Fa. Norwegian Talc
Titandioxid	60180	Fa. Kronos

Tab. 9-6 *Sonstige Materialien*

<i>Sonstige Materialien</i>	<i>Chargenbezeichnung</i>	<i>Hersteller / Lieferant</i>
ASE-Filter Cellulose ($\varnothing = 19,1$ mm)	Art.-Nr. 49458	Fa. Dionex
ASE-Probenaufanggefäße	Art.-Nr. 48783	Fa. Dionex
Baysilone-Paste	für Röntgendiffraktometrie	Fa. Bayer
Bondelut-Adapter	Art.-Nr. 5.1213-1001	Fa. Ziemer
Bördelkappen für HPLC- Vials	Art.-Nr. N11TB	Fa. Macherey-Nagel
Einmalfilter 0,45 μm	Art.-Nr. 11606	Fa. Sartorius
DSC-Aluminiumtiegel	Art.-Nr. ME-27331	Fa. Mettler
HPLC-Vials	Art.-Nr. N11-1	Fa. Macherey-Nagel
Lewatit Mono Plus M 600 Anionenaustauscher	N4012	Fa. Bayer
Lewatit Mono Plus SP 112 Kationenaustauscher	K4027	Fa. Bayer
Papierfilter ($\varnothing = 90\text{mm}$)	311610	Fa. Schleicher & Schuell
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Art.-Nr. 616201	Fa. Greiner
Sand (Ottawa) 20-30 mesh	Art.-Nr. S23-3	Fa. Fisher Scientific
Separtis Isolute 101 (200 mg/6 ml)	0024903EE	Fa. Separtis
Separtis Isolute C18 (EC) (500 mg/6 ml)	0174004HD	Fa. Separtis
Separtis Isolute PE-AX (500 mg/3 ml)	0222901FA	Fa. Separtis
Varian Bondelut SAX (300 mg/3 ml)	181272	Fa. Varian
Varian Bondelut SCX (500 mg/ 3 ml)	170034	Fa. Varian

9.2 Allgemein verwendete Geräte

Tab. 9-7 *Liste der allgemein verwendeten Geräte*

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller / Lieferant</i>
Heizbarer Magnetrührer, IKA Combimag RCH	Fa. Janke & Kunkel
Laborschüttler SM 25	Fa. Otto
Laborwaage Mettler AE 200	Fa. Mettler
Laborwaage Mettler AT 261 Delta Range	Fa. Mettler

Laborwaage Mettler PC 4400	Fa. Mettler
Li-Chrolut Absaugsystem	Fa. Merck
Rhönradmischer	Eigenbau
Rotationsverdampfer Rotavapor-R	Fa. Büchi
Schlauchpumpe 505S	Fa. Watson-Marlow
Trockenschränke	Fa. Memmert
Turbula-Mischer T2C	Fa. Bachofen
Ultraschallbad Branson 12	Fa. Knauer
UV-Vis Spektrometer 550S	Fa. Perkin-Elmer
Vakuumpumpe minni	Fa. Leybold-Heraeus
Verdampfer TurboVap LV	Fa. Zymark
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Fa. Heraeus

9.3 Datenverarbeitung

Rechner: Pentium II-MMX 233 MHz, 260 MB RAM, 4 GB Festplatte

Tab. 9-8 Liste der allgemein verwendeten Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller / Lieferant</i>
Diffraclus BASIC 4.0	Fa. Bruker AXS
DVS analysis suite	Fa. Surface Measurement Systems
HP Chemstation data system	Fa. Agilent Technologies
Mastersizer 2000 Vers. 4.0	Fa. Malvern
Messfix 2.3	Eigenentwicklung (Herzog 1991)
Microsoft Excel 2000	Fa. Microsoft
Microsoft Power Point 2000	Fa. Microsoft
Microsoft Word 2000	Fa. Microsoft
Millennium 32	Fa. Waters
TA 8000 Thermoanalytensystem 4.01	Fa. Mettler
VCH Biblio für Windows	VCH Verlagsgesellschaft

9.4 Analytische Verfahren

9.4.1 Extraktfraktionierung durch Flüssig/Flüssig-Extraktion

Die Fraktionierung der Trockenextrakte wird zur Bestimmung des mengenmäßigen Anteils von Stoffgruppen unterschiedlicher Polarität durchgeführt und erfolgt in Anlehnung an einen Trennungsgang von Merfort (1990). Die Methode ist bei von Eggelkraut-Gottanka (2001) beschrieben:

Etwa 3 g Trockenextrakt, genau gewogen, werden in 50 ml Wasser suspendiert und 10 min im Ultraschallbad (Fa. Knauer) behandelt. In einem 250 ml-Scheidetrichter wird die Wasserphase, die Substanzen unterschiedlicher Polarität enthält, der Reihe nach jeweils 3 mal mit je 50 ml organischem Lösungsmittel (n-Hexan, Dichlormethan und Ethylacetat) ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, über eine Nutsche (Papierfilter) filtriert und in einen tarierten Rundkolben überführt. Die Lösungsmittel werden mit Hilfe eines Rotationsverdampfers Rotavapor-R (Fa. Büchi) eingeeengt und der Rückstand wird in einem Exsikkator über Blaugel bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die verbleibende Wasserphase wird bei 60 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Trocknung werden die jeweiligen Rückstände gewogen und der prozentuale Gehalt im Trockenextrakt bestimmt.

9.4.2 Extraktfraktionierung mit beschleunigter Lösemittelextraktion (ASE)

Mit Hilfe der ASE 200 (Fa. Dionex) (Abb. 9-1) wird eine automatisierte Extraktfraktionierung durchgeführt. Dazu wird 1 g Trockenextrakt, genau gewogen, in die Probenzelle gefüllt und die Hohlräume, falls nötig, mit Ottawa-Sand (Fa. Fisher-Scientific) aufgefüllt. Die Zellen werden der Reihe nach mit n-Hexan, Dichlormethan, Aceton und Wasser gefüllt und jeweils auf 70 °C erhitzt. Bei einem Druck von 100 bar wird die Probe zweimal 4 min mit dem jeweiligen Lösemittel mazeriert. Anschließend wird die Probe mit frischem Extraktionsmittel gespült und der Extrakt und Lösemittelreste mit Hilfe von Stickstoff aus der Zelle in tarierte Auffanggefäße gespült (5 min). Die organischen Lösungsmittel werden mit Hilfe eines Verdampfers (TurboVap LV, Fa.

Zymark) eingeengt und der Rückstand in einem Exsikkator über Blaugel bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die wässrige Phase wird im Trockenschrank bei 60 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

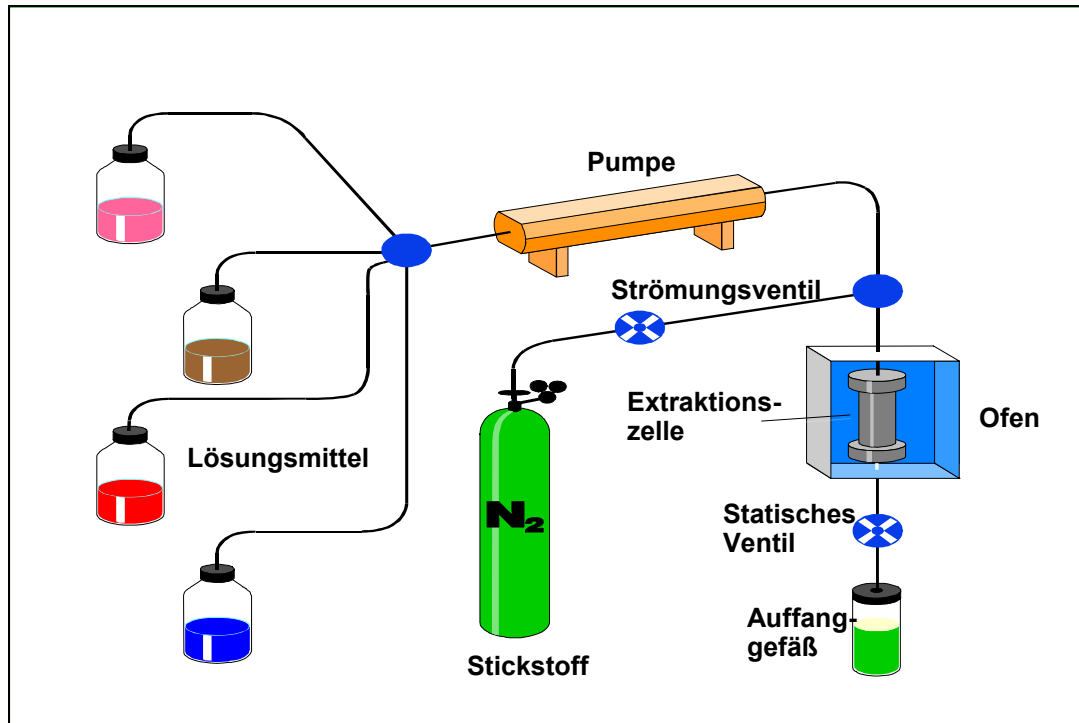


Abb. 9-1 Fließschema der Anlage zur beschleunigten Lösemittelextraktion (ASE)

Für Optimierungsversuche wird der Druck von 50 bis 150 bar in einem Temperaturbereich von 50 bis 80 °C variiert.

9.4.3 Gehaltsbestimmung von Pektinen

Probenaufbereitung

Die photometrische Gehaltsbestimmung der Pektine in pflanzlichen Trockenextrakten erfolgt in Anlehnung an eine Methode nach Matissek (1992). Dabei werden etwa 2 g Trockenextrakt, genau gewogen, in einem Zentrifugenglas mit 12 ml Wasser versetzt und mit heißem Ethanol (96%, 75 °C) auf 40 ml aufgefüllt. Die Probe wird im Wasserbad 10 min auf einer Temperatur von 85 °C gehalten. Zur vollständigen Fällung wird mit einem Glasstab umgerührt und anschließend das Volumen mit Ethanol (96%) auf 50 ml ergänzt. Bei 4000 U/min wird die Suspension mit Hilfe einer Zentrifuge (Megafuge 1.0R, Fa. Heraeus) 15 min lang zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die gesamte Prozedur wird wiederholt und das erhaltene Zentrifugat anschließend unter Zusatz von Wasser in einen 100 ml-Messkolben überführt. Die Suspension wird mit 5 ml 1N Natriumhydroxidlösung versetzt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Suspension wird 15 min unter gelegentlichem Umrühren stehen gelassen und anschließend durch einen Papierfilter filtriert.

Das erhaltene Filtrat muss bei hohen Absorptionen der Endlösung entsprechend mit Wasser verdünnt werden. Je 1 ml der erhaltenen verdünnten oder unverdünnten Lösung werden in 2 Reagenzgläser pipettiert. In eines der beiden Gläser werden anschließend 0,5 ml Ethanol (96%) (Vergleichslösung), in das andere 0,5 ml 0,1%-ige ethanolische Carbazol-Lösung (Probelösung) gegeben. Anschließend werden in beide Gläser unter ständigem Schütteln je 6 ml konz. Schwefelsäure gegeben. Dies sollte innerhalb von etwa 7 Sekunden erfolgen, um in den Lösungen eine Temperatur von 85 °C zu erreichen. Die Reagenzgläser werden für 5 min in ein Wasserbad mit 85 °C gestellt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Probelösung bei einer Wellenlänge von 525 nm photometrisch gegen die Vergleichslösung vermessen (UV-Vis Spektrometer 550S, Fa. Perkin-Elmer).

Kalibrierkurve

Zur Erstellung der Kalibrierkurve werden Galacturonsäure-Vergleichslösungen mit einer Konzentration von 10 bis 70 µg/ml hergestellt. Davon wird 1 ml mit ethanolischer 0,1%-iger Carbazol-Lösung versetzt und entsprechend den Probelösungen behandelt. Als Blindwert wird 1 ml Wasser eingesetzt und in analoger Weise verfahren.

Berechnung des Pektingehalts

$$\text{Gehalt/Pektine [mg/kg]} = \frac{\text{Galacturonsäure [}\mu\text{g/ml]} (\text{aus Kalibrierkurve}) \cdot 100}{\text{Einwaage [g]}} \quad (\text{Gl. 9-1})$$

Bestimmung der Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate werden dem Trockenextrakt ECC 306 drei verschiedene Mengen an Apfelpektin zugesetzt und die Analyse in der oben beschriebenen Art und Weise durchgeführt.

9.4.4 Gehaltsbestimmung der Gerbstoffe

9.4.4.1 *Gehaltsbestimmung der Proanthocyanidine unter Verwendung der Vanillin-Methode*

Die Gehaltsbestimmung der Gerbstoffe erfolgt in Anlehnung an eine bei Lang und Wilhelm (1996) beschriebene Methode. Etwa 50 mg Trockenextrakt, genau gewogen, werden in einem 100 ml-Messkolben mit 1,0 ml Methanol versetzt und mit Vanillin-Reagenz¹ bis zur Marke aufgefüllt. Nach 15 min wird die Absorption spektroskopisch (Spektrometer 550S, Fa. Perkin-Elmer) bei einer Wellenlänge von 510 nm bestimmt.

Als Grundlage für die Berechnung des Gehalts dient der spezifische Absorptionskoeffizient von 1147 (bezogen auf 0,5 mg Catechin/100 ml).

9.4.4.2 *Gehaltsbestimmung der kondensierten Gerbstoffe unter Verwendung der HCl-Methode*

Diese Methode wird ebenfalls bei Lang und Wilhelm (1996) beschrieben. Etwa 70 mg Trockenextrakt, genau gewogen, werden in einem 25 ml-Messkolben in Methanol suspendiert. Von der überstehenden Lösung wird 1,0 ml zusammen mit 6,0 ml n-Butanol und konz. Salzsäure (95:5) in ein Zentrifugenglas gegeben. Für eine vollständige Oxidation werden 0,2 ml einer 2%-igen Ammoniumeisen-(III)-sulfat-Lösung (in 2 M Salzsäure) zugegeben. Mit geschlossenem Deckel wird der Ansatz 45 Minuten auf dem Wasserbad erhitzt und anschließend innerhalb von 5 Minuten auf Eis bis auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Lösungen werden gegen eine nicht erhitzte Vergleichslösung bei einer Wellenlänge von 563 nm photometrisch (Spektrometer 550S, Fa. Perkin-Elmer) vermessen. Der Gehalt wird über die Absorption errechnet, wobei ein spezifischer Absorptionskoeffizient von 470 zu Grunde gelegt wird.

¹ Vanillin-Reagenz: 100 ml enthalten 0,5 g Vanillin + 4 ml konz. Salzsäure + Eisessig

9.4.5 Gehaltsbestimmung von Kalium in pflanzlichen Trockenextrakten

Der Gehalt an Kalium in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. wird mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) ermittelt:

Gerät:	Varian SpectrAA 20 plus
Stromstärke:	5 mA
Medium:	Acetylen/Luft-Gemisch
Messwellenlänge:	766,5 nm (Natrium-Kalium-Lampe)
Standardlösungen:	1000 - 0,1 ppm Kalium (Kaliumchlorid)

Etwa 100 mg Trockenextrakt von *Eschscholtzia californica* Cham., genau gewogen, werden in 100 ml Wasser suspendiert und durch einen Einmalfilter (0,45 µm) filtriert. Die erhaltene Extraktlösung wird im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt. Der Kaliumgehalt wird über die Absorptionen der beiden Standardlösungen von 1 und 10 ppm errechnet.

9.4.6 Gehaltsbestimmung der Zucker mit der Methode der Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD)

9.4.6.1 Probenaufbereitung

Etwa 50 mg Trockenextrakt, genau gewogen, werden in 20,0 ml Wasser suspendiert und mit einem Laborschüttler SM 25 (Fa. Otto) bei 150 U/min 20 min lang geschüttelt. Die erhaltene Suspension wird über einen Papierfilter (90 mm) filtriert und 5,0 ml des erhaltenen Filtrats werden auf die dreistufige Festphasenextraktions (SPE)- Sequenz (Abb. 9-2) gegeben.

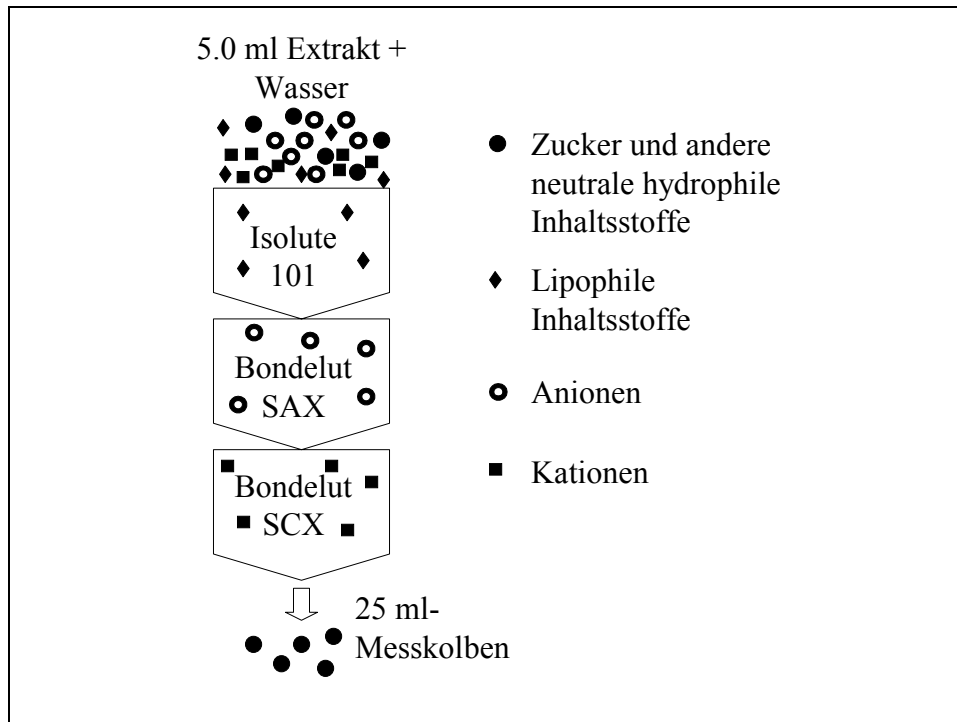


Abb. 9-2 Schema der dreistufigen Festphasenextraktion zur Abtrennung der Zucker

Die Festphasenextraktion wird mit dem Absaugsystem Li-Chrolut (Fa. Merck) durchgeführt. Vor der Extraktion wird die lipophile Kartusche Isolute 101 (Fa. Separtis) mit etwa 12 ml Methanol und 12 ml Wasser zur Konditionierung durchspült. Zur Äquilibrierung wird die Bondelut SAX- mit Hilfe eines Adapters auf die Bondelut SCX-Kartusche (alle Fa. Varian) gesteckt und die beiden Ionenaustauscherkartuschen mit etwa 6 ml Wasser durchspült. Zur eigentlichen Extraktion wird die Isolute 101-Kartusche auf die beiden anderen Kartuschen gesteckt.

Nach Aufgabe von 5,0 ml der Extraktlösung auf die SPE-Sequenz wird zweimal mit je 6 ml Wasser nachgespült. Die in einem 25 ml-Messkolben aufgefangene Lösung wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und gegebenenfalls nach Verdünnung chromatographisch untersucht.

9.4.6.2 HPLC-Methodenbeschreibung

Geräte:	Gradientenpumpe GP 40 (Fa. Dionex) Autosampler series 1100 ALS (Fa. Agilent) Säulenthermostat series 1100 ColComp (Fa. Agilent) Detektor ED 40 (Fa. Dionex) Auswertesoftware Millennium 32 (Fa. Waters)
Analytische Säule:	CarboPac PA-100 Analytical (4 x 250 mm) (Fa. Dionex)
Vorsäule:	CarboPac PA-100 Guard (4 x 50 mm) (Fa. Dionex)
Mobile Phase:	20 min isokratische Trennung mit 20 mM NaOH, 5 min Spülschritt mit 500 mM NaOH, 25 min Rekonditionierung mit 20 mM NaOH

Herstellung der mobilen Phase: In den Vorratsgefäßen für die mobile Phase wird die entsprechende Menge vorgelegt und 20 min mit Helium beaufschlagt. Danach wird die benötigte Menge an 50 %-iger NaOH-Lösung (Fa. J.T. Baker) zupipettiert.

Einstellungen

Flussrate / Druck:	1,0 ml/min / etwa 168 bar
Injektionsvolumen:	10 µl
Säulentemperatur:	22 °C
Detektion:	Messpotential (0,4 sec/+ 0,05 V) Integration von 0,2 bis 0,4 Sekunden, Oxidationspotential (0,2 sec/+ 0,75 V), Reduktionspotential (0,4 sec/- 0,15 V)

Die Berechnung der Konzentration der drei Zucker Glucose, Fructose und Saccharose erfolgt nach der Methode des externen Standards mit Hilfe von Lösungen, die die drei Saccharide kombiniert enthalten:

$$\text{Gehalt Zucker [\%]} = \frac{(\text{Peakfläche/Probe} - \text{Achsenabschnitt/Regression}) \cdot 50000}{1000 \cdot \text{Steigung/Regression} \cdot \text{Einwaage}} \quad (\text{Gl. 9-2})$$

9.4.6.3 Kalibrierung und Validierung

Linearität

Acht Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen werden für alle drei Substanzen hergestellt. Je Verdünnung werden drei Einzelbestimmungen durchgeführt.

Systempräzision

Eine aufbereitete Extraktlösung von ECC 306 wird sechsmal injiziert. Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (relative Standardabweichung) werden berechnet.

Methodenpräzision

Mit dem Trockenextrakt ECC 604 werden sechs unabhängige Probenaufbereitungen durchgeführt und über eine Doppelbestimmung der Gehalt an Glucose, Fructose und Saccharose bestimmt. Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten werden ermittelt (n = 6).

Reproduzierbarkeit (Intermediate precision)

Der Trockenextrakt ECC 306 wird an zwei unterschiedlichen Tagen durch zwei unterschiedliche Personen aufbereitet und die Zuckergehalte durch Doppelbestimmung ermittelt. Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten werden bestimmt (n = 12).

Wiederfindungsraten (Richtigkeit)

Zwei verschiedene Extrakte (ECC 606 und WL 98220027) werden mit kombinierten Lösungen von Glucose, Fructose und Saccharose versetzt, deren Gehalt im Bereich von 50, 100 und 150% des jeweiligen Saccharids liegt. Die erhaltenen gespikten Lö-

sungen werden einer Probenaufbereitung unterzogen und der Gehalt über eine Doppelbestimmung ermittelt. Es werden die Wiederfindungsraten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten bestimmt.

Bestimmungs- und Nachweisgrenzen

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze eines Zuckers wird eine aufbereitete Extraktlösung, mit bekanntem Zuckergehalt, in 1:5-Schritten verdünnt. Jede Lösung wird dreimal injiziert. Es wird die Konzentration ermittelt, bei der der Variationskoeffizient über 10% liegt. Die nächsthöhere Konzentration stellt die Bestimmungsgrenze dar. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wird das Systemrauschen ermittelt und die Nachweisgrenze als das Dreifache des Systemrauschens festgelegt.

9.4.6.4 Durchführung der Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA)

Für die TFA-Hydrolyse werden 30 mg Trockenextrakt, genau gewogen, zusammen mit 500 µl Wasser und 500 µl 4 N Trifluoressigsäure (TFA) in ein Reaktionsgefäß (Fa. Greiner) gegeben und für 1 Stunde bei 100 °C in einen Trockenschrank (Fa. Memmert) gestellt. Vor der HPLC-Analyse werden die Proben in einem 20 ml-Messkolben mit Wasser verdünnt und anschließend der oben beschriebenen SPE-Aufarbeitung unterzogen.

9.4.7 Ionenausschlusschromatographie mit anschließender Lichtstretedetektion (IEC-ELSD) zur Bestimmung des Gehalts von Citronen-, Äpfel- und Weinsäure in pflanzlichen Trockenextrakten

9.4.7.1 Probenaufbereitung

Etwa 300 mg Trockenextrakt, genau gewogen, werden in 25,0 ml Wasser suspendiert und mit einem Laborschüttler SM 25 (Fa. Otto) bei 150 U/min 20 min lang geschüttelt. Die erhaltene Suspension wird über einen Papierfilter (90 mm) filtriert und vom Filtrat werden 5,0 ml auf eine zweistufige SPE-Sequenz gegeben.

Diese wird vor der Probenaufarbeitung folgendermaßen konditioniert: Zunächst wird die Isolute C18 (EC)-Kartusche (Fa. Separtis) mit etwa 3 ml Methanol gespült. Zur Äquilibrierung folgen etwa 3 ml Wasser. Die Isolute PE-AX-Kartusche

(Fa. Separtis) wird ebenfalls mit etwa 3 ml durchspült und anschließend mit Hilfe eines Adapters unter die C18-(EC)-Kartusche platziert.

Nach Aufgabe der Extraktlösung wird mit etwa 6 ml Wasser nachgespült. Das Eluat wird verworfen. Danach werden mit etwa 9 ml 0,1 N Trifluoressigsäure (TFA) die organischen Anionen von der PE-AX-Kartusche in einen 10 ml-Messkolben gespült und dieser mit 0,1 N TFA bis zur Marke aufgefüllt. Die erhaltene Lösung werden direkt chromatographisch vermessen.

9.4.7.2 HPLC-Methodenbeschreibung

Geräte:	Pumpe L-6200A (Fa. Merck/Hitachi) Durchfließgaser DG-1310 (VDS-optilab) Autosampler series 1100 ALS (Fa. Agilent) Säulenthermostat series 1100 ColComp (Fa. Agilent) Lichtstreuendetektor Sedex 75 (Fa. Sedere) Auswertesoftware Millennium 32 (Fa. Waters)
Analytische Säule:	Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) (Fa. Bio-Rad)
Vorsäule:	Micro Guard Cation H Cartridge (Fa. Bio-Rad)
Mobile Phase:	0,02 N TFA (pH-Wert: etwa 1,7-1,8)

Einstellungen

Flussrate / Druck:	0,6 ml/min / etwa 75 bar
Injektionsvolumen:	20 µl
Säulentemperatur:	22 °C
Detektion:	Temperatur im Detektor: 60 °C, Empfindlichkeit: 8, Druck (Stickstoff): 3,4 bar

Die Berechnung der Konzentrationen von Citronen-, Äpfel- und Weinsäure erfolgt nach der Methode des externen Standards mit Hilfe von Lösungen, die alle drei orga-

nischen Säuren in Kombination enthalten. Da sich bei der direkten Auftragung der erhaltenen Peakflächen gegen die Konzentrationen exponentielle Kurven ergeben, werden zur Ermittlung der Gehalte die Konzentrationen und die zugehörigen Peakflächen in logarithmisch transformierter Form aufgetragen. Dadurch ergibt sich folgende Berechnung:

$$\text{Gehalt Säure [\%]} = \frac{e^{\frac{(\ln(\text{Fläche}) - \text{Achsenabschnitt}_{\text{Regr}})}{\text{Steigung}_{\text{Regr}}}} \cdot 5}{\text{Einwaage [mg]}} \quad (\text{Gl. 9-3})$$

9.4.7.3 Kalibrierung und Validierung

Linearität

Aufgrund des exponentiellen Zusammenhangs zwischen Konzentration und Peakfläche, werden zur Ermittlung der Linearität die beiden Größen logarithmiert. Sechs Lösungen, in denen alle drei Säuren in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen, werden hergestellt. Je Verdünnung werden drei Einzelbestimmungen durchgeführt.

Systempräzision

Aufbereitete Extraktlösungen von ECC 606 und WL 99220827 werden sechsmal injiziert. Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (relative Standardabweichung) werden berechnet.

Methodenpräzision

Mit dem Trockenextrakt WL 99220306 werden sechs unabhängige Probenaufbereitungen durchgeführt und über eine Doppelbestimmung der Gehalt an Citronen-, Äpfel- und Weinsäure bestimmt. Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten werden ermittelt (n = 6).

Wiederfindungsraten (Richtigkeit)

Der Trockenextrakt ECC 606 wird mit kombinierten Lösungen von Citronen- und Äpfelsäure versetzt, deren Gehalt im Bereich von 50, 100 und 150% der jeweiligen organischen Säure liegt. Die erhaltenen Lösungen werden einer Probenaufbereitung unter-

zogen und der Gehalt mittels Doppelbestimmung ermittelt. Es werden die Wiederfindungsraten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten bestimmt.

Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze einer jeweiligen organischen Säure wird eine aufbereitete Extraktlösung vom Trockenextrakt WL 99220827 in 1:2-Schritten verdünnt. Jede Lösung wird dreimal injiziert. Es wird die Konzentration ermittelt, bei der der Variationskoeffizient über 10% liegt. Die nächsthöhere Konzentration stellt die Bestimmungsgrenze dar. Die Nachweisgrenze wird als das Dreifache des Systemrauschens bestimmt.

9.4.8 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) zur Bestimmung der organischen Säuren in pflanzlichen Trockenextrakten²

9.4.8.1 Probenaufbereitung

Etwa 10 g Trockenextrakt, genau gewogen, werden in 200,0 ml Wasser suspendiert und durch eine Nutsche (Papierfilter) filtriert. 100,0 ml der erhaltenen Lösung werden auf 200 g Lewatit Mono Plus M 600 Anionenaustauscher (Fa. Bayer) aufgegeben. Nach Spülen mit zweimal 100 ml Wasser werden die organischen Säuren mit 100 ml 0,1 N Salzsäure eluiert. Anschließend wird die erhaltene Lösung in einem 250 ml-Scheidetrichter zweimal mit jeweils 100 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers Rotavapor R (Fa. Büchi) wird das Lösungsmittel zur Trockene eingedampft und der Rückstand wird in 1,0 ml Acetonitril aufgenommen. Von dieser Lösung werden 100 µl zusammen mit 100 µl N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (BSTFA) in ein Reaktionsgefäß (Fa. Greiner) gegeben, geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wird direkt mittels GC-MS untersucht.

² Für die Ermöglichung der Durchführung der Versuche danke ich Herrn Prof. Dr. S. Laufer und seinen Mitarbeitern

9.4.8.2 Methode der GC-MS

Geräte:	Gaschromatograph GC 6890 series (Fa. Agilent) Quadrupol-Massenspektrometer 5973 (Fa. Agilent)
Säule:	HP 5MS (25 m x 0,25 mm i.d.) mit Phenylmethylsiloxan (Dicke 0,35 µm) (Fa. Agilent)
Trägergas / Flussrate:	Helium / 1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	1,0 µl (Splitless)
Temperaturprogramm:	1 min bei 50 °C, mit 5 °C/min auf 200 °C, mit 12 °C/min auf 280 °C, mit 15 °C/min auf 300 °C
Injektortemperatur:	250 °C
Detektion:	Temperatur der Ionenquelle: 230 °C, Spannung: 70 eV, Massenscan von 50 bis 550 a.m.u.

Die Abschätzung der Gehalte an organischen Säuren insbesondere Glycerinsäure wird mit Standardsubstanzen, die dieselbe Aufbereitung durchlaufen, durchgeführt. Wiederfindungsraten der Glycerinsäure werden ermittelt, indem jeweils 1,5 g, 3,0 g und 4,5 g 40%-ige Glycerinsäurelösung zum Trockenextrakt von ECC 606 hinzugegeben werden. Mit diesen Lösungen wird die gleiche Aufarbeitung und GC-MS-Untersuchung durchgeführt. Die Wiederfindungsrate, Standardabweichung und der Variationskoeffizient werden bestimmt.

9.5 Physikalisch-chemische Methoden

9.5.1 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die dynamische Differenzkalorimetrie erfolgt in Anlehnung an eine Methode für Johanniskraut-Trockenextrakte, die bei Rocksloh (1999) beschrieben ist.

Gerätebeschreibung

Gerätesystem:	Mettler TA 8000, Messzelle: DSC 820 (Fa. Mettler)
Software:	TA 8000 Thermoanalytensystem 4.01 (Fa. Mettler)
Probentiegel:	Standardaluminiumtiegel, Deckel durchstoßen, 40 μ l
Referenztiegel:	Leerer Standardaluminiumtiegel, Deckel durchstoßen

Kalibrierung

Die Kalibrierung von $\tau(\text{Lag})$ gewährleistet eine heizratenunabhängige Messung und gibt die Zeitkonstante des Temperatenausgleichs zwischen Ofenkörper und DSC-Sensor an. Die Onset-Temperaturbestimmung von Gallium, Indium und Zinn wird bei Heizraten von 2, 5 und 10 K/min durchgeführt. Aus diesen Werten wird eine Regressionsgerade erstellt, deren Steigung die $\tau(\text{Lag})$ -Werte der drei Metalle angibt.

Bei der Kalibrierung werden die Onset-Temperaturen der Schmelzpeaks von Gallium, Indium, Zinn und Zink bei einer Heizrate von 5 K/min bestimmt. Die Temperaturfunktion des Sensors wird daraufhin neu berechnet.

Die Wärmestromkalibrierung vergleicht die Schmelzwärme von fünf Indiumproben mit dem wahren Wert von 28,45 J/g. Der Mittelwert der kalorischen Empfindlichkeit, E wird in das Kalibrierprotokoll eingetragen.

Versuchsbedingungen

Kühlmittel:	Flüssiger Stickstoff
Temperaturbereich:	-20 °C bis 150 °C
Heizrate:	20 K/min
Einwaagen:	Etwa 7-10 mg

9.5.2 Röntgendiffraktometrie³

Die Trockenextrakte werden mit Hilfe eines Transmissionsröntgendiffraktometers auf amorphe und kristalline Anteile untersucht. Die Proben werden mit Hilfe von Silicon-Paste (Fa. Bayer) auf beschichtete Aluminiumfolie geklebt und in ein Diffraktometer D5000 (Fa. Siemens) eingebracht. Die Untersuchung wird im Stufenscan-Modus durchgeführt, wobei der Beugungswinkel 2Θ von 5 bis 50 in Stufen von 0,02 alle 4 Sekunden gesteigert wird. Die angelegte Beschleunigungsspannung beträgt 40 kV, die Anodenstromstärke 30 mA. Die Probe rotiert mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 15 U/min. Ausgewertet werden die Messungen mit Hilfe der Software Diffracplus BASIC 4.0 (Fa. Bruker AXS).

9.5.3 Messung der dynamischen Wasserdampfsorption (DVS)

Die gravimetrische Bestimmung der Wasserdampfaufnahme wird in einem DVS 2-Gerät (Fa. Surface Measurement Systems) (Abb. 9-3) durchgeführt.

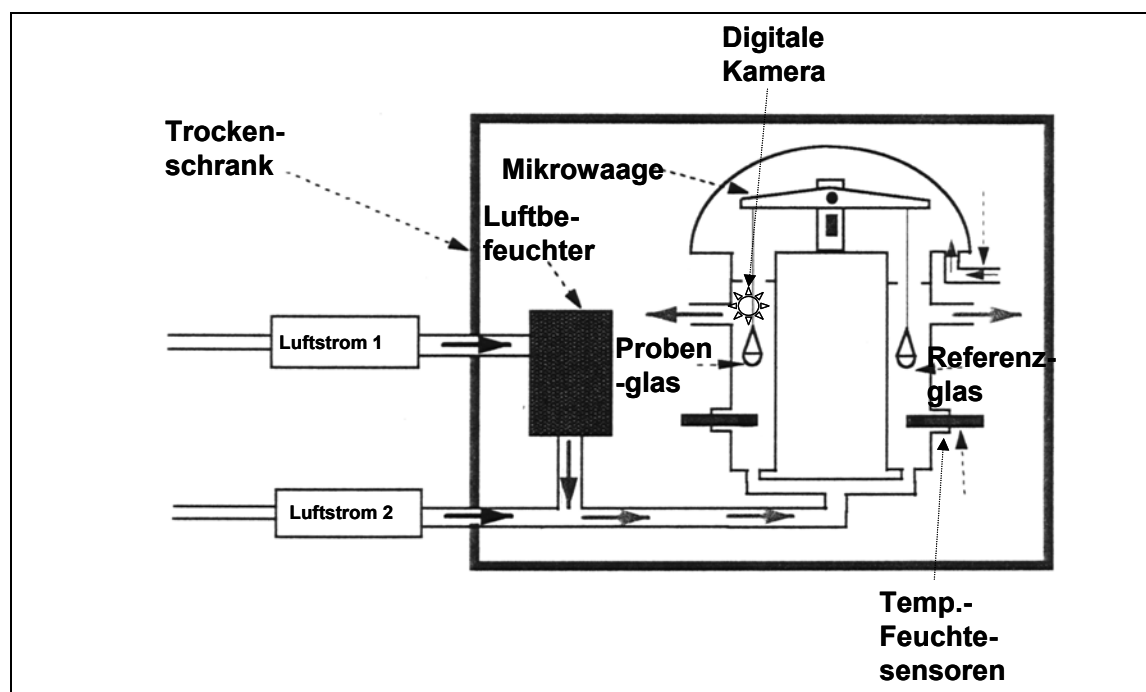


Abb. 9-3 Schema der dynamischen Wasserdampfsorption (DVS)

³ Für die Durchführung und Auswertung der Versuche danke ich Herrn Prof. Dr. J. Strähle

Dieses feuchte- und temperaturkontrollierte Gerät besitzt eine Cahn D-200 Mikrowaage (Fa. Thermo Cahn), die in der Lage ist, Massenänderungen von 1 ng genau zu bestimmen. Die gesamte Apparatur befindet sich in einem Trockenschrank (Fa. WTB Binder), bei konstant 25 °C. Die gewünschten relativen Feuchten werden durch das Mischen eines getrockneten und eines durch eine Wasserflasche geleiteten feuchten Luftstroms mit Hilfe von Massenflussreglern erhalten.

Etwa 50 mg Trockenextrakt, genau gewogen, werden in das Probengefäß gegeben und in das Gerät eingebracht. Zunächst wird die relative Feuchte auf 0% r.F. eingestellt und die Probe bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dann wird die relative Feuchte in Stufen von 10% r.F. von 0% auf 60% r.F. gesteigert und anschließend wieder gesenkt. Die Dauer einer Stufe beträgt 4 Stunden, wobei nicht auf eine Gleichgewichtseinstellung gewartet wird. Die Daten werden mit Hilfe der DVS Data Analysis Suite Software (Fa. Surface Measurement Systems) unter einer Microsoft Excel-Oberfläche (Fa. Microsoft) ausgewertet.

9.6 Galenische Methoden

9.6.1 Walzenkompaktierung der Trockenextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham.

9.6.1.1 Herstellung der Kompaktiermischungen

Verschiedene Chargen des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. werden in einer Rhönradtonne (100 Liter) vorgelegt, durch ein Sieb (300 µm) werden 2% Magnesiumstearat aufgesiebt und die Mischung anschließend 10 min im Rhönradmischer (Eigenbau) gemischt.

9.6.1.2 Kompaktierung

Der spalt- und kraftkontrollierte GMP Mini-Pactor (Fa. Gerteis) ist in Abb. 9-4 dargestellt und wird bei von Eggelkraut-Gottanka (2001) beschrieben. Ein Schema der drei Bereiche Zuführeinheit, Kompaktierzone und Granuliereinheit zeigt Abb. 9-5. Das Material wird aus dem Dosiertrichter, in dem sich ein Auflockerer befindet, über eine Dosierschnecke zur Stopfschnecke gefördert. Die Stopfschnecke sorgt für einen kon-

trollierten Materialfluss in die Kompaktierzone zwischen die beiden Walzen. Dabei wird das Pulver durch seitliche Sintermetallfilter entlüftet und leicht vorverdichtet. Die Spaltbreite wird über den Zufluss an Material über die Stopfschnecke konstant gehalten. Die Presswalzen sind unabhängig voneinander angetrieben und rotieren mit derselben Geschwindigkeit gegenläufig. Die linke Walze (Masterwalze) ist fixiert, während die zweite Walze (Slavewalze) beweglich angebracht ist. Ein hydraulischer Regelmechanismus presst die Slavewalze mit der eingestellten Kraft gegen die Masterwalze. Zwei seitlich an der Masterwalze befindliche Stahlkragen sorgen für eine gleichmäßige Verteilung der Kompaktierkraft auf der gesamten Walzenbreite (Funakoshi et al. 1977), was zu einer homogenen Porosität der erhaltenen Schülpen führt (Shlieout et al. 2000). Die Schülpen werden durch zwei Abstreifer von den Walzen getrennt und im nachgeschalteten Siebgranulator granuliert. Der Granulator besteht aus zwei Statorleisten, einem austauschbaren Taschenmuldenrotor, einem austauschbaren Granuliersieb und dem Produktausflusstrichter. Tab. 9-9 zeigt die verwendeten Prozessparameter und vorgenommenen Einstellungen.

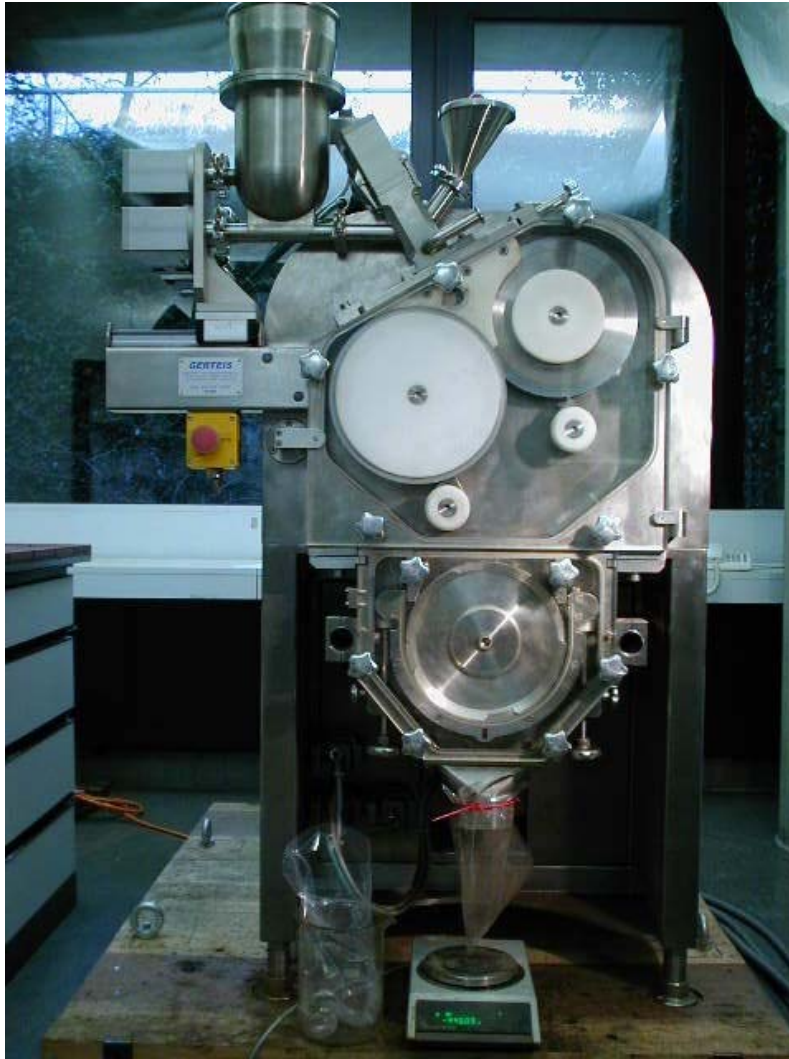


Abb. 9-4 Frontansicht des GMP Mini-Factors

Tab. 9-9 Parameter bei der Walzenkompaktierung

<i>Parameter</i>	<i>Einstellungen</i>
Kompaktierkraft	5, 10, 15 und 20 kN/cm
Spaltbreite	2 mm
Walzenoberfläche	geriffelt
Granulator	Taschenmuldenrotor; oszillierend; 90 U/min; 180° im Uhrzeigersinn, 150° entgegen Uhrzeigersinn
Siebgröße	1,0 mm

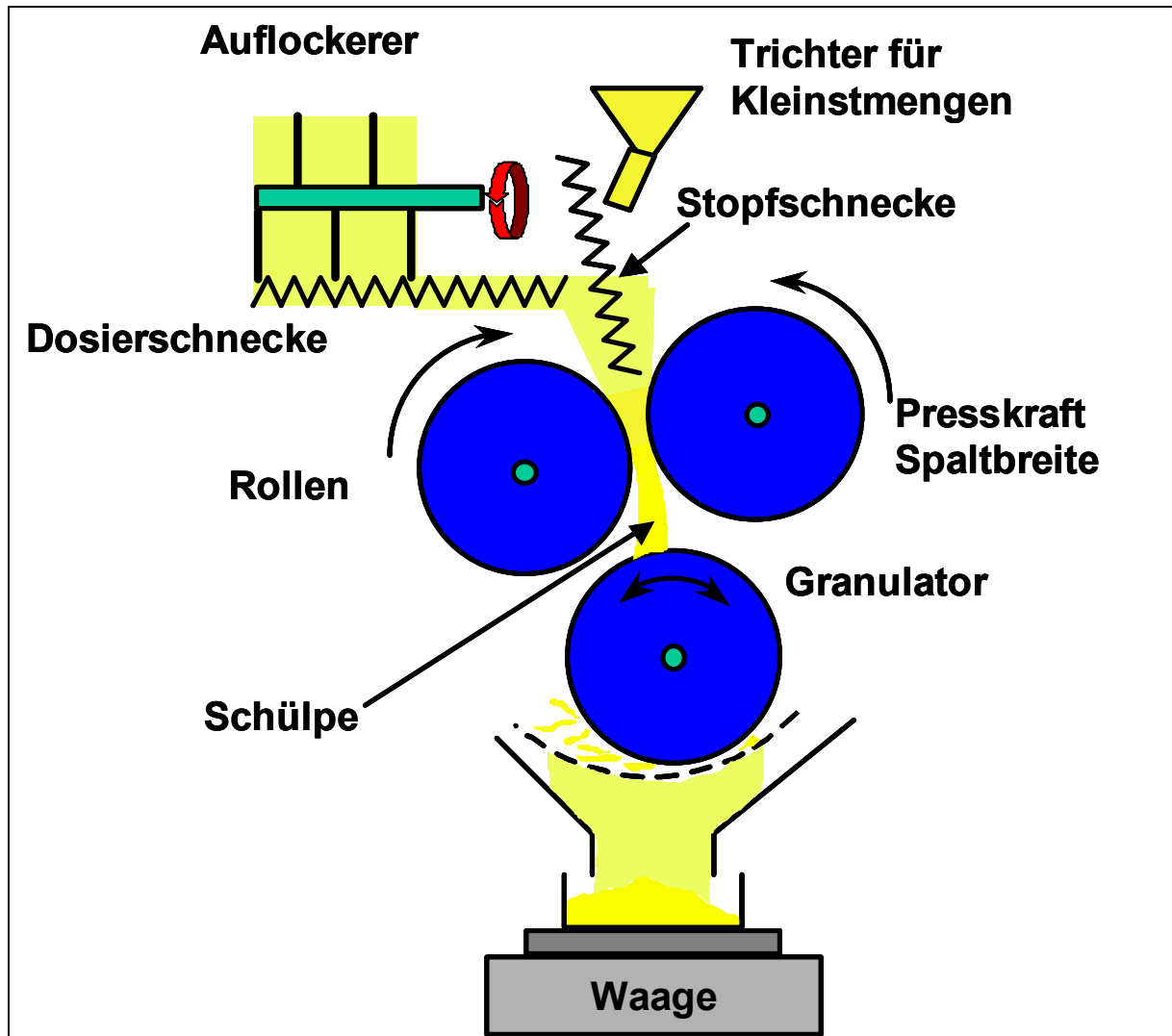


Abb. 9-5 Schema des GMP Mini-Factors⁴

9.6.2 Partikelgrößenanalyse mittels Laserbeugung

Die Korngrößenverteilung sowohl der Originalextrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. als auch die der Kompaktate wird mit Hilfe eines Laserbeugungsspektrometers Mastersizer 2000 (Fa. Malvern) bestimmt. Das Detektorsystem erfasst einen Partikelgrößenbereich von 0,02 μm bis 2000 μm . Dem Gerät liegt das Prinzip der Mie-Streuung zu Grunde. Als Brechungsindex wird ein Wert von 1,52 und als Absorption ein Wert von 0,1 vorgegeben. Die Erfassungssoftware (Fa. Malvern) ermittelt direkt die Partikelgrößenverteilungen und die verschiedenen Korngrößenparameter. Vor Beginn der eigentlichen Messung mit einer Dauer von 60 Sekunden wird eine Hinter-

⁴ Für die Überlassung der Abbildung danke ich Herrn Dr. R. Lammens (Fa. Bayer)

grundsmessung von 65 Sekunden ohne Produkt durchgeführt. Die dort ermittelte Streuintensität wird nach der Messung der Proben rechnerisch von der Messintensität abgezogen.

Die Probenaufgabe erfolgt mit der Trockendispergiereinheit Scirocco 2000 (Fa. Malvern), wobei mit einem Dispersionsluftdruck von 1 bar gearbeitet wird.

9.6.3 Böschungswinkelmessung

9.6.3.1 Originalextrakte

Die Böschungswinkel der Originalextrakte werden mit der Sieb-Kegel-Methode bestimmt. Dabei werden 50 g Extrakt durch ein Sieb mit der Maschenweite von 1,0 mm auf einen Messingzylinder (Durchmesser 50 mm) aufgesiebt und die Kegelhöhe gemessen. Der Böschungswinkel errechnet sich nach Gl. 9-4.

$$\tan \alpha = \frac{\text{Höhe der Pulverschüttung}}{\text{Radius des Zylinders}} \quad (\text{Gl. 9-4})$$

Der Mittelwert der Pulverhöhe aus drei Bestimmungen wird der Berechnung zu Grunde gelegt.

9.6.3.2 Kompaktate

Die Böschungswinkel der Kompaktate werden gemäß DIN 53916 mit dem Auslauftrichter nach Dr. Pfrengle bestimmt.

9.6.4 Bestimmung des Hausnerfaktors

Der Hausnerfaktor stellt den Quotienten aus Stampf- und Schüttdichte dar. Die Bestimmung der Schütt- und Stampfdichte der Extrakte und Kompaktate erfolgt entsprechend Ph. Eur. 2002 (2.9.15) mit einem Stampfvolumeter JET ST 2 (Fa. Engelsmann). Es wird der Mittelwert aus zwei Messungen bestimmt.

9.6.5 Ionenaustausch mit Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham.

Etwa 10 g Trockenextrakt werden in 200 ml Wasser suspendiert und durch eine Nutsche (Papierfilter) filtriert. 100 ml der erhaltenen Lösung werden auf eine Säule mit

200 g Lewatit Mono Plus M 600 oder Lewatit Mono Plus SP 112 (Fa. Bayer) gegeben. Nach einer Wartezeit von 5 min wird das Eluat mittels einer Vakuumpumpe minni (Fa. Leybold-Heraeus) abgezogen. Diese Vorgehensweise wird solange wiederholt, bis eine von Anionen oder Kationen weitgehend befreite Extraktlösung erhalten wird.

9.6.6 Sprühtrocknung der von Ionen befreiten Extrakte

Die von An- bzw. Kationen befreiten Lösungen werden mit einem Laborsprühtrockner LT-A (Fa. Nubilosa) (Abb. 9-6) sprühgetrocknet. Mit Hilfe einer Schlauchpumpe 505 S (Fa. Watson-Marlow) werden die Extraktlösungen der Dreistoffdüse (Durchmesser 1 mm, Fa. Hüttlin) zugeführt. Der Sprühdruck beträgt 0,8 bar, das Mikroklima wird auf 0,4 bar konstant gehalten. Die Sprührate beträgt 20 ml/min. Heiz-, Sprüh- und Auslasstemperaturen stellen sich bei 210-217 °C, 137-145 °C und 70-77 °C ein.

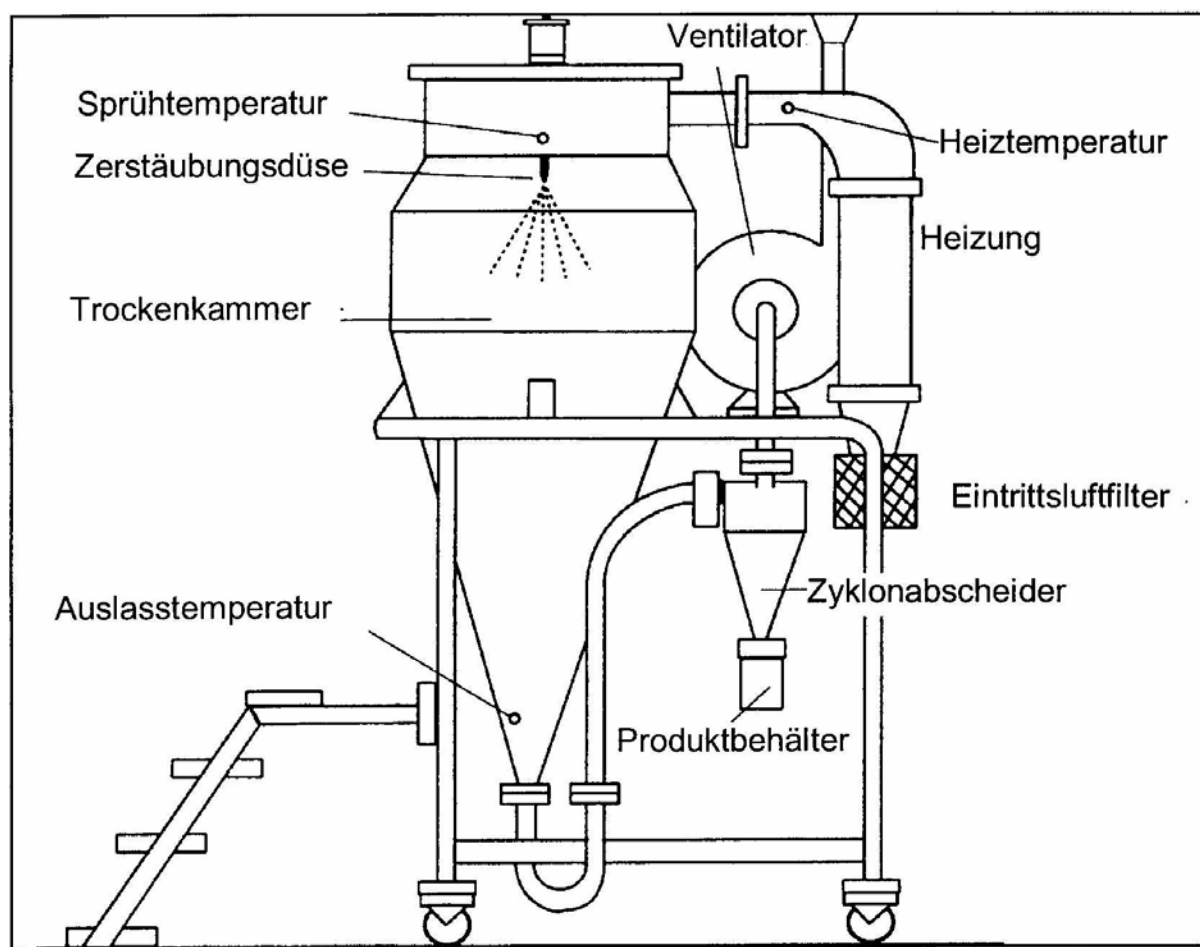


Abb. 9-6 Nubilosa Laborsprühtrockner LTA (Bauer 2000)

Die Ausbeute beträgt im Durchschnitt 55%. Die erhaltenen Produkte werden direkt für die Tablettierungsversuche eingesetzt.

9.6.7 Tablettierung der Extrakte und Kompaktate

9.6.7.1 Tablettierung der Extrakte und Kompaktate auf einer Rundlauf-tablettenpresse

Instrumentierung und Messwerterfassung

Die Tablettierung der Originalextrakte und der Kompaktate erfolgt auf einer Rundlauf-tablettenpresse RL-H (Fa. Kilian), die mit drei Stempelpaaren ausgestattet ist. Die Achse der oberen Druckrolle ist mit vier Dehnungsmessstreifen (DMS) (Fa. Hottinger Baldwin Messtechnik) instrumentiert, die eine temperaturkompensierte Messung der Presskräfte erlauben. Das Signal wird auf eine Trägerfrequenzmessbrücke übertragen (KWS 102 A, Fa. HBM) und für die Computerauswertung mit Hilfe einer A/D-Wandlerkarte (Dash 16, Isa-Karte) in eine digitale Form überführt. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der Software Messfix 2.3 (Herzog 1991). Als Kalibrierfaktor wird ein Wert von 4,38 kN/V verwendet. Die Empfindlichkeit wird auf 1 mV/V eingestellt.

Tablettiermischung

Tab. 9-10 Rezeptur der Extrakt- und Kompaktattabletten

<i>Substanz</i>	<i>Masse in mg/Tablette</i>	<i>Prozentualer Anteil</i>
Trockenextrakt bzw. Kompaktat	419,2	52,4%
Kollidon CL	53,6	6,7%
Avicel PH 101	317,6	39,7%
Aerosil R 972	3,2	0,4%
Magnesiumstearat	6,4	0,8%
Gesamtmasse	800 mg	

Dem Originalextrakt werden vor Zubereitung der Mischung 2% Magnesiumstearat zugesetzt, um die gleiche Zusammensetzung wie die Kompaktate zu erhalten. Extrakte bzw. Kompaktate werden mit Avicel PH 101 und Kollidon CL in einer Rhönradtonne

(100 Liter) für 10 min gemischt. Danach wird das hydrophobe Aerosil R 972 aufgesiebt (Sieb 315 μm) und erneut 10 min gemischt. Zum Schluss wird Magnesiumstearat durch ein Sieb (315 μm) gesiebt und durch fünfminütiges Mischen aufgezogen.

Tablettierung

Aus den Mischungen werden Oblong-Tabletten (6,5 x 17,5 mm) hergestellt. Die Presskraft wird zur Aufnahme von Presskraft-Bruchfestigkeits- bzw. Presskraft-Zerfallszeit-Profilen im Bereich von 5 bis 25 kN variiert. Tabletten, die später zum Filmcoating verwendet werden, werden mit einer Presskraft von etwa 15 kN verpresst, um ausreichende Bruchfestigkeiten von 80-100 N zu erzielen. Wegen der relativ komplexen Geometrie der Oblong-Tabletten wird den Presskraft/Bruchfestigkeits-Profilen die Presskraft und nicht der Pressdruck zu Grunde gelegt.

9.6.7.2 Tablettierung der sprühgetrockneten und modifizierten Extrakte auf einer Exzenterpresse

Instrumentierung und Messwerterfassung

Die sprühgetrockneten und von Ionen befreiten Extrakte werden mangels Substanz auf einer Exzenterpresse EK 0 (Fa. Korsch), deren Unterstempelhalter mit vier DMS (Fa. HBM) instrumentiert ist, tablettiert. Die Signalübermittlung erfolgt wie bei den Versuchen mit der Rundlauftablettenpresse (Kapitel 9.6.7.1). Als Kalibrierfaktor wird ein Wert von 3,444 kN/V bestimmt, bei einer Empfindlichkeit von 2 mV/V.

Tablettiermischung

Den sprühgetrockneten Extrakten werden vor der Herstellung der Tablettiermischungen ebenfalls 2% Magnesiumstearat zugesetzt. Es wird die gleiche Rezeptur verwendet wie bei der Tablettierung der Kompaktate (Tab. 9-10). Die Mischungen werden mit Hilfe eines Turbula-Mischers T2C (Fa. Bachofen) hergestellt.

Tablettierung

Die fertigen Mischungen werden zu Oblong-Tabletten (20 x 8 mm) verpresst. Die Presskraft wird auf etwa 15 kN eingestellt.

9.6.8 Bestimmung der Bruchfestigkeit von Tabletten

Die Bruchfestigkeitsbestimmung der Tabletten erfolgt nach Ph. Eur. 2002 (2.9.8) mit einem Bruchfestigkeitstester Tablet Tester 6D (Fa. Schleuniger Pharmatron). Dabei werden von jeder Charge 10 Tabletten untersucht und Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient bestimmt.

9.6.9 Bestimmung der Zerfallszeit von Tabletten

Die Bestimmung der Zerfallszeit der Tabletten erfolgt nach Ph. Eur. 2002 (2.9.1) mit einem Zerfallstester PTZ 1 (Fa. Pharmatest). Als Zerfallsmedium wird Wasser (36-38 °C) verwendet. Von jeder Charge werden jeweils 6 Tabletten ohne Verwendung einer Scheibe untersucht. Als Zerfallszeit wird die Zeit angegeben, in der die letzte Tablette vollständig zerfallen ist.

9.6.10 Coating der Extrakt- und Kompaktat-Tabletten

Die Tabletten werden in einem Edelstahl-Drageierkessel (15 l), in dem in regelmäßigen Abständen Mitnehmer eingeklebt sind, mit einer Hydroxypropylcellulose-Suspension überzogen (Tab. 9-11). Es werden 1,5 kg Kerne eingesetzt. Wird diese Menge durch die Extrakttabletten nicht erreicht, wird mit Placebokernen auf 1,5 kg aufgefüllt. Die Suspension wird für 3 Stunden in einer Kugelmühle (Fa. Erweka) gemahlen und bei einem Sprühdruk von 1,2 bar mit einer Zweistoffdüse (Durchmesser 1,2 mm, Fa. Schlick) auf die Kerne aufgetragen. Die Umdrehungsgeschwindigkeit der Schlauchpumpe 505 S (Fa. Watson-Marlow) wird auf 15 U/min eingestellt. Die Temperatur des Trocknungsluftstroms beträgt 40 °C. Nach dem Coating werden die Filmtabletten für 2 Stunden bei 30 °C im Umlufttrockenschrank (Fa. Memmert) getrocknet.

Tab. 9-11 Rezeptur der Coating-Suspension (für 1,5 kg Kerne)

<i>Substanz</i>	<i>Menge in g</i>
Hydroxypropylcellulose (Klucel LF Pharm)	22,7
Titandioxid	5,3
Polyethylenglykol (Macrogol 6000)	5,7
Talkum	32,0
Pigmentfarbstoff	1,0
Ethanol (96%)	350,0
Gesamtmenge	416,1

9.6.11 Stabilitätsuntersuchungen von Filmtabletten

Die Filmtabletten werden bei 21 °C und 45% r.F. bzw. 26 °C und 60% r.F., gelagert (Grimm 1985). Diese Werte entsprechen den Klimazonen „gemäßigt“ und „subtropisch“. Drei bis sechs Tabletten werden in Exsikkatoren gelagert, die in Trockenschränken (Fa. Memmert) temperiert werden. Die relativen Feuchten von 45% bzw. 60% werden mit gesättigten Lösungen von Kaliumcarbonat und Ammoniumnitrat eingestellt. Nach verschiedenen Zeitintervallen werden die Tabletten ausgelagert und mit Hilfe einer Analysenwaage auf Gewichtszunahme und mit einer Mikrometerschraube (Fa. Mitutoyo) auf Höhenzunahme untersucht. Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten werden bestimmt.

KAPITEL 10

ZUSAMMENFASSUNG

Die Pflanze *Eschscholtzia californica* Cham. (Kalifornischer Goldmohn) stellt trotz der Jahrhunderte langen Anwendung von daraus hergestellten Auszügen bei kalifornischen Ureinwohnern eine relativ neue Heilpflanze auf dem Gebiet der rationalen Phytotherapie dar. Obwohl die Kommission E des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) eine therapeutische Anwendung des kalifornischen Goldmohns zur Schlafförderung und anderen Indikationsgebieten nicht befürwortet und Material über den Einsatz von Arzneizubereitungen aus *Eschscholtzia californica* Cham. in klinischen Studien an Patienten bislang fehlt, kann eine anxiolytische, sedative und analgetische Wirksamkeit der Extrakte des kalifornischen Goldmohns aus einigen pharmakologischen Daten und aus Tierversuchen abgeleitet werden.

Als hauptverantwortlich für diese Wirkungen wird die mit etwa 4% in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. vorkommende Gruppe der Alkaloide angesehen. Hier kommt vor allem dem Californidin als Hauptalkaloid eine besondere Rolle zu. Daneben ist die Gruppe der Flavonoide und hierbei vor allem das Rutin in Trockenextrakten dieser Papaveraceen-Art quantifiziert worden. Weitere Bestandteile, die immerhin über 90% der Gesamtmenge im Extrakt ausmachen, sind möglicherweise nicht für dessen Wirksamkeit verantwortlich, können aber einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe ausüben und dadurch die Wirkungen einer Extraktzubereitung entscheidend verändern. Viel wichtiger jedoch können die Probleme der Beeinflussung physikalisch-chemischer Eigenschaften sowie deren Auswirkungen auf die technologische Verarbeitbarkeit durch wechselnde Mengen dieser indifferenten Begleitstoffe in den Extrakten werden. So zeigen Pflanzenextrakte sehr häufig Klebetendenzen an Tablettierwerkzeugen und daraus hergestellte Tabletten neigen zum Deckeln oder quellen bei Lagerung unter feuchten Bedingungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist zum einen, die Bestimmung und Quantifizierung von Inhaltsstoffgruppen, die für die starken und sehr unterschiedlichen hygroskopischen Eigenschaften der Trockenextraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. und die daraus resultierende schlechte Verarbeitbarkeit verantwortlich sind und zum anderen die Anwendung galenischer Verfahren, die das technologische Verhalten der verschiedenen Trockenextraktchargen erkennen lassen und zu verbessern imstande sind. Es wird eine Charakterisierung von Begleitstoffen in fünf Chargen eines Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. durchgeführt. Die Ergebnisse werden mit Extraktzubereitungen anderer Pflanzen verglichen, um letztendlich eine Korrelation der unterschiedlichen Inhaltsstoffmuster einzelner Extraktchargen mit dem technologischen Verhalten bei der Herstellung und Lagerung von extrakthaltigen Filmtabletten aufzustellen.

Die Gehaltsbestimmung von **Pektinen und Gerbstoffen** in verschiedenen Extraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. ergibt vergleichbare und sehr niedrige Werte, die das unterschiedliche hygroskopische Verhalten nicht erklären. Interessanter sind die Ergebnisse der **Kaliumbestimmung**. Die Anteile dieses Kations in den einzelnen Extraktchargen liegen zwischen 9% und 13%. Da bei pflanzlichen Trockenextrakten insgesamt von einer ausgeglichenen Ladungsverteilung ausgegangen werden muss, lassen die hohen Kaliumgehalte auf das Vorliegen größerer Mengen an negativ geladenen Gegenionen (organische Säuren) schließen.

Kohlenhydrate stellen ubiquitäre Inhaltsstoffe in pflanzlichen Trockenextrakten dar und werden mit Hilfe einer Anionenaustauschchromatographie-Methode (HPAEC) quantifiziert. Die Trennmethode nutzt die schwach sauren Eigenschaften der verschiedenen Zucker für eine Auftrennung der einzelnen Substanzen mit verdünnter Natronlauge als mobile Phase bei einem pH-Wert von etwa 13. Die Quantifizierung wird mit Hilfe einer gepulsten amperometrischen Detektionsmethode (PAD) durchgeführt, die sehr niedrige Nachweisgrenzen mit sich bringt. Auf Grund der komplexen Extraktmatrix ist eine Probenaufarbeitung erforderlich. Hierzu wird eine dreistufige Festphasenextraktion entwickelt, die die Zucker von den meisten anderen Pflanzeninhaltsstoffen abzutrennen vermag. Diese Methode der Probenvorbereitung wird hinsichtlich der

Wiederfindungsrate optimiert. In allen Chargen des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. und in den Extrakten der meisten anderen Pflanzen werden Glucose, Fructose und Saccharose als Inhaltsstoffe gefunden. Die einzelnen Extraktchargen unterscheiden sich jedoch deutlich in der quantitativen Zusammensetzung dieser Mono- und Disaccharide. So variiert der Gesamtzuckergehalt in den verschiedenen Chargen des *Eschscholtzia californica* Cham.-Trockenextraktes von 3% bis zu sehr hohen Gehalten von 13%, wobei Fructose mit einem Gehalt von 2% - 6% den größten Anteil ausmacht. Extraktzubereitungen anderer Pflanzen weisen vergleichbare oder höhere Zuckergehalte auf. So fällt vor allem der hohe Saccharosegehalt (etwa 20%) in Extrakten von *Valeriana officinalis* auf. Da diese Extrakte im Gegensatz zu den Trockenextrakten aus *Eschscholtzia californica* Cham. keine oder nur relativ geringe Probleme bei ihrer Verarbeitung aufweisen, kann der Zuckergehalt allein nicht die Erklärung für die Unterschiede der Pflanzenextrakte liefern. Eine saure Hydrolyse der Zucker schließt das Vorhandensein von Oligo- oder Polysacchariden in größeren Mengen aus.

Die Gruppe der **organischen Pflanzensäuren** wird mit zwei unterschiedlichen chromatographischen Methoden bestimmt. Mit einer Anionenausschlusschromatographie-Methode (IEC) werden die organischen Säuren auf einer Kationenaustauschsäule getrennt und mit Hilfe des universellen Detektionsprinzips der Lichtstreuung (ELSD) bestimmt. Hier kommt der Optimierung der Festphasenextraktionsmethode zur Probenaufarbeitung ebenfalls eine wesentliche Bedeutung zu. Bei den verschiedenen Chargen des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. werden Zitronen- und Äpfelsäure mit einem Gesamtgehalt von 6-8% quantifiziert, wobei auch hier die Gehalte anderer Pflanzenextrakte in einem vergleichbaren Bereich liegen. In den Trockenextrakten einiger anderer Pflanzen (*Vitis vinifera*, *Melissa officinalis*) werden neben den beiden genannten Substanzen mit Hilfe dieser Methode noch größere Anteile an Weinsäure gefunden. Der mit Hilfe dieser Methode gefundene Gehalt an organischen Säuren in den Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. reicht nicht aus, um die sehr hohen Kaliumgehalte zu erklären.

Einen bedeutenden Nachteil der oben aufgeführten Detektionsmethode mit Hilfe der Lichtstreuung stellt die Verdampfung von leichtflüchtigen Analyten bei den gegeb-

nen Bedingungen dar. Aus diesem Grund werden einige organische Säuren der Bestimmung entzogen. Abhilfe soll hier eine zweite Bestimmungsmethode der organischen Säuren in pflanzlichen Trockenextrakten schaffen.

Mit Hilfe einer gaschromatographischen (GC) Trennmethode nach vorgeschalteter Silylierung der Proben werden in Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham., neben den bereits quantifizierten organischen Säuren, 19 weitere saure und zum Teil neutrale Inhaltsstoffe getrennt und mit einem massenspektrometrischen Detektor (MS) identifiziert. Sofern Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen, wird der Gehalt der identifizierten Säuren halbquantitativ abgeschätzt. Es fällt hierbei vor allem der sehr hohe Anteil von etwa 12% **Glycerinsäure** im Eschscholtzia-Extrakt ECC 606 auf. Während in anderen Chargen nur etwa die Hälfte dieser Menge vorliegt, kommt Glycerinsäure in den Extrakten anderer Pflanzen entweder nur in sehr geringen Mengen vor, oder ist darin nicht nachweisbar. Der Glycerinsäuregehalt stellt somit einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. sowie anderer Pflanzen dar.

Da sich nicht nur die chemische Zusammensetzung einer Mischung im unterschiedlichen hygroskopischen und technologischen Verhalten einer Substanz widerspiegelt, sondern mit Sicherheit auch das physikalisch-chemische Vorliegen der Inhaltsstoffe hierbei eine Rolle spielt, werden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die entsprechende Unterschiede bei den einzelnen Trockenextraktzubereitungen herausstellen sollen.

Die **dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)** zweier Trockenextraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften hinsichtlich der Verarbeitung zeigt keinerlei Unterschiede in deren Verhalten während der thermanalytischen Untersuchung. Beide Kurven zeigen Glasübergänge, die auf amorphe Anteile der Inhaltsstoffe hindeuten. Dieses Ergebnis wird durch eine **röntgendiffraktometrische Bestimmungsmethode** der Extrakte weitgehend bestätigt. Während die meisten Extraktchargen ein durchgängig diffuses Beugungsmuster zeigen, das auf große Anteile amorpher Inhaltsstoffe schließen lässt, lassen sich beim Extrakt ECC 604 von *Eschscholtzia californica* Cham. scharfe Peaks erkennen, die auf kristalline Anteile

le hindeuten und die sich bei Lagerung unter feuchten Bedingungen vergrößern. Diese Beobachtungen reichen jedoch nicht aus, um auftretende Unterschiede bei der Verarbeitbarkeit der einzelnen Chargen zu erklären.

Die Bestimmung der **dynamischen Wasserdampfsorption (DVS)** pflanzlicher Trockenextrakte erfolgt mit einer vollautomatischen temperatur- und feuchtekontrollierten Apparatur. Es lässt sich bei der Untersuchung der Extraktchargen von *Eschscholtzia californica* Cham. eine gewisse Korrelation zwischen den in den Proben verbleibenden Restwassergehalten und den mit Hilfe der HPAEC-PAD-Methode gefundenen Gesamtzuckergehalten aufstellen. Dies lässt zumindest auf eine Mitbeteiligung der Kohlenhydrate bei der Ausbildung hygroskopischer Eigenschaften von Trockenextrakten schließen. Insgesamt können jedoch die Ergebnisse der Wasserdampfsorptionsuntersuchungen keine Erklärung für das Platzen der Filmtabletten aus Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. liefern, da auch andere Extrakte ein vergleichbares Verhalten hinsichtlich der Wasserdampfsorption zeigen, die daraus hergestellten Filmtabletten jedoch keine oder nur eine geringe Platzneigung besitzen.

Die pulvertechnologischen Eigenschaften der Ausgangsextrakte haben sich für eine Direkttablettierung als unzureichend erwiesen. Aus diesem Grund wird eine Trockengranulierung der Extrakte durch **Walzenkompaktierung** mit einem kraft- und spaltkontrolliertem Laborkompaktor GMP Mini-Pactor durchgeführt. Während des Prozesses der Walzenkompaktierung treten deutliche Unterschiede im Kompaktierverhalten zwischen einzelnen Chargen des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. auf. Hierbei stellt die Extraktcharge ECC 606 ein sehr schlecht zu verarbeitendes Material dar, da sie bei höheren Drücken zwischen den beiden Walzen zu plastischem Fließen neigt, was mit dem hohen Gehalt an Glycerinsäure, bzw. Kaliumglycerat, zusammenhängt. Eine Kompaktierung dieser Extraktcharge ist nur bei niedrigen Kompaktierdrücken möglich.

Es zeigt sich, dass sich durch den Prozess der Kompaktierung sowohl die pulvertechnologischen Eigenschaften der Extrakte, wie z.B. deren Fließfähigkeit, als auch deren Verarbeitbarkeit auf einer Rundlauftablettenpresse und die Qualität der hergestellten Tabletten deutlich verbessern lassen. So weisen kompaktathaltige Tabletten eine deut-

lich verminderte Zerfallszeit auf und zeigen im Gegensatz zu den Extrakttabletten eine signifikant verringerte Deckelneigung beim Tablettierprozess.

Die Kompaktierung pflanzlicher Trockenextrakte stellt eine praktikable Granulationsmethode dar, da durch dieses Verfahren Unterschiede in der Tablettierbarkeit einzelner Extraktchargen zwar nicht gänzlich aufgehoben, jedoch weitgehend ausgeglichen werden können. Des weiteren zeigen Filmtabletten aus kompaktathaltigen Mischungen eine verbesserte Stabilität bei feuchten Bedingungen im Vergleich zu direkttablettierten Extraktfilmtabletten. Ein Platzen der Filmhülle lässt sich zwar nicht ganz vermeiden, wird aber durch eine vorherige Kompaktierung der Extrakte von *Eschscholtzia californica* Cham. zurückgedrängt. Dies ist mit einer Verminderung der freien Extraktoberfläche in den Filmtabletten und somit einer geringeren Wasserdampfsorption erklärbar.

Ionenaustauschversuche mit Extrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. und die nachfolgenden Stabilitätsuntersuchungen von Filmtabletten aus von Anionen und Kationen befreiten Extrakten zeigen deutlich den negativen Einfluss, den die organischen Säuren, und hier vor allem die Glycerinsäure, auf das stark hygroskopische Verhalten der Extrakte ausüben. Bei Extraktcharge ECC 606 wird dies besonders deutlich. Während Filmtabletten aus von Anionen befreitem Extrakt nur eine geringe Gewichts- und Höhenzunahme und in Folge dessen eine stark verminderte Platzneigung aufweisen, steigt die Hygroskopizität der Extraktzubereitung durch Entfernung der Kationen stark an. Diese Beobachtung lässt sich mit dem hohen Anteil an Glycerinsäure, bzw. Kaliumglycerat, in Charge ECC 606 des Trockenextraktes von *Eschscholtzia californica* Cham. erklären. Bei Kaliumglycerat handelt es sich um einen sehr hygroskopischen Stoff. Durch Behandlung mit einem Anionenaustauschermaterial wird dem Extrakt diese Substanz und damit das hygroskopische Prinzip weitgehend entzogen, was einen positiven Einfluss auf die Stabilität besitzt. Werden allerdings Kationen aus dem Extrakt entfernt, so kommt es zur vermehrten Freisetzung der freien Säure aus dem Kaliumsalz und damit zu einer signifikanten Erhöhung der Hygroskopizität und zu einer wesentlichen Verschlechterung der Extrakteigenschaften.

Damit wird deutlich, dass sich bei technologischen Problemstellungen, die sich bei der Verarbeitung pflanzlicher Trockenextrakte zu Filmtabletten ergeben können, neben

der galenischen Optimierung der Rezepturbestandteile oder Verfahrensschritte eine Analyse der Inhaltsstoffe der Extraktzubereitungen lohnt. Bei den untersuchten Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. kann für die starken hygroskopischen Eigenschaften und die daraus resultierenden technologischen Probleme bei der Verarbeitung vor allem der überraschend hohe Anteil an Glycerinsäure, bzw. Kaliumglycerat, verantwortlich gemacht werden. Diese Substanz ist jedoch sicherlich nicht isoliert zu betrachten, da auch Zucker einen gewissen Anteil an der unterschiedlichen Hygroskopizität ausmachen, was durch die Korrelation mit den Wasserdampfsorptionsuntersuchungen gezeigt werden kann.

Die vorliegende Arbeit soll keine Optimierung einer Rezeptur für pflanzliche Extraktfilmtabletten aus Trockenextrakten von *Eschscholtzia californica* Cham. darstellen, sondern versucht, Unterschiede zwischen einzelnen Extraktchargen und modifizierten Extrakten und ihre technologischen Konsequenzen aufzuzeigen. Galenisch könnte durch eine Änderung der Rezeptur eine Verminderung der Platzneigung der Extraktfilmtabletten erreicht werden. Hierbei könnte der Einsatz eines Filmbildners mit einer geringeren Wasserdampfdurchlässigkeit sowie eines Sprengmittels mit einer geringeren Quellneigung einen positiven Einfluss auf die Stabilität der Filmtabletten ausüben. Des weiteren ist auf die Auswahl der Verpackungsmaterialien bei diesen sehr feuchtempfindlichen Substanzen ein besonderes Augenmerk zu legen.

KAPITEL 11

LITERATURVERZEICHNIS

Arnaud, P.; Brossard, 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)

Banerji, A. und Murti, V. V. S.

"Some difficultly hydrolyzable flavonoid O-glycosides"
Bull. Natl. Inst. Sci. India **31**, 86-90 (1965)

Bate-Smith, E. C.

"Phytochemistry of proanthocyanidins"
Phytochemistry **14**, 1107-1113 (1975)

Bauer, H.

"Herstellung und Charakterisierung von Kombinationen aus Mannit und Sorbit durch Sprühtrocknung und Co-Granulation"
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen (2000)

Beck, M.-A.

*"Alkaloide und Flavonoide aus Eschscholtzia californica Cham.: Isolierung, Struktur-
aufklärung und Radiorezeptorassays"*
Dissertation, Phillips-Universität, Marburg (1999)

Beck, M.-A. und Häberlein, H.

"A new flavonol 3-O-glycoside from Eschscholtzia californica"
Planta Med. **65**, 296 (1999)

Benthin, B.; Danz, H. und Hamburger, M.

"Pressurized liquid extraction of medicinal plants"
J. Chromatogr. A **837**, 211-219 (1999)

Bergren, M. S.

"An automated controlled atmosphere microbalance for the measurement of moisture sorption"

Int. J. Pharm. **103**, 103-114 (1994)

Beyer, C.

"Polymorphie und Röntgendiffraktometrie"

In: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Band: 2

Nürnberg, E. und Surmann, P. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, 76-84 (1991)

Beyer, C. und Maasz, J.

"Röntgendiffraktometrie in der Pharmazie"

Pharm. Unserer Zeit **16**, 12-29 (1987)

Blom, H. J.; Andersson, H. C.; Krasnewich, D. M. und Gahl, W. A.

"Pulsed amperometric detection of carbohydrates in lysosomal storage disease fibroblasts: A new screening technique for carbohydrate storage diseases"

J. Chromatogr. **533**, 11-21 (1990)

Bocek, B. R.

"Ethnobotany of Costanoan Indians, California based on collections by John P. Harrington"

Econ. Bot. **38**, 240-255 (1984)

Bögge, S. C.

"Hydroxymzimtsäureverbindungen in Papaveraceae und Fumariaceae"

Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, 106-119 (1996)

Boujet, C.; Drouet, C.; Decoux, G. und Favier, A.

"Étude de l'extraction des acides organiques urinaires – Étape préalable à leur séparation en chromatographie en phase gazeuse"

J. Chromatogr. **228**, 67-74 (1982)

Bundesanzeiger der Kommission E beim Bundesgesundheitsamt

"Bundesanzeiger Nr. 178 vom 21.09.1991" (1991)

Cammenga, H. K. und Zielasko, B.

"Glasses of sugars and sugar substitutes"

Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem. **100**, 1607-1609 (1996)

Cohn, R.; Heilig, H. und Delorimier, A.

"Critical evaluation of the compactor"

J. Pharm. Sci. **55**, 328-331 (1966)

Coxon, D. T.; Holmes, A.; Ollis, W. D.; Vora, V. C.; Grant, M. S. und Tee, J. L.

"Flavonol digallates in green tea leaf"

Tetrahedron **28**, 2819-2826 (1972)

DeRuiter, G. A.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J. und Rombouts, F. M.

"Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods"

Anal. Biochem. **207**, 176-185 (1992)

Deuel, H. und Stutz, E.

"Pectic substances and pectic enzymes"

Adv. Enzymol. **20**, 341-382 (1958)

Diaz, L. M.; Cal, S.; Souto, S.; Concheiro, A.; Gomez-Amoza, J. L. und Martinez-Pacheco, R.

"Eudragit RS as major excipient in controlled release tablets for plant dry extracts"

Pharmazie **52**, 466-470 (1997)

DIN 53916

"Bestimmung der Rieselfähigkeit von Pulvern und Granulaten - Verfahren nach Pfrengle"

Dionex

"Size exclusion chromatography of polysaccharides with pulsed amperometric detection"

Dionex Application Note 83 (1992)

Dionex

"Analysis of carbohydrates by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)"

Dionex Technical Note 20 (1993)

Dische, Z.

"A new specific color reaction of hexuronic acids"

J. Biol. Chem. **167**, 189-198 (1947)

Dreux, M.; Lafosse, M. und Morin-Allory, L.

"The evaporative light scattering detector - a universal instrument for non-volatile solutes in LC and SFC"

LC-GC **22**, 148-156 (1996)

Eder, M. und Mehnert, W.

"Bedeutung pflanzlicher Begleitstoffe in Extrakten"

Pharmazie **53**, 285-293 (1998)

Eder, M. und Mehnert, W.

"Pflanzliche Begleitstoffe - wertvolle Hilfsstoffe oder überflüssiger Ballast?"

Pharm. Unserer Zeit **29** (6), 377-384 (2000)

Elbicki, J. M. und Tardos, G. I.

"The influence of fines on the flowability of alumina powders in test hoppers"

Powder Handl. Process. **2**, 147-148 (1998)

Englmaier, P.

"Trimethylsilyl-Ester pflanzlicher Säuren und ihre Anwendung in der Gaschromatographie - Darstellung, Kinetik der Silylierung und Einflüsse verschiedener Lösungsmittel auf Ausbeute und Stabilität der Derivate"

J. Chromatogr. **194**, 33-42 (1980)

European Pharmacopoeia

"Uniformity of mass of single-dose preparations"

In: European Pharmacopoeia 4,

Council of Europe, Strasbourg, 199-200 (2002)

European Pharmacopoeia

"Resistance to crushing of tablets"

European Pharmacopoeia 4,
Council of Europe, Strasbourg, 201 (2002)

European Pharmacopoeia

"Disintegration of tablets and capsules"

In: Supplement 4.2. of European Pharmacopoeia 4,
Council of Europe, Strasbourg, 2637-2638 (2002)

European Pharmacopoeia

"Apparent volume"

European Pharmacopoeia 4,
Council of Europe, Strasbourg, 207-208 (2002)

Evershed, R. P.

"Advances in silylation"

In: Handbook of derivatives for chromatography,
Blau, K. und Halket, J. (Hrsg.), John Wiley and Sons Ltd., Chichester, 52-100 (1993)

Fabre, N.; Claparols, C.; Richelme, S.; Angelin, M.-L.; Fourasté, I. und Moulis, C.

"Direct characterization of isoquinoline alkaloids in a crude plant extract by ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: Example of Eschscholtzia californica"

J. Chromatogr. A **904**, 35-46 (2000)

Falzone, A. M.; Peck, G. E. und McCabe, G. P.

"Effects of changes in roller compactor parameters on granulations produced by compaction"

Drug Dev. Ind. Pharm. **18**, 469-489 (1992)

Funakoshi, Y.; Asogawa, T. und Satake, E.

"The use of a novel roller compactor with a concavo-convex roller pair to obtain uniform compacting pressure"

Drug Dev. Ind. Pharm. **6**, 555-573 (1977)

Gaedcke, F. und Steinhoff, B.

"Phytopharmaka"

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1-66 (2000)

Gao, D. und Rytting, J. H.

"Use of solution calorimetry to determine the extent of crystallinity of drugs and excipients"

Int. J. Pharm. **151**, 183-192 (1997)

Grimm, W.

"Stability testing of drug products"

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1985)

Gupta, V. N.; Manavalan, R. und Atal, C. K.

"Superiority of microcrystalline cellulose (MC) over other diluents in formulation of Allium Cepa (Var. red multipliers) hygroscopic extract into capsules and tablets"

Ind. Drugs **18**, 198-200 (1981)

Haber, P. A. und Hendrix, B. M.

"The effect of varying hydrogen ion concentrations upon the stability of heated fructose solutions"

Texas Rep. Biol. Med. **6**, 108-116 (1948)

Hancock, B. C. und Dalton, C. R.

"The effect of temperature on water vapor sorption by some amorphous pharmaceutical sugars"

Pharm. Dev. Technol. **4**, 125-131 (1999)

Hancock, B. C. und Shamblin, S. L.

"Water vapour sorption by pharmaceutical sugars"

PSTT **1**, 345-351 (1998)

Hardy, M. R.; Townsend, R. R. und Lee, Y. C.

"Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection"

Anal. Biochem. **170**, 54-62 (1988)

Harlow, G. A. und Morman, D. H.

"Automatic ion exclusion - partition chromatography of acids"

Anal. Chem. **36**, 2438-2442 (1964)

Harnischfeger, G. und Stumpf, H.

"Phytopharmaka"

In: Pharmazeutische Technologie,

Sucker, H.; Fuchs, P. und Speiser, P. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 436-453 (1991)

Hashidoko, Y.

"The phytochemistry of Rosa rugosa"

Phytochemistry **43**, 535-549 (1996)

Hermann, W.

"Das Verdichten von Pulvern zwischen zwei Walzen"

Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr., 9-16 (1973)

Herzog, R.

"Calciumphosphate in der Tablettierung"

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen (1991)

Höfler, F.; Ezzell, J. und Richter, B.

"Beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE)"

LaborPraxis **19**, 65-67 (1995)

Höfler, F.; Neufang, R.; Raffelsberger, B. und Stähler, O.

"Beschleunigte Lösemittlextraktion in der pharmazeutischen Analytik"

LaborPraxis **23**, 52-54 (1999)

Hogan, S. E. und Buckton, G.

"The application of near infrared spectroscopy and dynamic vapor sorption to quantify low amorphous contents of crystalline lactose"

Pharm. Res. **18**, 112-116 (2001)

Hughes, S. und Johnson, D. C.

"High performance liquid chromatographic separation with triple-pulse amperometric detection of carbohydrates in beverages"

J. Agric. Food Chem. **30**, 712-714 (1982)

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)

Iuliano, T. A.

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

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

Jain, L.; Tripathi, M. und Pandey, V. B.

"Alkaloids of Eschscholtzia californica"

Planta Med. **62**, 188 (1996)

Jain, L.; Tripathi, M.; Pandey, V. B. und Rucker, G.

"Flavonoids from Eschscholtzia californica"

Phytochemistry **41**, 661-662 (1996)

Jellum, E.

"Profiling of human body fluids in healthy and diseased states using gas chromatography and mass spectrometry, with special reference to organic acids"

J. Chromatogr. **143**, 427-462 (1977)

Johanson, J. R.

"Roll press feed systems"

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

Johnson, D. C. und LaCourse, W. R.

"Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes"

Anal. Chem. **62**, 586A-596A (1990)

- Johnson, D. C.; Dobberpuhl, D.; Roberts, R. und Vandenberg, P.
"Pulsed amperometric detection of carbohydrates, amines and sulfur species in ion chromatography - the current state of research"
J. Chromatogr. **640**, 79-96 (1993)
- Katovich, E. J. S.; Becker, R. L.; Sheaffer, C. C. und Halgerson, J. L.
"Seasonal fluctuations of carbohydrate levels in roots and crowns of purple loosestrife (Lythrum salicaria)"
Weed Sci. **46**, 540-544 (1998)
- Kertesz, Z. I.
"The pectic substances"
Interscience Publishers Inc., New York, 1-42 (1951)
- Keymer, R.
"Tabletten aus Trockenextrakten"
Pharm. Ind. **31**, 721-724 (1969)
- Kibbey, C. E.
"Quantitation of combinatorial libraries of small organic molecules by normal-phase HPLC with evaporative light-scattering detection"
Mol. Diversity **1**, 247-258 (1995)
- Kleber, E.; Schneider, W.; Schäfer, H.-L. und Elstner, E. F.
"Modulation of key reactions of the catecholamine metabolism by extracts from Eschscholtzia californica and Corydalis cava"
Arzneim.-Forsch. / Drug Res. **45**, 127-131 (1995)
- Kohler, M.; Haerdi, W.; Christen, P. und Veuthey, J.-L.
"The evaporative light scattering detector: Some applications in pharmaceutical analysis"
Trends Anal. Chem. **16**, 475-484 (1997)
- Kontny, M. J.
"Water sorption of drugs and dosage forms"
In: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Band: 16
Swarbrick, J. und Boylan, J. C. (Hrsg.), Marcel Dekker, Inc., New York, 307-333 (1988)

Kreis, W.

"Eschscholzia"

In: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Band: 5

Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H. und Schneider, G. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 110-115 (1993)

LaCourse, W. R.

"Pulsed electrochemical detection in high-performance liquid chromatography"

John Wiley & Sons, Inc., New York, 1-199 (1997)

Lafosse, M.; Elfakir, C.; Morin-Allory, L. und Dreux, M.

"The advantages of evaporative light scattering detection in pharmaceutical analysis by high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography"

J. High Resol. Chromatogr. **15**, 312-318 (1992)

Lang, F. und Wilhelm, E.

"Quantitative determination of proanthocyanidins in Ginkgo biloba special extracts"

Pharmazie **51**, 734-737 (1996)

Lee, Y. C.

"High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis"

Anal. Biochem. **189**, 151-162 (1990)

Lenfeld, J.; Kroutil, M.; Marsalek, E.; Slavik, J.; Preininger, V. und Simanek, V.

"Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from Chelidonium majus"

Planta Med. **43**, 161-165 (1981)

Levoguer, C. L. und Williams, D. R.

"The characterisation of pharmaceutical materials by dynamic vapour sorption"

Application-Note Porotec 101 (1999)

Lindenblatt, H.; Krämer, E.; Holzmann-Erens, P.; Gouzoulis-Mayfrank, E. und Kovar, K.-A.

"Quantitation of psilocin in human plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection: comparison of liquid-liquid extraction with automated on-line solid-phase extraction"

J. Chromatogr. B **709**, 255-236 (1998)

List, P. H.; Schmid, W. und Weil, E.

"Reinsubstanz oder galenische Zubereitung?"

Arzneim.-Forsch. **19**, 181-185 (1969)

Maasz, J. und Beyer, C.

"Quantitative Auswertung von Röntgendiffraktogrammen"

Pharm. Ind. **49**, 385-393 (1987)

Mamer, O. A.; Crawhall, J. C. und San Tjoa, S.

"The identification of urinary acids by coupled gas chromatography-mass spectrometry"

Clin. Chim. Acta **32**, 171-184 (1971)

Maoka, T.; Fujiwara, Y.; Hashimoto, K.; Takeda, S.; Takaragaki, S. und Ida, K.

"A new retro-carotenoid from the petals of the californian yellow poppy Eschscholtzia californica"

J. Nat. Prod. **63**, 1288-1289 (2000)

Mardens, Y.; Kumps, A.; Planchon, C. und Wurth, C.

"Comparison of two extraction procedures for urinary organic acids prior to gas chromatography-mass spectrometry"

J. Chromatogr. **577**, 341-346 (1992)

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

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

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

Matissek, R.

"Lebensmittelanalytik"

Springer-Verlag, Berlin, 114-163 (1992)

McComb, E. A. und McCready, R. M.

"Colorimetric determination of pectic substances"

Anal. Chem. **24**, 1630-1632 (1952)

Merfort, I.

"Untersuchungen zur Flavonoidführung der Gattung Arnica unter besonderer Berücksichtigung der arzneilich verwendeten Arnicablüten"

Habilitationsschrift, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 235-237 (1990)

Merkel, D. und Jungk, A.

"Die gaschromatographische Bestimmung nichtflüchtiger Carbonsäuren in Pflanzensubstanz."

Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd. **134**, 1-9 (1973)

Miller, D. J. und Hawthorne, S. B.

"Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water"

Anal. Chem. **70**, 1618-1621 (1998)

Miller, R. W.

"Advances in pharmaceutical roller compactor feed system 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, 99-150 (1997)

Mourey, T. H. und Oppenheimer, L. E.

"Principles of operation of an evaporative light-scattering detector for liquid chromatography"

Anal. Chem. **56**, 2427-2434 (1984)

Murray, M.; Laohavichien, A.; Habib, W. und Sakr, A.

"Effect of process variables on roller-compacted ibuprofen tablets"

Pharm. Ind. **60**, 257-262 (1998)

Naini, V.; Byron, P. R. und Phillips, E. M.

"Physicochemical stability of crystalline sugars and their spray-dried forms: Dependence upon relative humidity and suitability for use in powder inhalers"

Drug Dev. Ind. Pharm. **24**, 895-909 (1998)

Ng, L.-K.; Hupé, M.; Vanier, M. und Moccia, D.

"Characterization of cigar tabaccos by gas chromatographic / mass spectrometric analysis of nonvolatile organic acids: Application to the authentication of cuban cigars"

J. Agric. Food Chem. **49**, 1132-1138 (2001)

Nuhn, P.

"Naturstoffchemie"

S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 163-256 (1997)

Onken, J. und Berger, R. G.

"Der Lichtstreuendetektor (ELSD) in der Lebensmittelanalytik"

Dtsch. Lebensm.-Rundsch. **94**, 287-292 (1998)

Oppenheimer, L. E. und Mourey, T. H.

"Examination of the concentration response of evaporative light-scattering mass detectors"

J. Chromatogr. **323**, 297-304 (1985)

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

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

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

Parrott, E. L.

"Densification of powders by concavo-convex roller compactor"

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

Plaizier-Vercammen, J. A. und Bruwier, C.

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

S.T.P. Pharma **17**, 525-530 (1986)

Reimeier, C.; Schneider, I.; Schneider, W.; Schäfer, H.-L. und Elstner, E. F.

"Effects of ethanolic extracts from Eschscholtzia californica and Corydalis cava on dimerisation and oxidation of enkephalins"

Arzneim.-Forsch. / Drug Res. **45**, 132-136 (1995)

Rey, J.-P.; Levesque, J.; Pousset, J.-L. und Roblot, F.

"Analytical and quantitative studies of californin and protopin in aerial part extracts of Eschscholtzia californica Cham. with high-performance liquid chromatography"

J. Chromatogr. **587**, 314-317 (1991)

Richter, B. E.; Jones, B. A.; Ezzell, J. L.; Porter, N. L.; Avdalovic, N. und Pohl, C.

"Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation"

Anal. Chem. **68**, 1033-1039 (1996)

Roberts, A.

"The design of an automatic system for the gravimetric measurement of water sorption"

J. Therm. Anal. Calorim. **55**, 389-396 (1999)

Rocksloh, K.

"Rezepturoptimierung von Johanniskraut-Drageekernen unter Einbeziehung neuronaler Netze"

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

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

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

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

Rolland, A.

"Etude pharmacologique et contribution a l'etude botanique et chimique d'Eschscholtzia californica Cham."

Dissertation, Université de Metz, 355-391 (1988)

Rolland, A.; Fleurentin, J.; Lanhers, M.-C.; Younos, C.; Misslin, R.; Mortier, F. und Pelt, J. M.

"Behavioural effects of the American traditional plant Eschscholtzia californica: Sedative and anxiolytic properties"

Planta Med. **57**, 212-216 (1991)

Roos, Y.

"Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates"

Carbohydr. Res. **238**, 39-48 (1993)

Rumpf, H.

"Die Wissenschaft des Agglomerierens"

Chem.-Ing.-Tech. **46**, 1-11 (1974)

Saleki-Gerhardt, A.; Ahlneck, C. und Zografu, G.

"Assessment of disorder in crystalline solids"

Int. J. Pharm. **101**, 237-247 (1994)

Schäfer, H. L.; Schäfer, H.; Schneider, W. und Elstner, E. F.

"Sedative action of extract combinations of Eschscholtzia californica and Corydalis cava"

Arzneim.-Forsch. / Drug Res. **45**, 124-126 (1995)

Schmidt, P. C.

"Standardisierung"

Dtsch. Apoth. Ztg. **137**, 315-321 (1997)

Schmidt, P. C. und Brögmann, B.

"Brausetabletten - Welche Säurekomponenten sind die geeignetsten?"

Dtsch. Apoth. Ztg. **127**, 991-997 (1987)

Schulz, V. und Hänsel, R.

"Rationale Phytotherapie - Ratgeber für die ärztliche Praxis"

Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1-27 (1999)

Schwabe, U.

"Bewertung von Arzneimitteln"

In: Arzneiverordnungsreport 1998

Schwabe, U. und Paffrath, D. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 579-615 (1999)

Shaw, P. E.

"Handbook of sugar separations in foods by HPLC"

CRC Press, Inc., Boca Raton, 24-156 (1988)

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

"Dry granulation with a roller compactor. Part I: The functional units and operation modes"

Pharm. Technol. Eur. **12** (11), 24-35 (2000)

Shygarova, L. V.; Minina, S. A.; Efimova, L. S. und Chigicov, D. V.

"Film-coated tablets of ginseng extract: Effect of some properties on tablet quality"

Pharm. Sci. **3**, 435-437 (1997)

Souquet, J.-M.; Cheynier, V.; Brossaud, F. und Moutounet, M.

"Polymeric proanthocyanidins from grape skins"

Phytochemistry **43**, 509-512 (1996)

Stahl-Biskup, E.

"Melissa"

In: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Band: 5

Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H. und Schneider, G. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, 811-821 (1993)

Stolyhwo, A.; Colin, H.; Martin, M. und Guiochon, G.

"Study of the qualitative and quantitative properties of the light-scattering detector"

J. Chromatogr. **288**, 253-275 (1984)

Stutz, E. und Deuel, H.

"Über die Bildung von 5-Formylbrenzschleimsäure aus D-Galakturonsäure"

Helv. Chim. Acta **39**, 2126-2130 (1956)

Suh, J. W.; Lee, S. H. und Chung, B. C.

"GC-MS determination of organic acids with solvent extraction after cation-exchange chromatography"

Clin. Chem. **12**, 2256-2261 (1997)

Swallow, K. W. und Low, N. H.

"Analysis and quantification of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography"

J. Agric. Food Chem. **38**, 1828-1832 (1990)

Te Booy, M. P. W. M.; de Ruiter, R. A. und de Meere, A. L. J.

"Evaluation of the physical stability of freeze-dried sucrose-containing formulations by differential scanning calorimetry"

Pharm. Res. **9**, 109-114 (1992)

Teng, C. D.; Zarrintan, M. H. und Groves, M. J.

"Water vapor adsorption and desorption isotherms of biologically active proteins"

Pharm. Res. **8**, 191-195 (1991)

Teoh, H. M.; Schmidt, S. J.; Day, G. A. und Faller, J. F.

"Investigation of cornmeal components using dynamic vapor sorption and differential scanning calorimetry"

J. Food Sci. **66**, 434-440 (2001)

Thompson, J. A. und Markey, S. P.

"Quantitative metabolic profiling of urinary organic acids by gas chromatography - mass spectrometry: Comparison of isolation methods"

Anal. Chem. **47**, 1313-1321 (1975)

Tomè, F.; Colombo, M. L. und Caldiroli, L.

"A comparative investigation on alkaloid composition in different populations of Eschscholtzia californica Cham."

Phytochem. Anal. **10**, 264-267 (1999)

Towle, A. G. und Christensen, O.

"Pectin"

In: Industrial gums - polysaccharides and their derivatives

Whistler, R. L. und BeMiller, J. N. (Hrsg.), Academic Press, New York London, 429-461 (1973)

Trappe, W.

"Die Trennung von biologischen Fettstoffen aus ihren natürlichen Gemischen durch Anwendung von Adsorptionssäulen. I. Mitteilung: Die eluotrope Reihe der Lösungsmittel"

Biochem. Z. **305**, 150-161 (1940)

Tyler, V. E.

"Importance of European phytomedicinals in the American market: An overview"

In: *Phytomedicines of Europe*

Lawson, L. D. und Bauer, R. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, 2-12 (1998)

Vincieri, F. F.; Celli, S.; Mulinacci, N. und Speroni, E.

"An approach to the study of the biological activity of Eschscholtzia californica Cham."

Pharm. Res. Commun. **20** (Suppl. V), 41-44 (1988)

von Czetsch-Lindenwald, H.

"Über den Umgang mit hygroskopischen Substanzen"

Pharm. Ind. **30**, 623-626 (1968)

von der Heydt, H.

"Isolierung, Charakterisierung und Quantifizierung von Flavonoiden und Alkaloiden aus Trockenextrakten der Eschscholtzia californica Cham."

Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz (1994)

von Eggelkraut-Gottanka, S.

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

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen (2001)

Wadman, S. K.; Duran, M.; Ketting, D.; Bruinvis, L.; De Bree, P. K.; Kamerling, J. P.; Gerwig, G. J.; Vlieganthart, J. F. G.; Przyrembel, H.; Becker, K. und Bremer, H. J.

"D-Glyceric acidemia in a patient with chronic metabolic acidosis"

Clin. Chim. Acta **71**, 477-484 (1976)

Wadsö, L. und Markova, N.

"Comparison of three methods to find the vapor activity of a hydration step"

Eur. J. Pharm. Biopharm. **51**, 77-81 (2001)

Wagner, H.

"Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe"

In: Pharmazeutische Biologie, Band: 2

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 229-235 (1999)

Weber, P. L. und Lunte, S. M.

"Capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection of carbohydrates and glycopeptides"

Electrophor. **17**, 302-309 (1996)

Weiß, J.

"Ionenchromatographie"

VCH-Verlag, Weinheim, 11-431 (1991)

Whistler, R. L. und Smart, C. L.

"Pectic substances"

In: Polysaccharide chemistry

Academic Press Inc. Publishers, New York, 161-197 (1953)

Widiastuti, R. und Haddad, P. R.

"Approaches to gradient elution in ion-exclusion chromatography of carboxylic acids"

J. Chromatogr. **602**, 43-50 (1992)

Yao, S. Z.; Chen, P.; Yang, X. Y.; Fung, Y. S. und Si, S. H.

"Herbal organic acids"

J. Chromatogr. Libr. **60**, 343-370 (1998)

Yu Ip, C. C.; Manam, V.; Hepler, R. und Hennessey Jr., J. P.

"Carbohydrate composition analysis of bacterial polysaccharides: Optimized acid hydrolysis conditions for HPAEC-PAD analysis"

Anal. Biochem. **201**, 343-349 (1992)

KAPITEL 12

ANHANG

12.1 Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der HPAEC-PAD-Bestimmung der Zucker in pflanzlichen Trockenextrakten

12.1.1 Messdaten zur Bestimmung der Linearität der Zucker

Tab. 12-1 Messdaten zur Bestimmung der Linearität von Glucose

<i>Konzentration (mg/l)</i>	<i>Flächeneinheiten</i>			<i>Mittelwert</i>
52,7	1468041	1452154	1489852	1470016
10,54	319564	335514	301255	318778
5,27	163071	184511	145662	164415
1,054	31274	32565	33174	32338
0,527	16455	16688	16274	16472
0,1054	2795	3098	2913	2935
0,0527	1479	1587	1733	1600
Steigung		25736,40		
Achsenabschnitt		18474,59		
Korrelationskoeffizient		0,99981		

Tab. 12-2 Messdaten zur Bestimmung der Linearität von Fructose

<i>Konzentration (mg/l)</i>	<i>Flächeneinheiten</i>			<i>Mittelwert</i>
70,2	1004451	1241551	1116329	1120777
14,04	244854	245789	243156	244600
7,02	124741	135154	119845	126580
1,404	24689	24614	25978	25094
0,702	11666	9878	10997	10847
Steigung		13643,52		
Achsenabschnitt		31048,9		
Korrelationskoeffizient		0,9998		

Tab. 12-3 Messdaten zur Bestimmung der Linearität von Saccharose

Konzentration (mg/l)	Flächeneinheiten			Mittelwert
67,9	700784	715401	721177	712454
13,58	149745	150710	152697	151051
6,79	75478	78487	73644	75870
1,358	14327	15845	13221	14464
0,679	7951	7562	7352	7622
Steigung	9716,07			
Achsenabschnitt	10354,7			
Korrelationskoeffizient	0,99992			

12.1.2 Messdaten zur Bestimmung der Präzision der Zucker

Tab. 12-4 Messdaten zur Bestimmung der Präzision von Glucose

<i>Systempräzision (aufbereitete Extraktzubereitung von ECC 614)</i>			
Flächeneinheiten			
1614901	1598814		1562090
1628919	1570303		1597513
Mittelwert		1597513	
Standardabweichung		26240	
Variationskoeffizient (%)		1,64	
<i>Methodenpräzision (6 Aufarbeitungen der Extraktzubereitung ECC 604)</i>			
Glucosegehalt (%)			
0,16	0,17		0,14
0,10	0,15		0,15
Mittelwert (%)		0,15	
Standardabweichung (%)		0,0243	
Variationskoeffizient (%)		16,75	
<i>Intermediate precision (Extraktzubereitung ECC 306)</i>			
Glucosegehalt (% , Bearbeiter 1)		Glucosegehalt (% , Bearbeiter 2)	
	1,369		1,454
	1,371		1,355
	1,386		1,394
	1,383		1,400

	1,398	1,395
	1,413	1,442
Gesamtmittelwert (%)		1,397
Vertrauensbereich (p=0,95) (%)		1,381-1,413
Variationskoeffizient für Systempräzision (%)		1,46
Variationskoeffizient für Methodenpräzision (%)		1,88
Variationskoeffizient für Präzision (%)		2,06

Tab. 12-5 Messdaten zur Bestimmung der Präzision von Fructose

<i>Systempräzision (aufbereitete Extraktzubereitung von ECC 614)</i>		
Flächeneinheiten		
	1559985	1531420
	1561256	1555966
Mittelwert		1549769
Standardabweichung		11992
Variationskoeffizient (%)		0,77
<i>Methodenpräzision (6 Aufarbeitungen der Extraktzubereitung ECC 604)</i>		
Fructosegehalt (%)		
	1,83	1,82
	1,91	1,83
Mittelwert (%)		1,85
Standardabweichung (%)		0,0326
Variationskoeffizient (%)		1,77
<i>Intermediate precision (Extraktzubereitung ECC 306)</i>		
Fructosegehalt (% , Bearbeiter 1)	Fructosegehalt (% , Bearbeiter 2)	
	3,495	3,758
	3,475	3,634
	3,508	3,572
	3,490	3,590
	3,493	3,578
	3,522	3,538
Gesamtmittelwert (%)		3,554
Vertrauensbereich (p=0,95) (%)		3,508-3,600
Variationskoeffizient für Systempräzision (%)		0,25

Variationskoeffizient für Methodenpräzision (%)	1,31
Variationskoeffizient für Präzision (%)	2,26

Tab. 12-6 Messdaten zur Bestimmung der Präzision von Saccharose

<i>Systempräzision (aufbereitete Extraktzubereitung von ECC 614)</i>		
Flächeneinheiten		
948888	929581	906641
955759	915953	941027
Mittelwert	932975	
Standardabweichung	19141	
Variationskoeffizient (%)	2,05	
<i>Methodenpräzision (6 Aufarbeitungen der Extraktzubereitung ECC 604)</i>		
Saccharosegehalt (%)		
0,85	0,76	0,71
0,88	0,80	0,86
Mittelwert (%)	0,81	
Standardabweichung (%)	0,06573	
Variationskoeffizient (%)	8,11	
<i>Intermediate precision (Extraktzubereitung ECC 306)</i>		
Saccharosegehalt (% , Bearbeiter 1)	Saccharosegehalt (% , Bearbeiter 2)	
2,978	3,326	
2,940	3,331	
3,124	3,234	
2,923	3,177	
2,909	3,068	
2,884	3,009	
Gesamtmittelwert (%)	3,075	
Vertrauensbereich (p=0,95) (%)	2,984-3,166	
Variationskoeffizient für Systempräzision (%)	0,57	
Variationskoeffizient für Methodenpräzision (%)	3,54	
Variationskoeffizient für Präzision (%)	5,24	

12.1.3 Messdaten zur Bestimmung der Wiederfindungsraten der Zucker

Tab. 12-7 Wiederfindungsraten (%) von Glucose bei Zusatz von 50, 100 und 150% Reinsubstanz zu zwei verschiedenen Extrakten

<i>Bestimmung mit Extrakt aus Eschscholtzia californica Cham. ECC 606</i>					
Zusatz von etwa 50% Glucose					
104,2	101,1	102,3	99,9	98,4	103,6
	Mittelwert			101,5	
Zusatz von etwa 100% Glucose					
102,7	103,0	101,6	98,0	104,7	99,3
	Mittelwert			101,5	
Zusatz von etwa 150% Glucose					
103,1	103,5	100,6	103,2	97,2	99,3
	Mittelwert			101,2	
<i>Bestimmung mit Extrakt aus Vitis vinifera WL 98220027</i>					
Zusatz von etwa 50% Glucose					
102,1	102,6	100,9	101,9	101,9	102,2
	Mittelwert			101,9	
Zusatz von etwa 100% Glucose					
98,1	99,0	96,4	100,3	102,3	97,1
	Mittelwert			98,9	
Zusatz von etwa 150% Glucose					
100,2	101,7	99,8	98,0	101,1	99,7
	Mittelwert			100,1	
Gesamtmittelwert (%)				100,9	
Standardabweichung (%)				1,134	
Variationskoeffizient (%)				1,124	

Tab. 12-8 Wiederfindungsraten (%) von Fructose bei Zusatz von 50, 100 und 150% Reinsubstanz zu zwei verschiedenen Extrakten

<i>Bestimmung mit Extrakt aus Eschscholtzia californica Cham. ECC 606</i>					
Zusatz von etwa 50% Fructose					
98,8	98,7	95,0	98,2	97,9	97,9
	Mittelwert			97,8	
Zusatz von etwa 100% Fructose					
98,8	97,4	97,4	97,2	99,6	96,8
	Mittelwert			97,9	
Zusatz von etwa 150% Fructose					
96,3	99,9	98,3	98,1	96,6	97,1
	Mittelwert			97,7	
<i>Bestimmung mit Extrakt aus Vitis vinifera WL 98220027</i>					
Zusatz von etwa 50% Fructose					
97,1	98,4	103,9	101,2	99,6	101,6
	Mittelwert			100,3	
Zusatz von etwa 100% Fructose					
99,6	102,0	103,0	96,2	100,1	102,0
	Mittelwert			100,5	
Zusatz von etwa 150% Fructose					
99,0	99,6	98,0	97,0	99,4	99,6
	Mittelwert			98,8	
Gesamtmittelwert (%)				98,8	
Standardabweichung (%)				1,277	
Variationskoeffizient (%)				1,293	

Tab. 12-9 Wiederfindungsraten (%) von Saccharose bei Zusatz von 50, 100 und 150% Reinsubstanz zu zwei verschiedenen Extrakten

<i>Bestimmung mit Extrakt aus Eschscholtzia californica Cham. ECC 606</i>					
Zusatz von etwa 50% Saccharose					
98,1	96,1	98,6	98,5	99,2	96,2
	Mittelwert			97,8	
Zusatz von etwa 100% Saccharose					

99,0	98,2	97,5	99,0	96,5	99,0
	Mittelwert			98,2	
	Zusatz von etwa 150% Saccharose				
98,5	98,7	98,2	95,5	98,4	95,6
	Mittelwert			97,5	
<i>Bestimmung mit Extrakt aus Vitis vinifera WL 98220027</i>					
	Zusatz von etwa 50% Saccharose				
98,1	97,5	94,0	97,8	97,5	99,3
	Mittelwert			97,4	
	Zusatz von etwa 100% Saccharose				
96,7	96,3	95,8	98,4	93,3	101,1
	Mittelwert			96,9	
	Zusatz von etwa 150% Saccharose				
95,9	95,9	97,3	94,5	98,3	92,6
	Mittelwert			95,8	
	Gesamtmittelwert (%)			97,3	
	Standardabweichung (%)			0,838	
	Variationskoeffizient (%)			0,861	

12.1.4 Messdaten zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen der Zucker

Tab. 12-10 Messdaten zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze von Glucose

Konzentration (mg/l)	Flächeneinheiten			Mittelwert	VK (%)
3,743	99935	100415	98578	99643	0,96
0,749	19998	21051	19790	20280	3,33
0,1497	3997	4085	3574	3885	7,03
0,02995	799	1086	890	925	15,80
0,00599	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bestimmungsgrenze (mg/l)	0,1497				

Tab. 12-11 Messdaten zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze von Fructose

Konzentration (mg/l)	Flächeneinheiten			Mittelwert	VK (%)
4,7327	81110	81341	81654	81368	0,34

0,9465	16221	17545	15889	16552	5,29
0,1893	3248	3688	3154	3363	8,48
0,03786	649	947	1095	867	25,32
0,00757	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bestimmungsgrenze (mg/l)					
0,1893					

Tab. 12-12 Messdaten zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze von Saccharose

<i>Konzentration (mg/l)</i>	<i>Flächeneinheiten</i>			<i>Mittelwert</i>	<i>VK (%)</i>
3,9808	41406	40098	40211	40572	1,79
0,7962	8289	9652	9415	9119	7,99
0,1592	1656	1545	1798	1666	7,61
0,03185	331	1022	987	780	49,9
0,00637	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bestimmungsgrenze (mg/l)					
0,1592					

12.2 Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der IEC-ELSD-Methode zur Quantifizierung der organischen Säuren in pflanzlichen Trockenextrakten

12.2.1 Messdaten zur Bestimmung der Linearität der organischen Säuren

Tab. 12-13 Messdaten zur Bestimmung der Linearität von Citronensäure

<i>Logarithmus der Konzentration</i>	<i>Logarithmus der Flächeneinheiten</i>			<i>Mittelwert</i>
3,7377	12,5132	12,4016	12,4724	12,4624
4,3175	13,3480	13,3226	13,3841	13,3516
4,8283	14,1285	14,1357	14,1261	14,1301
5,2523	14,7452	14,7461	14,7492	14,7468
5,6312	15,2929	15,2929	15,2608	15,2822
6,1159	15,9148	15,9508	15,9395	15,9350
Steigung: 1,464				
Achsenabschnitt: 7,0249				
Korrelationskoeffizient: 0,99945				

Tab. 12-14 Messdaten zur Bestimmung der Linearität von Äpfelsäure

<i>Logarithmus der Konzentration</i>	<i>Logarithmus der Flächeneinheiten</i>			<i>Mittelwert</i>
3,8918	12,2439	12,4646	12,3728	12,3604
4,4188	12,8540	12,8619	12,8405	12,8521
4,8283	13,2399	13,2193	13,2137	13,2243
5,3613	13,6687	13,6959	13,6632	13,6759
5,7494	14,2128	14,1582	14,1914	14,1875
6,1612	14,7905	14,7858	14,7834	14,7866
Steigung: 1,040				
Achsenabschnitt: 8,2413				
Korrelationskoeffizient: 0,99292				

Tab. 12-15 Messdaten zur Bestimmung der Linearität von Weinsäure

<i>Logarithmus der Konzentration</i>	<i>Logarithmus der Flächeneinheiten</i>			<i>Mittelwert</i>
4,1431	13,0125	13,0103	12,9989	13,0072
4,5644	13,5681	13,5709	13,6048	13,5813
4,9200	14,1290	14,1049	14,0718	14,1019
5,3613	14,7347	14,7653	14,7377	14,7459
5,7333	15,3176	15,2912	15,3091	15,3060
6,2265	16,0050	15,9833	15,9901	15,9928
Steigung: 1,443				
Achsenabschnitt: 7,0083				
Korrelationskoeffizient: 0,99981				

12.2.2 Messdaten zur Bestimmung der Präzision der organischen Säuren

Tab. 12-16 Messdaten zur Bestimmung der Präzision von Citronensäure

<i>Systempräzision (aufbereitete Extraktzubereitung von ECC 606)</i>		
Flächeneinheiten		
3234452	3343126	3234709
3297863	3296710	3286871
Mittelwert	3282289	
Standardabweichung	41773	

Variationskoeffizient (%)	1,27	
<i>Systempräzision (aufbereitete Extraktzubereitung von WL 99220827)</i>		
Flächeneinheiten		
1104999	1164127	1143997
1129240	1203757	1238910
Mittelwert	1164172	
Standardabweichung	49561	
Variationskoeffizient (%)	4,26	
<i>Methodenpräzision (6 Aufarbeitungen der Extraktzubereitung WL 99220306)</i>		
Gehalt an Citronensäure (%)		
1,32	1,39	1,31
1,41	1,39	1,41
Mittelwert (%)	1,37	
Standardabweichung (%)	0,0427	
Variationskoeffizient (%)	3,11	

Tab. 12-17 Messdaten zur Bestimmung der Präzision von Äpfelsäure

<i>Systempräzision (aufbereitete Extraktzubereitung von ECC 606)</i>		
Flächeneinheiten		
1216285	1183801	1166086
1251974	1200967	1254909
Mittelwert	1212337	
Standardabweichung	36005	
Variationskoeffizient (%)	2,97	
<i>Systempräzision (aufbereitete Extraktzubereitung von WL 99220827)</i>		
Flächeneinheiten		
1648434	1778193	1742246
1768959	1805733	1759186
Mittelwert	1750459	
Standardabweichung	54257	
Variationskoeffizient (%)	3,10	

<i>Methodenpräzision (6 Aufarbeitungen der Extraktzubereitung WL 99220306)</i>		
Gehalt an Äpfelsäure (%)		
6,14	5,93	6,04
6,06	5,97	5,88
Mittelwert (%)	6,00	
Standardabweichung (%)	0,09312	
Variationskoeffizient (%)	1,55	

Tab. 12-18 Messdaten zur Bestimmung der Präzision von Weinsäure

<i>Systempräzision (aufbereitete Extraktzubereitung von WL 99220827)</i>		
Flächeneinheiten		
3156450	3285972	3196554
3291841	3165915	3294567
Mittelwert	3231883	
Standardabweichung	65939	
Variationskoeffizient (%)	2,04	

<i>Methodenpräzision (6 Aufarbeitungen der Extraktzubereitung WL 99220306)</i>		
Gehalt an Weinsäure (%)		
3,11	3,19	3,01
3,06	3,14	3,17
Mittelwert (%)	3,11	
Standardabweichung (%)	0,06854	
Variationskoeffizient (%)	2,20	

12.2.3 Messdaten zur Bestimmung der Wiederfindungsraten der organischen Säuren

Tab. 12-19 Wiederfindungsraten (%) von Citronensäure bei Zusatz von 50, 100 und 150% Reinsubstanz zu einem pflanzlichen Trockenextrakt

<i>Bestimmung mit Extrakt aus Eschscholtzia californica Cham. ECC 606</i>					
Zusatz von etwa 50% Citronensäure					
100,45	105,59	103,34	105,90	101,24	101,35
Mittelwert				102,98	

Zusatz von etwa 100% Citronensäure					
102,10	105,07	101,40	104,11	100,02	98,24
Mittelwert				101,82	
Zusatz von etwa 150% Citronensäure					
104,41	103,86	99,93	100,69	102,51	105,91
Mittelwert				102,87	
Gesamtmittelwert (%)				102,56	
Standardabweichung (%)				2,3102	
Variationskoeffizient (%)				2,254	

Tab. 12-20 Wiederfindungsraten (%) von Äpfelsäure bei Zusatz von 50, 100 und 150% Reinsubstanz zu einem pflanzlichen Trockenextrakt

Bestimmung mit Extrakt aus <i>Eschscholtzia californica</i> Cham. ECC 606					
Zusatz von etwa 50% Äpfelsäure					
98,05	97,38	98,11	103,74	101,94	104,23
Mittelwert				100,57	
Zusatz von etwa 100% Äpfelsäure					
97,12	96,49	96,87	95,28	96,38	96,26
Mittelwert				96,40	
Zusatz von etwa 150% Äpfelsäure					
100,45	98,95	99,58	99,14	100,94	99,41
Mittelwert				99,75	
Gesamtmittelwert (%)				98,91	
Standardabweichung (%)				2,5622	
Variationskoeffizient (%)				2,590	

12.2.4 Messdaten zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen der organischen Säuren

Tab. 12-21 Messdaten zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze von Citronensäure

Konzentration (mg/l)	Flächeneinheiten			Mittelwert	VK (%)
79	693176	720110	697157	703481	2,07
39,5	246374	258082	250695	251717	2,35
19,8	95939	92244	95887	94690	2,24

9,9	36457	44982	40985	40808	10,45
4,9	16858	14639	13200	14899	12,37
Bestimmungsgrenze (mg/l)					
19,8					

Tab. 12-22 Messdaten zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze von Äpfelsäure

<i>Konzentration (mg/l)</i>	<i>Flächeneinheiten</i>			<i>Mittelwert</i>	<i>VK (%)</i>
490	1515614	1527033	1591353	1544667	2,64
245	707469	721613	698298	709127	1,66
122,5	363847	381447	385215	376836	3,03
61,3	198798	211724	211194	207239	3,53
30,6	100446	85829	72215	86163	16,39
Bestimmungsgrenze (mg/l)					
61,3					

Tab. 12-23 Messdaten zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze von Weinsäure

<i>Konzentration (mg/l)</i>	<i>Flächeneinheiten</i>			<i>Mittelwert</i>	<i>VK (%)</i>
214	2470926	2526501	2592694	2530040	2,41
107	928781	923647	899403	917277	1,71
53,5	337086	322622	328585	329431	2,21
26,8	136670	128369	131014	132018	3,21
13,4	53471	57875	43201	51516	14,62
Bestimmungsgrenze (mg/l)					
26,8					

12.3 Firmenverzeichnis

Agilent Technologies GmbH, Herrenberger Str. 130, D-71034 Böblingen
Alltech GmbH, Münchner Str. 14, D-82008 Unterhaching
W. A. Bachofen Maschinenfabrik, Utengasse 15/17, CH-4002 Basel
BASF AG, Carl-Bosch-Str. 38, D-68056 Ludwigshafen
Bärlocher GmbH, Riesstr. 16, D-80992 München
Bayer AG, Werk Leverkusen, D-51368 Leverkusen
Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstr. 164, D-80939 München
Birkenweg Pharmazeutische Fabrik GmbH, Birkenweg 3, D-63801 Kleinostheim
Boehringer Ingelheim KG, Binger Str. 173, D-55216 Ingelheim/Rhein
Bruker AXS GmbH, Östliche Rheinbrückenstr. 50, D-76187 Karlsruhe
Büchi Labortechnik GmbH, Postfach 10 02 12, D-78402 Konstanz
Degussa-Hüls AG, Postfach 11 05 33, D-60314 Frankfurt/Main
Dionex GmbH, Am Wörtzgarten 10, D-65510 Idstein
Engelsmann AG, Frankenthaler Str. 137-141, D-67059 Ludwigshafen
Erweka GmbH, Ottostr. 20-22, D-63150 Heusenstamm
H. Finzelberg's Nachf. GmbH & Co. KG, Postfach 13 62, D-56603 Andernach
Fisher Scientific GmbH, Im heiligen Feld 17, D-58239 Schwerte
Fluka Chemie AG, Industriestr. 25, CH-9470 Buchs
Gerteis Maschinen + Processengineering AG, Stampfstr. 74, CH-8645 Jona
Greiner Bio-One GmbH, Bad Haller Str. 32, A-4550 Kremsmünster
Heraeus Instruments GmbH, Postfach 15 61, D-63450 Hanau
Hercules GmbH, Paul-Thomas-Str. 56/58, D-40599 Düsseldorf
Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Im Tiefen See 45, D-64293 Darmstadt
Hüls AG, Paul-Baumann-Str. 1, D-45772 Marl
BWI Hüttlin GmbH, Daimlerstr. 7, D-79585 Steinen
Indena, Via Ripamonti 99, I-20141 Milano
Institut Fresenius GmbH, Postfach 12 61, D-65220 Taunusstein
Janke und Kunkel, Postfach 12 63, D-79217 Staufen
J. T. Baker, H.-S.-Richardson-Str. 1, D-64521 Groß-Gerau
Kilian & Co. GmbH, Emdener Str. 10, D-50735 Köln
Knauer GmbH; Hegauer Weg 38, D-14163 Berlin
Korsch Pressen AG, Breitenbachstr. 1, D-13509 Berlin

Kronos Titan-GmbH & Co. OHG, Postfach 10 07 20, D-51307 Leverkusen
Lehmann & Voss & Co., Postfach 30 34 24, D-20311 Hamburg
Leybold-Heraeus GmbH, Bonner Str. 498, D-50968 Köln
Macherey & Nagel, Neumann-Neander-Str. 6-8, D-52355 Düren
Malvern Instruments GmbH, Rigipsstr. 19, D-71083 Herrenberg
Memmert GmbH & Co. KG, Postfach 12 20, D-91126 Schwabach
Merck Hitachi AG, Ruchligstr. 20, CH-8953 Dietikon
Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, D-64271 Darmstadt
Messer Griesheim GmbH, Fütingsweg 34, D-47805 Krefeld
Mettler Toledo GmbH, Ockerweg 3, D-35396 Gießen
Microsoft GmbH, Edisonstr. 1, D-85716 Unterschleißheim
Millipore GmbH, Hauptstr. 87, D-65760 Eschborn
Mitutoyo Messgeräte GmbH, Borsigstr. 8-10, D-41469 Neuss
Müggenburg Extrakt GmbH, Immenhacken 3, D-24558 Henstedt-Ulzburg
Norwegian Talc Deutschland GmbH, Rückmühlenweg 1,
D-63628 Bad Soden-Salmünster
Nubiosa, Reichenastr. 81, D-78467 Konstanz
Otto GmbH, Am Ettenbach 6, D-72379 Hechingen
Perkin-Elmer GmbH, Postfach 10 11, D-88662 Überlingen
Pharmatest Apparatebau, Postfach 11 50, D-63512 Hainburg
Pharmaton SA, P. O. Box, CH-6903 Lugano
Riedel-de Haen AG, Wunsdorfer Str. 40, D-30918 Seelze
Sartorius AG, Weender Landstr. 94-108, D-37075 Göttingen
Schleicher & Schuell GmbH, Hahnestr. 3, D-37586 Dassel
Dr. K. Schleuniger, Schöngrünstr. 27, CH-4501 Solothurn
Düsen-Schlick GmbH, Hutstr. 4, D-96253 Untersiemau/Coburg
Sedere, Parc Volta B.P. 27, Rue Parmentier 9, F-94141 Alfortville
Separtis GmbH, Basler Str. 29, D-79639 Grenzach-Wyhlen
Siemens AG, Wittelsbacher Platz 2, D-80333 München
Sigma GmbH, Grünwalderweg 30, D-8041 Deisenhofen
Südzucker AG, Maximilianstr. 10, D-68165 Mannheim
Surface Measurement Systems Ltd., 3 Warple Mews, UK-London
Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., 6-15-9 Toshima, J-Tokyo
Varian GmbH, Alsfelderstr. 6, D-64289 Darmstadt

VCH Verlagsgesellschaft, Boschstr. 12, D-69469 Weinheim

VDS Optilab Chromatographietechnik GmbH, Graf-von-Zeppelin-Str. 5,
D-56410 Montabaur

Waters GmbH, Hauptstr. 87, D-65760 Eschborn

Watson-Marlow Ltd., Falmouth, TR 11 4RU, UK-Cornwall

WTB Binder Labortechnik GmbH, In der Steubach 9, D-57614 Woldert

Klaus Ziemer GmbH, Am Parir 27, D-52379 Langerwehe

Zymark GmbH, Eisenstr. 92, D-65428 Rüsselsheim

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Ammon, Bechtold, Beyer, Drews, Gauglitz, Grabmayr, Gündisch, Häfelinger, Hanack, Heide, Kovar, Lindner, Mechler, Müller, Pommer, Reinhard, Roth, Safayhi, Schmidt, Schultz, Steinhilber, Strähle, Wahl, Wankmüller, Zimmermann

LEBENS LAUF

19. August 1973	geboren in Urach (jetzt Bad Urach), erstes Kind von Rolf und Sonja Schiller (geb. Röcker)
1979-1983	Grundschule (Grund- und Hauptschule Hülben)
1983-1992	Graf-Eberhard-Gymnasium Bad Urach
1992	Abschluss mit der „Allgemeinen Hochschulreife“
1992-1993	Zivildienst beim „Mobilen sozialen Hilfsdienst“ der Körperbehindertenförderung (KBF) in Bad Urach
Oktober 1993-Oktober 1997	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
September 1995	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1997	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 1997-April 1998	Praktikum in der Waldachapotheke in Waldachtal-Salzstetten
Mai 1998-Oktober 1998	Praktikum bei der Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Dezember 1998	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dezember 1998	Approbation zum Apotheker
seit Januar 1999	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Beginn der Dissertation „Analytik und technologische Optimierung von Filmtabletten mit Extrakten von <i>Eschscholtzia californica</i> Cham.“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt
Februar 2002	Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie