
**Optimierung und Validierung
dünn-schicht-chromatographischer Verfahren in der
Qualitätsanalytik von Phytopharmaka**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Kathrin Koll

aus

Rheine

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Erster Referent: Dr. habil Markus Veit
Zweiter Referent: Prof. Dr. Eckhard Leistner
Dritter Referent: Prof. Dr. Beat Meier

Tag der Promotion:

Rolf

Gegen das aber, was man im Überfluss hat,
wird man gleichgültig; daher kommt es auch,
dass viele hundert Pflanzen und Kräuter
für wertlose Unkräuter gehalten
und mit den Füßen zertreten werden,
anstatt dass man sie betrachtet,
bewundert und gebraucht.

Pfarrer Sebastian Kneipp

Danksagungen

Die Unterstützung und wissenschaftlichen Anregungen von Herrn Dr. habil Markus Veit, Herrn Dr. Eike Reich und den Kooperationspartnern, Kollegen und Freunden haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herzlich danke ich daher:

Meinem Doktorvater und Mentor, Herrn Dr. habil Markus Veit. Er brachte mir großes Vertrauen entgegen und gab mir stets Freiraum für selbständiges und eigenverantwortliches Arbeiten. Unsere kritisch und konstruktiv geführten Diskussionen und Auseinandersetzungen haben diese Arbeit immer wieder vorangetrieben. Er schärfte meine Sicht für das Leben innerhalb und außerhalb der Wissenschaft und trug dazu bei, dass ich mich während meiner Promotionszeit sowohl wissenschaftlich als auch menschlich positiv entwickelte.

Meinem Co-Betreuer, Herrn Dr. Eike Reich, der als leidenschaftlicher DC-Spezialist lange fachliche Diskussionen mit mir führte. Vor allem während meines Forschungsaufenthalts bei der Firma Camag in der Schweiz war er trotz seiner knapp bemessenen Zeit immer zur Stelle, wenn fachlicher Rat notwendig war. Seine humorvolle Art und seine aufmunternden Anmerkungen ließen mich in so mancher wissenschaftlichen Krise das Lachen nicht vergessen. Seinem Einsatz verdanke ich die maßgebliche finanzielle Unterstützung der Firma Camag und die Bereitstellung modernster Geräte zur Durchführung der DC.

Frau Dr. Frauke Gaedcke und Herrn Christoph Schlicht, die mich während meines Forschungsaufenthalts bei der Firma Finzelberg GmbH & Co.KG betreut haben. Aufgrund des großen Engagements von Frau Dr. Gaedcke für meine Promotionsarbeit übernahm die Firma Finzelberg einen beträchtlichen Teil der Finanzierung. Herr Schlicht vermittelte mir die Grundkenntnisse der DC. Er war ein geduldiger Lehrer für mich und half mir stets, alle DC-Probleme optimal zu lösen.

Herrn Professor Dr. Eckhard Leistner für die spontane Bereitschaft, die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen und für die freundliche Aufnahme an der Universität Bonn als externe Doktorandin.

Herrn Professor Dr. Beat Meier für die Bereitschaft, das dritte Gutachten dieser Arbeit anzufertigen. Da Herr Dr. Meier ein Experte auf dem Gebiet der Qualitätsanalytik von Phytopharmaka ist, schätze ich seine Meinung sehr.

Den Firmen Agon Pharma GmbH, Biologische Heilmittel Heel, Bionorica AG, Camag, DHU Arzneimittel GmbH & Co.KG, Dr. Kolkmann & Partner GmbH Pharmaberatung und Laborservice, Finzelberg GmbH & Co.KG, Glaxo Smithkline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, Hevert GmbH & Co.KG, Klosterfrau GmbH & Co., Merck KG aA, Pharma Wernigerode GmbH, Rhone-Poulenc Rorer GmbH, Schaper & Brümmer GmbH & Co.KG und Silber Pharma für die finanzielle Unterstützung. Der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e. V. für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Meiner Kollegin Frau Dr. Sabine Wittemer, mit der mich vor allem während der Zeit des Schreibens dieser Arbeit das gemeinsame Suchen nach den richtigen Worten verband. In endlosen Telefonaten tauschten wir Freud und Leid aus und ermunterten uns, alle Hürden der Promotion mit Humor zu nehmen.

Meinen Kollegen im Labor der Firma Camag, Frau Anne Blatter, Frau Helga Rehmert und Herrn Daniel Handloser für die Hilfsbereitschaft während meiner analytischen Arbeiten und für das gute Arbeitsklima. Auch während der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation waren sie stets für mich da, wenn es um fachliche und menschliche Hilfe ging.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern, die immer an meine Fähigkeiten geglaubt und mich liebevoll unterstützt haben. Meinem Onkel, Herrn Bernd Thiekötter, für den Druck der Dissertation.

Meinem lieben Mann Rolf, der während der gesamten Promotionszeit an meiner Seite stand und mich in allen Höhen und Tiefen unterstützt hat. In endlosen Diskussionen über das Für und Wider meiner Promotion, schaffte er es immer wieder, mich darin zu bestärken, dass ich den richtigen Weg gehe.

Inhaltsverzeichnis

1	EINFÜHRUNG	1
1.1	Dünnschichtchromatographie in Richtlinien für die Qualitätsanalytik von Phytopharmaka	3
1.1.1	Validierung dünn-schichtchromatographischer Verfahren.....	5
1.1.2	Dünnschichtchromatographie in der Stabilitätsanalytik von Phytopharmaka.....	7
1.2	Drogen und daraus hergestellte Zubereitungen	7
1.2.1	Bärentraubenblätter (<i>Uvae Ursi Folium</i>).....	8
1.2.2	Weißdornblätter mit Blüten (<i>Crataegi folium cum flore</i>)	9
1.2.3	Traubensilberkerzenwurzelstock (<i>Cimicifugae rhizoma</i>).....	10
1.2.4	Brennnesselblätter (<i>Urticae folium</i>).....	11
1.3	Standardisierte Dünnschichtchromatographie	13
1.3.1	Stationäre Phase	14
1.3.2	Probendosierung und –auftragung.....	15
1.3.3	Fließmittel	17
1.3.4	Chromatogrammentwicklung	20
1.3.5	Derivatisierung.....	21
1.3.6	Dokumentation.....	22
1.4	Zielsetzung	24
2	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Chemikalien.....	25
2.2	Materialien und Geräte	26
2.3	Referenzsubstanzen	29
2.4	Fließmittel (FM)	30

2.5	Derivatisierungsreagenzien	31
2.5.1	Anisaldehyd - Reagenz	31
2.5.2	Dichlorchinonchlorimidlösung	31
2.5.3	Dichlorchinonchlorimid-Reagenz	31
2.5.4	Dichlorchinonchlorimid-Reagenz Ph. Eur.....	31
2.5.5	DMAZA - Reagenz.....	32
2.5.6	Echtblausalzreagenz.....	32
2.5.7	Folins - Reagenz.....	32
2.5.8	Mangan-II-Chlorid-Reagenz.....	32
2.5.9	Naturstoffreagenz	32
2.5.10	NBD-Chlorid Reagenz.....	33
2.5.11	Tetrazolblau-Reagenz.....	33
2.5.12	Vanillinphosphorsäure-Reagenz	33
2.6	Probenaufarbeitung.....	33
2.6.1	Festphasenextraktion zur Trennung der Procyanidine und Flavonoide ..	33
2.7	Fließmitteloptimierung	35
2.8	Vorreinigen der HPTLC - Platten	36
2.9	Probenauftragung.....	36
2.10	Chromatogrammentwicklung	37
2.10.1	Doppeltrogkammer	37
2.10.2	Horizontal-Entwicklungskammer.....	37
2.11	Derivatisierung.....	39
2.12	Dokumentation.....	39
2.13	Semi-quantitative Auswertung	39
2.14	Quantitative Auswertung	40
2.15	Identifizierung und Dokumentation der Platten	40

2.16	Dünnschichtchromatographische Verfahren	41
2.17	Validierung qualitativer Dünnschichtchromatographie (Ein Validierungsplan und zugehörige Qualitätssicherungsdokumente sind im Anhang aufgeführt.).....	51
2.17.1	Selektivität.....	51
2.17.2	Robustheit.....	52
2.17.3	Reproduzierbarkeit.....	56
2.18	Validierung quantitativer Dünnschichtchromatographie	59
2.19	Isolierung von Referenzsubstanzen für die Dünnschichtchromatographie.....	61
2.19.1	Kontrolle der Fraktionen.....	62
2.19.2	Identifizierung der Kaffeoyläpfelsäure mittels NMR, MS und IR.....	64
3	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN DER ARZNEIDROGE “BÄRENTRAUBENBLÄTTER“ UND DAR AUS HERGESTELLTEN ZUBEREITUNGEN	65
3.1	Optimierung	65
3.1.1	Fließmittel	66
3.1.2	Referenzsubstanzen	66
3.1.3	Derivatisierungsreagenzien.....	67
3.1.4	Plattenmaterial	68
3.1.5	Trennstrecke	69
3.1.6	Entwicklungskammer	70
3.1.7	Probenaufarbeitung	71
3.2	Validierung	73
3.2.1	Selektivität.....	73
3.2.2	Robustheit.....	74
3.3	Reproduzierbarkeit	75
3.3.1	Ringversuche	75

3.4	Stabilitätsuntersuchungen.....	76
3.4.1	Stabilität über einen Zeitraum von 24 Monaten unter den Klima- bedingungen 25°C/60 % relative Feuchte.....	76
3.4.2	Stabilität über einen Zeitraum von 12 Monaten unter den Klima- bedingungen 30°C/60 % relative Feuchte.....	77
3.4.3	Stabilität über einen Zeitraum von 6 Monaten unter den Klima- bedingungen 40°C/75 % relative Feuchte.....	78
3.5	Quantitative Hydrochinonbestimmung in Fertigarzneimitteln, die Bärentraubenblätterextrakt enthalten	80
3.5.1	Validierung	80
3.5.1.1	Selektivität	80
3.5.1.2	Kalibrierfunktion und Kalibrierbereich	81
3.5.1.3	Nachweisgrenze	81
3.5.1.4	Linearität.....	82
3.5.1.5	Vergleichspräzision	82
3.5.1.6	Wiederholpräzision	82
3.5.1.7	Richtigkeit.....	82
4	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN DER ARZNEIDROGE “WEIßDORNBLÄTTER MIT BLÜTEN“ UND DARAUSS HERGESTELLTEN ZUBEREITUNGEN	83
4.1	Entwicklung und Optimierung.....	83
4.1.1	Probenaufarbeitung	83
4.1.2	Chromatographie	91
4.1.2.1	Fließmittel	91
4.1.2.2	Derivatisierung.....	93
4.2	Validierung	95
4.2.1	Selektivität.....	95
4.2.2	Robustheit.....	96

4.3	Untersuchungen von acht Fertigarzneimitteln des deutschen Marktes, die Extrakt aus "Weißdornblättern mit Blüten" enthalten.....	97
5	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN DER ARZNEIDROGE "TRAUBENSILBERKERZENWURZELSTOCK" UND DARAUS HERGESTELLTEN ZUBEREITUNGEN	105
5.1	Triterpenglykoside in Traubensilberkerzenwurzelstock	105
5.1.1	Entwicklung und Optimierung	105
5.1.1.1	Fließmittelloptimierung	106
5.1.1.2	Derivatisierung.....	109
5.1.2	Validierung	110
5.1.2.1	Selektivität	110
5.1.2.2	Robustheit	115
5.1.2.3	Reproduzierbarkeit	122
5.2	Stabilitätsuntersuchungen.....	123
5.2.1	Stabilität über einen Zeitraum von 18 Monaten unter den Klimabedingungen 25°C/60 % relative Feuchte.....	124
5.2.2	Stabilität über einen Zeitraum von 12 Monaten unter den Klimabedingungen 30°C/60 % relative Feuchte.....	125
5.2.3	Stabilität über einen Zeitraum von 6 Monaten unter den Klimabedingungen 40°C/75 % relative Feuchte.....	127
5.3	Hydroxymzimtsäurederivate in Traubensilberkerzenwurzelstock.....	129
5.3.1	Nachweis der Isoferulasäure.....	129
5.3.2	Validierung	131
5.3.2.1	Selektivität	131
5.3.2.2	Robustheit und Reproduzierbarkeit	134
6	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN DER ARZNEIDROGE "BRENNNESSELBLÄTTER" UND DARAUS HERGESTELLTEN ZUBEREITUNGEN	135

6.1	Entwicklung und Optimierung	136
6.1.1	Probenvorbereitung	137
6.1.2	Fließmittel	137
6.1.3	Trennstrecke	139
6.2	Validierung	139
6.2.1	Drogenausgangsmaterialien	139
6.2.2	Selektivität.....	140
6.2.3	Chargenkonformität der Droge.....	142
6.2.4	Robustheitsprüfungen	143
6.2.4.1	Stabilität des Analyten	143
6.2.4.2	Stabilität des Fließmittels.....	144
6.2.4.3	Stabilität der Fluoreszenz	145
6.3	Differenzierung der offizinellen Arten <i>Urtica dioica</i> und <i>Urtica urens</i> ...	145
7	DISKUSSION	147
7.1	Methodenentwicklung und –optimierung	148
7.2	Validierung	153
7.3	Stabilitätsuntersuchungen.....	167
7.4	Quantitative Dünnschichtchromatographie	171
8	ZUSAMMENFASSUNG	175
9	LITERATUR	181
10	ANHANG	193
10.1	Untersuchungsmuster.....	193
10.2	Ringversuche	197

10.3	Validierungsprotokoll (quantitative Hydrochinonbestimmung in Fertigarzneimitteln, die Bärentraubenblätterextrakt enthalten).....	200
10.4	Monographien	208
10.5	Identifizierung der Kaffeoyläpfelsäure	247
10.6	Qualitätssicherungsdokumente der virtuellen “Firma Muster“	251
11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	303
12	TABELLENVERZEICHNIS	316
13	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	317

1 Einführung

Der überwiegende Teil der in Europa zugelassenen Phytopharmaka enthält pflanzliche Extrakte als Wirkstoffe, wobei der Extrakt in seiner Gesamtheit als die aktive Substanz angesehen wird. Pflanzliche Arzneimittel (Phytopharmaka) werden als solche bezeichnet, die in ihren arzneilich wirksamen Bestandteilen ausschließlich aus pflanzlichen Zubereitungen, zum Beispiel zerkleinerten Pflanzenteilen, Extrakten, Presssäften oder Destillaten aus Pflanzen bestehen (BfArM 1996).

In den letzten Jahren sind die Anforderungen an die Qualität der Phytopharmaka enorm gestiegen. Zur Sicherung der pharmazeutischen Qualität werden Spezifikationen für Drogen und daraus hergestellte Extrakte respektive Fertigarzneimittel erarbeitet. In einer Spezifikation wird die Charakterisierung von Drogen und daraus hergestellten Zubereitungen festgelegt. Neben mikro- und makroskopischen Untersuchungen werden physikalische, chemische und biologische Prüfungen durchgeführt. Es werden Akzeptanzkriterien festgelegt, innerhalb derer die Ergebnisse der entsprechenden Prüfungen liegen müssen. Spezifikationen sind bindende Qualitätsstandards, die vom Hersteller erstellt werden und von offiziellen Behörden (in Deutschland das Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM) anerkannt werden. Für Phytopharmaka gibt es eine EU-Richtlinie, in der die Erstellung und die Umsetzung der Spezifikationen genau beschrieben ist (Note for Guidance on Specifications CPMP/QWP/2820/00).

Erschwerend für das Festlegen der Spezifikationen ist jedoch, dass oft nicht bekannt ist, welcher der vielfältigen Inhaltsstoffe pflanzlicher Zubereitungen für die Wirksamkeit und auch Unbedenklichkeit verantwortlich sind. Sind die wirksamkeitsbestimmenden oder wirksamkeitsmitbestimmenden Inhaltsstoffe nicht bekannt, wird die Qualitätsanalytik anhand von charakteristischen Leitsubstanzen durchgeführt.

Allgemein gilt: Je weniger über die Wirkung der Inhaltsstoffe bekannt ist, um so mehr müssen quantitative Bestimmungen durch qualitative Prüfungen, wie zum Beispiel Fingerprintchromatogramme in verschiedenen Polaritätsbereichen, ersetzt werden (Gaedcke 2000). Mit Hilfe solcher Fingerprintchromatogramme können die Droge respektive der Extrakt und das daraus hergestellte Fertigarzneimittel in ihrer Gesamtheit analysiert werden.

Der Nachweis der Identität ist die wichtigste Prüfung im Rahmen der Qualitätskontrolle von Drogen. Hierbei reicht der Nachweis von Inhaltsstoffen durch Referenzsubstanzen oder Leitsubstanzen nicht aus. Eine Freigabe kann nur dann erfolgen, wenn der gesamte Fingerprintbereich dem der authentischen Droge entspricht (Gaedcke 2000). Die chromatographischen Verfahren sollten so spezifisch sein, dass Verfälschungen bzw. Verunreinigungen der Droge durch vergleichende Fingerprintanalytik erkannt werden können.

Grundlage für den Qualitätsnachweis sind selektive, spezifische und robuste Analysenmethoden (Gaedcke 2000). Nur durch die Anwendung validierter Methoden ist die Reproduzierbarkeit des Inhaltsstoffspektrums von Drogen bzw. Extrakten im Rahmen der Qualitätskontrolle nachzuweisen.

Während dünnschichtchromatographische Verfahren der Arzneibücher als validiert gelten, müssen alle anderen dünnschichtchromatographischen Verfahren validiert werden. Dies gilt auch für veränderte (optimierte) Arzneibuchverfahren und solche aus anderen Quellen, wie der Monographiesammlung der "American Herbal Pharmacopeia" (AHP), dem indischen Arzneibuch, dem Buch "Plant Drug Analysis" (Wagner und Bladt 1996) oder dem "DC-Atlas-Dünnschichtchromatographie in der Apotheke" (Pachaly 1995).

Im Rahmen der Validierung müssen die Selektivität und die Robustheit nachgewiesen werden; es sollten aber auch Daten zur Reproduzierbarkeit eines Verfahrens vorliegen.

Die standardisierte qualitative Dünnschichtchromatographie (DC) ist ein Verfahren, das für die Qualitätsanalytik der Phytopharmaka besonders geeignet ist, da es viele Vorteile in sich vereint. Mittels dünnschichtchromatographischer Fingerprintchromatogramme kann der Extrakt in seiner Gesamtheit analysiert und charakterisiert werden. Das gesamte Inhaltsstoffspektrum kann erfasst werden. Inhaltsstoffe und Begleitstoffe können visuell identifiziert werden. Im Rahmen der Qualitätskontrolle kann durch den visuellen Vergleich der dünnschichtchromatographischen Fingerprints sichergestellt werden, dass nicht nur die Wirk- und Leitsubstanzen, sondern auch weitere Begleitstoffe in gleichbleibendem Maße vorhanden sind.

Die Analytik der DC hat den Vorteil, dass ohne größeren apparativen Aufwand ein breites Komponentenspektrum erfasst werden kann. Da die einzelnen Schritte der

DC unabhängig voneinander variiert werden können, ist die Methode sehr flexibel. Durch Anwendung unterschiedlicher Fließmittel ist es möglich, ohne großen Zeit- und Kostenaufwand verschiedene Polaritätsbereiche zu analysieren.

Ein weiterer Vorteil der DC ist, dass die Spezifität des Verfahrens durch vielfältig zur Verfügung stehende Detektionsverfahren variiert werden kann, wobei auch die Möglichkeit besteht, Substanzen ohne Chromophore zu erfassen.

1.1 Dünnschichtchromatographie in Richtlinien für die Qualitätsanalytik von Phytopharmaka

Für Phytopharmaka und ihre Ausgangsstoffe gelten in Deutschland die Bestimmungen des Arzneimittelgesetzes (AMG). Die Anforderungen an Phytopharmaka hinsichtlich Wirksamkeit, Unbedenklichkeit und pharmazeutischer Qualität entsprechen denen der Arzneimittel mit chemisch definierten Inhaltsstoffen. In den Arzneimittelprüfrichtlinien sind Art und Umfang der durchzuführenden Prüfungen der Qualitätsanalytik für die Zulassung von Phytopharmaka beschrieben.

Die Beschreibung des Pflanzenmaterials ist in Arzneibüchern, wie zum Beispiel dem Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) in den einzelnen Monographien im Abschnitt "Prüfung auf Identität" aufgeführt. In den Monographien des Europäischen Arzneibuchs wird auf die allgemeine Monographie "Dünnschichtchromatographie" (Ph. Eur., 4.00) verwiesen. In dieser wiederum ist sowohl die qualitative, als auch die quantitative DC beschrieben.

Für die qualitative DC ist das Plattenmaterial (Verweis auf den Reagenzienteil des Ph. Eur. 4.1.1), die Chromatographiekammer, die Auftragung der Proben und die Detektion beschrieben. Als stationäre Phase ist neben der DC-Platte die HPTLC-Platte explizit erwähnt. Gemäß Arzneibuch wird die Entwicklung in der gesättigten Flachboden- bzw. Doppeltrogkammer oder in der vorkonditionierten Horizontal-Entwicklungskammer durchgeführt. Für die Probenauftragung lässt das Arzneibuch alle Geräte zu, mit denen "die Lösungen sachgemäß aufgetragen werden können". Die Untersuchungslösung kann punkt- oder strichförmig aufgetragen werden. Die visuelle Auswertung der Chromatogramme soll über einen Vergleich der "Flecken" im Chromatogramm der Untersuchungslösung und dem Chromatogramm der

Referenzlösung in Bezug auf die Farbe, Größe und Position, definiert über den Retentionsfaktor (R_f), erfolgen. Die in der allgemeinen Monographie festgeschriebenen Rahmenbedingungen können Basis sein für dünn-schichtchromatographische Verfahren, die dem neuesten Stand von Wissenschaft und Technik entsprechen.

Die Richtlinie "Notice to Applicants Volume 2B Part II" schreibt in Teil C die Qualitätskontrolle des Pflanzenmaterials vor und fordert neben mikro- und makroskopischen Prüfungen zusätzliche Untersuchungen, um die Identität der Ausgangsmaterialien sicher zu stellen. In Abschnitt F wird das chromatographische Profil, also der Fingerprint, zur Anwendung im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen genannt.

In der Richtlinie "Note for Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance criteria for Herbal Drug Preparations and Herbal Medicinal Products" (CPMP/QWP 2820/00) ist bereits im allgemeinen Teil erwähnt, dass in Spezifikationen von Drogen und den daraus hergestellten Zubereitungen und Fertig- arzneimitteln chromatographische Fingerprints zur phytochemischen Charakterisierung heran zu ziehen sind. Spezifikationen sollten in Anlehnung an die Monographien des Europäischen Arzneibuches verfasst werden. Die Untersuchungen zur Charakterisierung der Ausgangsmaterialien anhand von Inhaltsstoffen oder Marker Substanzen sollten so sein, dass eine Differenzierung zwischen unterschiedlichen Arten möglich und die Erkennung von Verfälschungen durch diese Prüfungen gewährleistet ist. Neben mikro- und makroskopischen Prüfungen werden für die Identitätsprüfungen chromatographische Verfahren und chemische Reaktionen gefordert.

Der in den USA publizierte Entwurf der Richtlinie "Guidance for Industry – Botanical Drug Products" (FDA 2000a) schreibt im Abschnitt VIII B die Prüfung der Ausgangsmaterialien (Botanical Drug Substances) vor. Im Rahmen der Qualitätskontrolle werden Verfahren gefordert, die eine Identifizierung jeder einzelnen Charge, unter anderem über die Auswertung chromatographischer Fingerprints, ermöglichen. Für die Erstellung der Fingerprints nennt die Richtlinie neben anderen Verfahren ausdrücklich die ein- und die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie.

1.1.1 Validierung dünnschichtchromatographischer Verfahren

Die Richtlinie “Note for Guidance on Quality of Herbal Medicinal Products” (CPMP/QWP 2819/00) schreibt die Validierung in Verbindung mit den EU-Richtlinien “Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology” (ICH 381/95, Q2A 1995) und “Validation of Analytical Procedures Methodology” (ICH 281/95, Q2B 1996) vor. In der ersten ICH - Leitlinie (Q2A) werden einzelne Validierungsparameter aufgelistet (Tabelle 1-1), in der zweiten (Q2B) werden Vorschläge zu deren Umsetzung gemacht. Für die Validierung qualitativer analytischer Verfahren ist gemäß der Leitlinie Q2A nur der Nachweis der Selektivität gefordert. In der Leitlinie Q2B ist die Evaluierung der Robustheit eines Verfahrens im Rahmen der Validierung verankert.

Tabelle 1-1: Validierungsanforderungen nach ICH (Q2A)

Validierungsparameter	Qualitative Bestimmung	Test auf Verunreinigung		Quantitative Bestimmung
		Quantitativ	Grenzwerttest	
Richtigkeit	-	+	-	+
Präzision	-	+	-	+
Selektivität ¹	+	+	+	+
Detektionsgrenze	-	-	+	
Bestimmungsgrenze	-	+	--	
Linearität	-	+	-	+
Arbeitsbereich	-	+	-	+

Für die qualitative DC gibt es bislang nur wenige Ansätze, in denen ein Konzept für die Validierung vorgestellt wird. In den USA veröffentlichte 1998 die “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC) ein Konzept für die Validierung (PVMP, peer verified method program). Es basiert darauf, dass unabhängige Labors die Ergebnisse eines ersten Labors verifizieren. Dieses Validierungskonzept ist jedoch eher auf quantitative Bestimmungen ausgerichtet, als auf qualitative. Eine Validierung gemäß diesen Vorgaben wurde für die qualitative DC in den Labors der

¹ Es wird der Begriff Selektivität statt Spezifität verwendet. In den UPAC Provisional Recommendations “Selectivity in Analytical Chemistry, Draft 27. February 2001” stellt die UPAC die Überlappung beider Begriffe klar durch die Aussage “Specificity is the ultimate of Selectivity”.

Firmen CAMAG und Flachsmann durchgeführt (Reich et al. 2002). Die Validierung ist zeitaufwendig, da die Prüfung der zu validierenden Methode in den unabhängigen Labors erst dann erfolgen kann, wenn sie von dem ersten Labor abschließend bearbeitet ist. Weiterhin setzt diese Art der Validierung voraus, dass es sich um Methoden handelt, die nicht firmenintern sind bzw. dass die beteiligten Labors die Ergebnisse vertraulich behandeln.

Sind diese Voraussetzungen gegeben, so ist es im Rahmen der Überprüfung der Reproduzierbarkeit eines Verfahrens sinnvoll, dass ein Verfahren in mindestens zwei Labors geprüft wird. Der Vergleich der Ergebnisse zeigt dann, ob mit dem Verfahren unabhängig voneinander gleiche Ergebnisse erzielt werden können.

In Deutschland wurde 2001 vom Bundesverband der Arzneimittel - Hersteller e. V. (BAH) ein Handbuch herausgegeben, in dem die Umsetzung der ICH- Leitlinien Q2A und Q2B, bezogen auf die spezifischen Anforderungen in der Qualitätsanalytik von Phytopharmaka, beschrieben ist (Amborn et al. 2001). Das Buch enthält ein Kapitel, in dem die Validierung qualitativer DC näher erläutert ist. Neben Selektivitätsprüfungen werden Prüfungen auf Robustheit und Reproduzierbarkeit beschrieben. Robustheitsprüfungen dünn-schichtchromatographischer Verfahren sind vor allem bei Verfahren, die für Stabilitätsstudien eingesetzt werden sollen, unerlässlich, da das Verfahren als offenes System anfällig gegenüber Einflüssen von außen ist, z. B. Temperatur- und Feuchtigkeitsänderungen oder auch Sauerstoff- und Lichteinfluss.

Ein Konzept für die Validierung quantitativer DC in der Pharmaanalytik wurde 2001 publiziert (Ferenczi-Fodor et al. 2001). Die Anwendung in der Analytik von Phytopharmaka ist jedoch nicht unproblematisch, da Matrixeffekte und unzureichende Trennungen zu berücksichtigen sind.

Es ist wichtig, die Anforderungen der Richtlinien so umzusetzen und zu konkretisieren, dass Validierungsmasterpläne für dünn-schichtchromatographische Verfahren in der Phytoanalytik erstellt werden, die von den einzelnen Labors in ihr Qualitätssicherungssystem eingearbeitet und ohne großen Aufwand an Zeit, Kosten und Personal angewendet werden können.

Solche Validierungspläne für die qualitative DC sind derzeit nicht publiziert.

1.1.2 Dünnschichtchromatographie in der Stabilitätsanalytik von Phytopharmaka

Seit Dezember 2002 ist die Richtlinie "Note for Guidance on Stability Testing: Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products" (CPMP/QWP/122/02) bindend für die Stabilitätskontrolle in der pharmazeutischen Analytik. Es ist zum ersten Mal in einer Richtlinie zur Arzneimittelstabilität explizit erwähnt, dass sie für die Prüfung von Drogen, daraus hergestellten Zubereitungen und Fertigarzneimitteln gilt. In einigen Punkten ist der Besonderheit des Vielstoffgemisches Droge bzw. Extrakt Rechnung getragen worden. So müssen für Drogen und daraus hergestellten Zubereitungen keine Stresstests (z B. der Einfluss von Säuren und Basen auf die Untersuchungssubstanz) durchgeführt werden.

Diese Stabilitätsrichtlinie gilt in Verbindung mit den beiden Richtlinien CPMP/QWP/2819/00 und CPMP/QWP/2820/00.

In der Qualitätsrichtlinie für Phytopharmaka (CPMP/QWP/2819/00) werden Stabilitätsuntersuchungen ausdrücklich gefordert. Es ist nicht ausreichend, die Stabilität der Inhaltsstoffe mit bekannter Wirksamkeit zu zeigen, da der Extrakt in seiner Gesamtheit als Wirksubstanz anzusehen ist. Mittels Fingerprintanalytik soll gezeigt werden, dass alle Inhaltsstoffe eines Extraktes stabil sind, und dass das Mengenverhältnis der einzelnen Komponenten untereinander gleich bleibt.

Das Verfahren Dünnschichtchromatographie ist sehr gut geeignet, diesen Anforderungen gerecht zu werden, weil es mit diesem Verfahren möglich ist, den Extrakt in seiner Gesamtheit darzustellen und die einzelnen Fingerprints über den gesamten Zeitraum der Stabilitätsstudien (bis zu 3 Jahre) visuell miteinander zu vergleichen. Voraussetzung hierfür sind validierte und robuste Verfahren.

1.2 Drogen und daraus hergestellte Zubereitungen

Die in dieser Arbeit entwickelten und optimierten dünnschichtchromatographischen Verfahren sind jeweils für die Identitätsprüfungen der Droge und der daraus hergestellten Extrakte und Fertigarzneimittel anwendbar.

Mittels DC ist es möglich, die Fingerprints von Droge, Extrakt, Fertigarzneimittel und Hilfsstoffmischung parallel auf einer Platte unter gleichen Bedingungen zu analysieren. Durch den visuellen Vergleich der Fingerprints können Veränderungen im Inhaltsstoffmuster sofort erkannt werden.

1.2.1 Bärentraubenblätter (*Uvae Ursi Folium*)

Die Droge (*Uvae ursi folium*) besteht aus den getrockneten Laubblättern von *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. und gehört zu der Familie der Ericaceae.

Die charakteristischen und wirksamkeitsrelevanten Inhaltsstoffe der Bärentraubenblätter sind Phenolglucoside, insbesondere Arbutin, Methyларbutin und das Aglykon Hydrochinon (Hänsel et al. 1999).

Die Droge ist im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur. 4.00), von der ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapie) und in einer Positivmonographie der Kommission E monographiert.

Zubereitungen aus Bärentraubenblättern zeigen antimikrobielle Wirkung (Paper et al. 1993, Siegers et al. 1997). Die Kommission E gibt als Anwendungsgebiete entzündliche Erkrankungen der ableitenden Harnwege an. Gemäß Kommission E sollten arbutinhaltige Arzneimittel ohne ärztlichen Rat nicht länger als jeweils 1 Woche und höchstens 5 mal jährlich eingenommen werden; während Schwangerschaft und Stillzeit sind sie kontraindiziert. Akute Unverträglichkeiten werden auf den hohen Gerbstoffgehalt der Droge zurückgeführt (Hänsel et al. 1999). Der Verdacht der durch Hydrochinon verursachten mutagenen Wirkung konnte in Untersuchungen von humanen Urinproben weder *in vitro* noch *in vivo* nachgewiesen werden (Siegers et al. 1997).

Gemäß der Monographie des Arzneibuches (Ph. Eur. 4.00) wird die Identität der Droge dünnschichtchromatographisch durch den Nachweis der Inhaltsstoffe Arbutin, Gallussäure und Hydrochinon bestimmt.

Strukturformeln einzelner Inhaltsstoffe von Bärentraubenblättern sind im Anhang in der exemplarisch erstellten Monographie "Bärentraubenblätter und daraus hergestellte Zubereitungen" aufgeführt.

1.2.2 Weißdornblätter mit Blüten (*Crataegi folium cum flore*)

Die Droge Weißdornblätter mit Blüten (*Crataegi folium cum flore*) besteht aus den getrockneten, blühenden Zweigspitzen der zugelassenen Stammpflanzen und gehört zur Familie der Rosaceae. Als Stammpflanzen werden *Crataegus monogyna* Jacq. (Lindm.), *C. laevigata* (Poir.) DC., *C. pentagyna* Waldst. Et Kit., *C. nigra* Waldst. Et Kit und *C. azarolus* L. beschrieben.

Die Droge ist im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur., 4.00), von der ESCOP und in einer Positivmonographie der Kommission E monographiert. Das schweizerische Arzneibuch enthält neben der Monographie für die Droge auch eine Monographie für einen eingestellten Weißdornextrakt (*Crataegi extractum siccum normatum*).

Als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe der Droge gelten Flavonoide und Procyanidine. Charakteristisches Flavonoid für *Crataegus*-Arten ist das Flavonglykosid Vitexinrhamnosid und dessen Acetat (Bauer und Hölscher 1992). Procyanidine sind di- bis polymere Flavan-3-ole mit den Diastereoisomeren (-)-Epicatechin und (+)-Catechin als Monomerbausteine. Die Procyanidine unterscheiden sich in ihrer Stereochemie, im Polymerisationsgrad und in der Art der Interflavanverknüpfung voneinander. Definitionsgemäß haben oligomere Procyanidine einen Polymerisierungsgrad von $n = 2$ bis $n = 8$. Alle Procyanidine mit einem höheren Polymerisierungsgrad werden als polymere Procyanidine bezeichnet (Kaul 1996).

Flavonoide und Procyanidine zeigen antioxidative Wirkung (Rice-Evens et al 1997, Terao 1999). An einem Weißdornspezial-Extrakt konnte die positiv-inotrope Wirksamkeit der Procyanidine nachgewiesen werden (Holubarsch et al. 2000). *Crataegus*präparate sind keine spezifischen Arzneimittel zur Behandlung von akuten Krankheiten. Sie gelten in erster Linie als Arzneimittel bei leichteren Formen der Herzinsuffizienz. Für Fertigarzneimittel, die Trockenextrakte aus Weißdornblättern mit Blüten enthalten, gilt nach Kommission E das Anwendungsgebiet "Nachlassende Leistungsfähigkeit des Herzens entsprechend Stadium II nach NYHA" (II: eingeschränkte Leistungsfähigkeit bei schweren körperlichen Belastungen; NYHA: New York Heart Association) als belegt.

Gemäß der Monographie des Arzneibuches (Ph. Eur. 4.00) wird die Identität der Droge unter anderem durch den dünn-schichtchromatographischen Nachweis der Flavonoide belegt. Rutosid, Chlorogensäure und Hyperosid werden als

Referenzsubstanzen verwendet. Daneben sind weitere fluoreszierende Zonen in dem Fingerprint beschrieben. Der Nachweis der Procyanidine wird im Rahmen der Identitätsbestimmung nicht geführt. Da die Procyanidine jedoch wie oben geschrieben als wirksamkeitsmitbestimmende Inhaltsstoffe angesehen werden, sollten sie auch im Rahmen der Identitätsprüfung der Arzneidroge und der daraus hergestellten Zubereitungen und Fertigarzneimittel nachgewiesen werden.

Die Strukturformeln einzelner Procyanidine und anderer Inhaltsstoffe der Droge sind im Anhang in der exemplarisch erstellten Monographie "Weißdornblätter und daraus hergestellte Zubereitungen" aufgeführt.

1.2.3 Traubensilberkerzenwurzelstock (*Cimicifugae rhizoma*)

Die Droge Traubensilberkerzenwurzelstock (*Cimicifugae rhizoma*) besteht aus dem getrockneten, nach der Fruchtreife gesammelten und geschnittenen Rhizom und gehört zu der Familie der Ranunculaceae.

Für diese Droge gibt es eine Positivmonographie der Kommission E und eine Monographie in der Monographiesammlung der American Herbal Pharmacopeia (AHP). In beiden Monographien ist *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. (Syn.: *Actea racemosa* L.) als Stammpflanze zugelassen. *C. racemosa* wird vor allem in Europa, Kanada und USA als drogenliefernde Stammpflanze verwendet. Für die Gattung *Cimicifuga* sind insgesamt 10 bis 18 verschiedene Arten bekannt (Beuscher 1995). Entsprechend der geographischen Verbreitung sind in anderen Arzneibüchern, z. B. dem chinesischen und dem japanischen Arzneibuch andere Stammpflanzen zugelassen, als in Europa und USA.

Wertbestimmende und dominierende Inhaltsstoffe der Droge sind die Triterpenglykoside z. B. Actein, 27-Deoxyactein oder Cimifugosid. Artbedingt sind weitere Terpene vom Cycloartan -Typ (Cimigenol) und verschiedene Phenolcarbonsäuren ("cimicifugic acids") vorhanden (Beuscher 1998). Zubereitungen aus dem *Cimicifuga*-Wurzelstock werden gemäß Kommission E bei prämenstruellen und dysmenorrhöischen sowie klimakterisch bedingten neurovegetativen Beschwerden

verwendet. Traubensilberkerzenextrakte gelten als pflanzliche Gynäkologika. Sie besitzen hormonartige Eigenschaften, wobei die östrogene Wirkungskomponente besonders dominiert (Phytoöstrogene). Pharmakologische Studien belegen die östrogene Wirkung von Traubensilberkerzenpräparaten und befürworten den Einsatz dieser Arzneimittel in der Hormon-Ersatz Therapie bei Frauen (Wuttke et al. 2003, Winterhoff et al. 2003).

In das europäische Arzneibuch wurde bislang keine Monographie der Droge *Cimicifugae rhizoma* aufgenommen. Im britischen Arzneibuch (British Herbal Pharmacopeia 1996) ist die Droge jedoch monographiert. Im Rahmen der Identitätsprüfung wird gemäß der Monographie der dünnschichtchromatographische Nachweis geführt. Die Detektion erfolgt im UV-Licht bei $\lambda=366$ nm, die Identifizierung anhand von drei fluoreszierenden Zonen im unteren R_f -Bereich. Als Referenzsubstanz wird Rutin verwendet. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode zur Identifizierung der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock und der daraus hergestellten Zubereitungen wurde in der Monographiesammlung der "American Herbal Pharmacopeia" (AHP) (Thiekötter und Reich 2002) publiziert.

Die Strukturformeln der Triterpenglykoside und der Phenolcarbonsäuren sind im Anhang in der exemplarisch erstellten Monographie "Traubensilberkerzenwurzelstock und daraus hergestellte Zubereitungen" aufgeführt.

1.2.4 Brennnesselblätter (*Urticae folium*)

Die Droge (*Urticae folium*) besteht aus den ganzen oder geschnittenen, getrockneten Blättern der Stammpflanzen *Urtica dioica* L., *Urtica urens* L., deren Hybriden oder Mischungen von diesen und gehört zu der Familie der Urticaceae. Die zwei Arten sind botanisch relativ einfach zu unterscheiden. Die zweihäusige *Urtica dioica* L. (Große Brennnessel) ist eine ausdauernde, bis 150 cm hoch wachsende, mehrjährige krautige Pflanze. Sie hat eine Sprossachse mit dekussierten herzförmigen, dunkelgrünen Laubblättern mit gesägtem Rand, die mit kurzen borstigen Haaren sowie langen Brennhaaren besetzt sind. *Urtica urens* L. (Kleine Brennnessel) gleicht der großen Brennnessel im Aussehen, wird jedoch nur bis zu 60 cm hoch, hat

kleinere eiförmige Blätter, keinen überwinternden Wurzelstock und ist einhäusig. *Urtica dioica* L. wächst nahezu überall; sie zeichnet sich durch eine hohe Variabilität und Anpassungsfähigkeit an neue und rasch veränderliche Lebensräume aus.

Von der Kommission E gibt es eine Positivmonographie für Brennnesselkraut und -blätter. Die Monographie "Brennnesselblätter" des deutschen Arzneibuches (DAB 10, 2. Nachtrag 1993) wurde nicht in das europäische Arzneibuch übernommen. Derzeit wird aber ein Vorschlag für eine neue Monographie diskutiert (Pharmeuropa Vol 15.3, 2003). Die ESCOP hat ebenfalls eine Monographie der Droge publiziert.

In der Literatur beschriebene Inhaltsstoffe betreffen fast ausschließlich das Kraut der Droge. Da keine genaueren Daten vorliegen, wird davon ausgegangen, dass diese Inhaltsstoffe in allen oberirdischen Bestandteilen vorhanden sind, also auch in den Blättern (Frank et al. 1998). Das Inhaltsstoffspektrum von Brennnesselkraut ist breit. Neben anorganischen Verbindungen, wie z. B. Calcium- und Kaliumsalzen findet man verschiedene Carotinoide, Vitamine, Triterpene und organische Säuren. Die Brennhaare enthalten biogene Amine. Vorherrschende sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind Flavonoide sowie Phenolcarbonsäuren (Ferula-, p-Cumar-, Kaffee-, Chlorogen- und Kaffeoyläpfelsäure (nur *U. dioica*)) und Cumarine (Scopoletin) (Schomakers et al. 1995, Chaurasia und Wichtl 1987, Lutomski und Speichert 1983). Die Blätter von *U. dioica* enthalten im Unterschied zu den Blättern von *U. urens* Kaffeoyläpfelsäure (Frank et al. 1998, Schomakers et al. 1995).

In der Monographie der Kommission E sind als Anwendungsgebiete die unterstützende Behandlung rheumatischer Beschwerden und die Durchspülung bei entzündlichen Erkrankungen der ableitenden Harnwege angegeben. In klinischen Studien konnten außerdem die antirheumatischen Effekte (Schmerzabnahme und verbesserte Beweglichkeit) von Brennnesselblätter-Extrakten belegt werden (Ramm und Hansen 1995, Ramm und Hansen 1997). In der Homöopathie gibt es verschiedene Anwendungsgebiete für die Blattdroge, z. B. Verbrennungen, Herpes-Infektionen, Dysmenorrhoe, Nierensteinleiden, Ekzeme und Hypersensibilität der Haut.

Die Strukturformeln der wichtigsten Inhaltsstoffe der Brennnesselblätter sind im Anhang in der exemplarisch erstellten Monographie "Brennnesselblätter und daraus hergestellte Zubereitungen" aufgeführt.

1.3 Standardisierte Dünnschichtchromatographie

Bereits 1962 verfasste Stahl sein heute allgemein bekanntes Laborhandbuch, in dem er die standardisierte DC beschrieb (Stahl 1962). Er trug mit diesem Werk wesentlich dazu bei, dass die Akzeptanz der DC als analytisches Verfahren stieg. Viele in den Anfängen der DC entwickelten Methoden sind noch heute Bestandteil einzelner Monographien von Arzneibüchern. Diese Methoden sind jedoch oft nicht mehr auf dem neuesten Stand von Wissenschaft und Technik. Obwohl in der allgemeinen Monographie "Dünnschichtchromatographie" des europäischen Arzneibuchs Ansätze zu modernen Verfahren verankert sind, werden in den einzelnen Monographien veraltete Methoden beschrieben. Die Chromatographie wird fast ausschließlich auf DC-Platten durchgeführt; Trennstrecken und Auftragemengen sind so groß, dass sie nur auf einer DC-Platte zu realisieren sind. Wie aber bereits erwähnt, schließt das Arzneibuch die moderne Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) nicht aus, es fehlt nur an Methoden in den Monographien zu ihrer Umsetzung.

In der vorliegenden Arbeit wurde standardisierte HPTLC angewendet, um die Vorteile dieser Methode für die Analytik von Phytopharmaka und ihren Ausgangsmaterialien aufzuzeigen.

HPTLC hat gegenüber anderen chromatographischen Methoden folgende Vorteile: Auf einer HPTLC Platte können mehrere Proben parallel analysiert werden, und die Trennung der Inhaltsstoffe kann für eine bestimmte Stoffgruppe innerhalb des Vielstoffgemisches Extrakt bzw. Droge optimiert werden. Durch Auswahl geeigneter Fließmittel ist es möglich, die zu trennenden Substanzen innerhalb des Fingerprints in dem Bereich um R_f ca. 0,3 zu detektieren. In diesem Bereich ist die Auflösung maximal, es resultieren die schärfsten Banden (Frey und Zielhoff 1993). Für die Analyse von Drogen und Extrakten gilt dies jedoch nur beschränkt, da der gesamte Fingerprintbereich für die Detektion relevant sein kann. Der dünnschichtchromatographische Fingerprint hat den Vorteil, dass, obwohl die Analyse auf bestimmte Inhaltsstoffe fokussiert sein kann, immer die Untersuchungssubstanz in ihrer Gesamtheit erfasst wird.

Die Auswertung der HPTLC ist mehrfach möglich, so dass man eine Vielzahl an Informationen aus einer Analyse erhalten kann. Es besteht die Möglichkeit der Detektion vor und nach der Derivatisierung jeweils im UV Licht bei $\lambda=254$ nm

respektive $\lambda=366$ nm und im Weißlicht (multiple Detektion). Entsprechend dem analytischen Ziel der chromatographischen Untersuchung können mehr oder weniger spezifische Derivatisierungsreagenzien verwendet werden.

Zur Steigerung der Selektivität des Verfahrens können mehrere Parameter unabhängig voneinander variiert werden. Diese Tatsache macht die HPTLC zu einem sehr flexiblen analytischen Verfahren, andererseits resultieren Probleme in Bezug auf die Reproduzierbarkeit des Verfahrens.

Die im Folgenden aufgeführten Parameter sind bei der Anwendung der HPTLC relevant.

1.3.1 Stationäre Phase

Für die modernste Form der Dünnschichtchromatographie, die HPTLC, werden Platten verwendet, die mit einer sehr feinen Kieselgelschicht belegt sind. Aufgrund des Partikeldurchmessers von nur ca. 5 μm und einer schmalen Korngrößenverteilung entsteht eine äußerst dicht gepackte Schicht von nahezu gleich großen Partikeln und sehr fein strukturierter Oberfläche. Auf HPTLC-Platten werden die chromatographischen Leistungsparameter prinzipiell verbessert. Trennzeit und Trennstrecke sind im Vergleich zur DC verringert. Die Auflösung ist aufgrund der geringeren Trennstufenhöhe um etwa 60 % verbessert (Frey und Zielhoff 1993). Da im Vergleich zur DC ein kleineres Plattenformat (10 x 10 cm oder 20 x 10 cm) verwendet wird, können kleinere Kammern für die Entwicklung eingesetzt werden. Das bedeutet, dass eine geringere Menge an Fließmittel benötigt wird, wodurch sich das Problem der Entsorgung von Lösungsmitteln vermindert.

In der Qualitätsanalytik von Phytopharmaka werden meistens HPTLC-Platten mit einer Kieselgelschicht verwendet. Für die Lösung spezieller analytischer Probleme, wie z. B. die Fingerprintanalytik von extrem polaren oder unpolaren Substanzen, stehen jedoch auch Platten mit anderen von Kieselgel abgeleiteten Schichten zur Verfügung. Auf Umkehrphasen (RP-18W) können z. B. polare Substanzen mit polaren Fließmitteln voneinander getrennt werden. Weiterhin gibt es Platten mit

chemisch substituiertem Kieselgel, z. B. Aminopropyl- (HPTLC-NH₂) für die Zuckermanalytik.

Vor der Chromatographie sollten die Platten unter UV-Licht und im Tageslicht auf Beschädigungen der Schicht geprüft werden. Es sollte auf vorgewaschenen Platten gearbeitet werden, um Störungen der Chromatographie durch Verunreinigungen auf der Kieselgelschicht auszuschließen. Die Reinigung der Platten kann mit reinem Methanol, mit einer Mischung aus gleichen Anteilen von Methanol und Ethylacetat oder auch mit dem Fließmittel, das später für die Entwicklung verwendet wird, durchgeführt werden. Die Platten werden bis zum oberen Plattenrand gereinigt, 10 Minuten später aus der Kammer genommen und in einem Trockenschrank bei ca. 120°C 20 Minuten getrocknet. Die aktive Platte wird zum Abkühlen auf Raumtemperatur und zur Equilibrierung unter ambienten Bedingungen in einem Exsikkator ohne Trockenmittel gelagert.

1.3.2 Probendosierung und –auftragung

Das chromatographische Ergebnis hängt wesentlich von der Qualität des Probenauftrags ab. Dabei haben die Auswahl des Dosiergerätes sowie Erfahrung und Sorgfalt des Laborpersonals großen Einfluss. Besonders bei der Arbeit mit einfachen Auftragegeräten findet man einen hohen "Operator Einfluss" (Frey und Zielhoff 1993). Für das Auftragen sollten unter anderem die folgenden Aspekte berücksichtigt werden:

Untersuchungslösungen sollten so konzentriert sein, dass Auftragevolumina von 1 bis 10 µL eingehalten werden können. Proben sind in regelmäßigen Abständen auf der Platte anzuordnen, um Unregelmäßigkeiten der Trennung leichter zu erkennen. Die Schicht darf durch Auftragegeräte oder einströmende Lösungen nicht verletzt werden, da sonst verzerrte Startbanden entstehen. Die Geschwindigkeit des Auftrags mit Spritzen darf nicht höher sein als das Aufnahmevermögen der Schicht. Beim Auftragen gleicher Substanzmengen sollten gleich große Startzonen angestrebt werden, weil sonst die Einflüsse von Lösungsmittel und Matrix nicht bewertet werden können.

Die aufgeführten Punkte machen deutlich, dass ein manuelles Auftragen der Proben für reproduzierbare, robuste DC nicht in Frage kommt. Da heute Auftragegeräte zur Verfügung stehen, stellt das reproduzierbare Auftragen der Proben jedoch kein Problem dar. Diese Geräte sprühen die Probenlösung auf die Platte. Die Proben-dosierspritze ist mit dem Sprühkopf stationär angeordnet, während die DC-Platte darunter hin und her bewegt wird. Der Kolben der Spritze und der Plattentisch werden mit konstanter Geschwindigkeit angetrieben. Auf diese Weise lassen sich völlig homogene Startbänder erzeugen. Generell ist das Auftragen schmaler Striche dem punktförmigen Auftragen vorzuziehen. Diese Geräte sind auch auf Kontaktauftragung ausgelegt, die jedoch nur in Ausnahmefällen, z. B. bei stark flüchtigen Substanzen, anzuwenden ist. Die Sprühauftragung ist – wenn möglich – immer der Kontaktauftragung vorzuziehen, da die Kieselgelschicht nicht verletzt werden kann und homogenere Startbanden entstehen.

Bei punktförmiger Auftragung kommt es schon im Startpunkt zu einer zirkulären Chromatographie, die das chromatographische Ergebnis negativ beeinflussen kann. Bei strichförmiger Auftragung sind die Zonen nach der Chromatographie besser getrennt (Stahl und Dumont 1969). Bei der photometrischen Direktauswertung strichförmig aufgetragener Zonen wird durch die Wahl der Spaltbreite nur der homogene Mittelteil erfasst und damit eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erreicht. Dies verbessert die Reproduzierbarkeit.

Das zeitaufwändige Auftragen der Proben ist durch den Einsatz vollautomatisierter Auftragegeräte zu rationalisieren. Die Geräte werden unter Anwendung einer speziellen Software über einen PC gesteuert. Das Auftrageschema wird mit Hilfe der Software am PC erstellt, kann gespeichert werden und dann beliebig oft wiederholt werden. Strichförmiges Auftragen wird durch Aufsprühen realisiert, bei Punktauftragungen kann zwischen Aufsprühen und Kontaktierung (z. B. für leicht flüchtige Substanzen) gewählt werden.

Startbanden sollten in einer Breite von 8 mm aufgetragen werden, der Abstand zu den seitlichen Plattenenden sollte mindestens 15 mm betragen und zum unteren Plattenrand mindestens 8 mm (Reich und Blatter 2003a).

1.3.3 Fließmittel

Die richtige Wahl des Fließmittels trägt entscheidend zum Trennerfolg der Chromatographie bei. Ein Vorteil der DC gegenüber anderen chromatographischen Verfahren ist, dass das Angebot an geeigneten Solventien groß ist und der Wechsel von einem zum anderen Fließmittel unproblematisch und schnell vollzogen werden kann. Neben den Hauptanforderungen nach ausreichender Selektivität und Stärke sollten Fließmittel genügende Reinheit, ausreichende Stabilität und geringe Toxizität aufweisen. Lösungsmittel enthalten oft Nebenbestandteile, Verunreinigungen, Zersetzungsprodukte und Stabilisatoren. Diese Fremdbestandteile sind meistens polarer, als das Lösungsmittel selbst. Daher werden sie erst auf der Schicht angereichert. Bei der photometrischen Direktauswertung können deshalb Störungen durch zusätzliche Signale, erhöhtes Rauschen oder Fremdfluoreszenz auftreten. Es sollten daher für die DC – vor allem im Hinblick auf Robustheit und Reproduzierbarkeit - immer Lösungsmittel definierter Qualität verwendet werden. Sie sollten dicht verschlossen und gegebenenfalls lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Fließmittelgemische sollten generell nicht bevorratet werden, wenn es sich um Fließmittelsysteme handelt, bei denen Zersetzungen und/oder Umlagerungen möglich sind (beispielsweise Gemische von Estern und Alkoholen und/oder Säuren). Die für die chromatographische Trennung wichtigsten Eigenschaften des Fließmittels sind Selektivität und ausreichende Fließmittelstärke. Die Selektivität ist der entscheidende Faktor zur Trennung von Substanzen gleicher Polarität, während Substanzen unterschiedlicher Polarität bereits durch die richtig gewählte Fließmittelstärke zu trennen sind (Snyder 1971). Durch die Fließmittelstärke ist also die Lage einer Substanz im Chromatogramm (R_f -Wert) zu beeinflussen.

Bei der Suche nach dem optimalen Fließmittel zur Lösung eines bestimmten analytischen Problems muss berücksichtigt werden, dass sich die Fließmittelstärke der Solventien weder linear noch additiv verhält. Ziel sollte es immer sein, Systeme zu finden, die einfach zusammengesetzt sind und Lösungsmittel in ähnlichen Proportionen enthalten.

Zur Klassifizierung von Lösungsmitteln hat Snyder (Snyder 1978) unter Einbeziehung von Protonenakzeptor-, Protonendonator- und Dipolwirkungen der einzelnen Solventien das sogenannte Selektivitätsdreieck erstellt (Abbildung 1-1). Die

Lösungsmittel sind nach diesen drei Kriterien in ein Dreieckskoordinatensystem eingezeichnet und entsprechend den auftretenden Überschneidungen (Clusterbildungen) in acht Selektivitätsklassen eingeteilt (Tabelle 1-2).

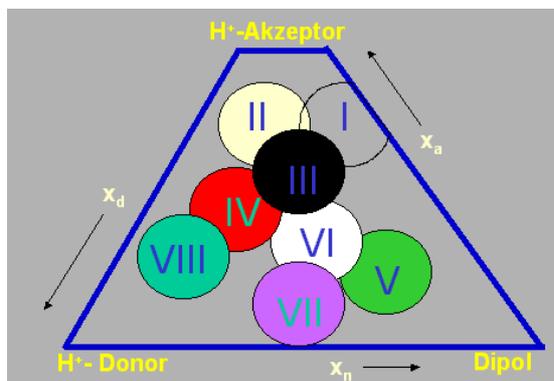


Abbildung 1-1: Selektivitätsdreieck

Tabelle 1-2: Selektivitätsklassen nach SNYDER (vereinfacht) (Snyder 1978)

Klasse	Vertreter
I	Aliphatische Ether, Trialkylamine, Trialkylphosphate
II	Aliphatische Alkohole
III	Tetrahydrofuran, Pyridin, Dimethylformamid
IV	Benzylalkohol, Formamid, Essigsäure
V	Methylenchlorid, Ethylenchlorid
VI	Aliphatische Ketone und Ester, 1,4-Dioxan, Acetonitril
VII	Aromatische (halogenierte) Kohlenwasserstoffe, Nitroverbindungen
VIII	Chloroform, Wasser, Fluoroalkohole, m-Kresol

Für die Umsetzung der theoretischen Grundlagen gibt es mehrere Modelle. Das Prisma-Modell und ein darauf basierendes, vereinfachtes Optimierungsschema werden hier erläutert.

Ein für die meisten Trennprobleme ausreichendes Trennpotential kann mit nur vier Komponenten, einschließlich einem "Verdüner", erreicht werden. Voraussetzung ist, dass die selektiven Komponenten Protonendonator-, Protonenakzeptor-, und Dipolwirkungen in das Konzept einbringen (Glajch et al. 1982). Die Zusammensetzung quartärer Gemische wird in Form eines Prismas anschaulich dargestellt. Ein

entsprechendes "Prisma - Modell" zur Optimierung mobiler Phasen wurde für die Dünnschichtchromatographie von Nyiredy et al. (Nyiredy et al. 1985) und Dallenbach-Toelke et al. modifiziert (Dallenbach -Toelke et al. 1986).

Das Prisma-Modell veranschaulicht den Zusammenhang zwischen Fließmittelstärke und Selektivität (Abbildung 1-2). Es kann zur Optimierung vollständiger DC-Verfahren eingesetzt werden; das Optimierungsziel wird durch ein strukturiertes "trial and error" - Verfahren erreicht. Die Eckpunkte der dreiseitigen Grundfläche des Prismas entsprechen den reinen, unverdünnten Fließmittelkomponenten (1,2,3). Entlang den Dreieckseiten findet man die binären Systeme (4,5,6) und in der Fläche die ternären Zusammensetzungen (9). Die Kantenlängen des Prismas sind durch die Fließmittelstärken der drei Komponenten gegeben. Da diese in der Regel verschieden sind, ist das Prisma zunächst verzerrt (irregulär). Durch Verdünnen gelangen alle Komponenten auf ein isoelutropes Niveau, welches der schwächsten Komponente entspricht. Dieses Niveau begrenzt den regulären Teil des Prismas, in dem Veränderungen der Selektivität ohne Einfluss auf die Fließmittelstärke bleiben. Wird dagegen die Selektivität entlang einer Seite im irregulären Teil des Prismas geändert, nimmt gleichzeitig die Fließmittelstärke ab.

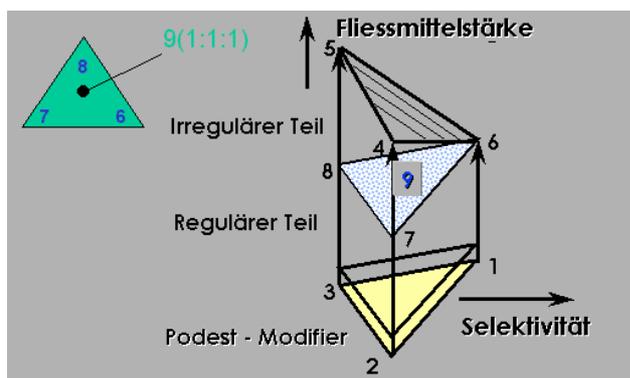


Abbildung 1-2: Prisma - Modell

Ein einfacheres Modell zur Findung des optimalen Fließmittels ist das Optimierungsschema der Firma CAMAG (Reich und George 1997) (Abbildung 1-3).

Für die Fließmitteloptimierung werden Lösungsmittel miteinander gemischt, die entsprechend dem Selektivitätskonzept nach Snyder Protonendonator-, Protonen-

akzeptor- und Dipolwirkungen in das Gemisch einbringen. Zur Lösung der meisten Trennprobleme ist es ausreichend, diesen Komponenten entweder einen "Verdüner" (z. B. Hexan) oder einen polaren "Modifier" (z. B. Wasser) zuzusetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit diesem Optimierungsschema gearbeitet, die Durchführung ist unter 2.7 beschrieben.

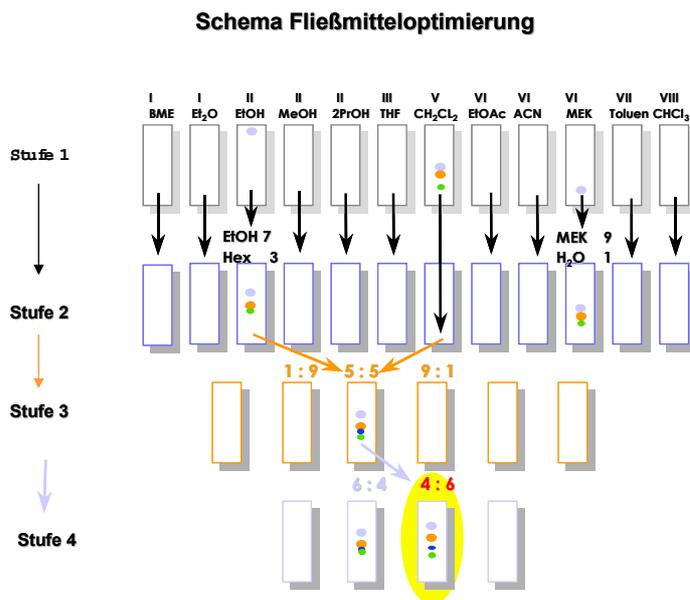


Abbildung 1-3: Fließmittelloptimierungsschema nach CAMAG (Abkürzungen der reinen Lösungsmittel: Tertiär-Butylmethylether (BME), Diethylether (Et₂O), Ethanol (EtOH), Methanol (MeOH), Isopropanol (2PrOH), Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan CH₂Cl₂), Ethylacetat (EtOAc), Acetonitril (ACN), Methyl ethylketon (MEK), Toluol (Toluen), Chloroform (CHCl₃))

1.3.4 Chromatogrammentwicklung

Die Chromatogrammentwicklung in der DC ist ein komplexer Prozess. Neben der stationären und der mobilen Phase, hat die Gasphase großen Einfluss auf den chromatographischen Prozess. Der Kammertyp und die Kammersättigung sind mit entscheidend für die chromatographische Trennung.

Die vertikale Chromatographie kann generell in Flachboden- oder Doppeltrogkammern durchgeführt werden, die horizontale Chromatographie in Horizontal-

Entwicklungskammern. Die Chromatographie kann in einer gesättigten oder in einer ungesättigten Kammer erfolgen. Kammersättigung ist dann erreicht, wenn das Fließmittel vor und während der Chromatographie mit der Gasphase im Gleichgewicht steht (Geiss 1987). Gesättigte Kammersysteme sind sehr stabil und daher für reproduzierbare chromatographische Verfahren geeignet. In ungesättigten Kammern ist die Analysenzeit kürzer, da die Zeit für die Kammersättigung entfällt. Es kommt aber häufig zu ungeraden Fließmittelfronten ("Bananenform"). Bei der ungesättigten Chromatographie ist das Gleichgewicht zwischen den drei Phasen nicht kontrollierbar, wodurch die Reproduzierbarkeit des Verfahrens nur schwer bzw. gar nicht erreicht wird. Eine Ausnahme ist die ungesättigte Kammer in der sogenannten Sandwich-Konfiguration (S-Kammer). Dabei ist die Schicht der HPTLC-Platte mit einer zweiten Platte (meistens aus Glas) abgedeckt ("Sandwich"). Der Raum zwischen den Platten ist kleiner als 3 mm, so dass keine Vorkonditionierung der Schicht möglich ist. Die Entwicklung in einer S-Kammer ergibt die schärfsten Zonen und die reproduzierbarste Trennung, aber die Fließmittel zeigen oft sekundäre Fronten im Chromatogramm, die mit der Trennung interferieren (Reich und Blatter 2003a). Da das Fließmittel aufgrund von Kapillarkräften die stationäre Phase durchströmt, verringert sich die Geschwindigkeit mit zunehmender Strecke. Eine Trennstrecke von 60 mm auf HPTLC - Platten ist für fast jede Analyse ausreichend.

1.3.5 Derivatisierung

Nach der chromatographischen Trennung und dem anschließenden Verdampfen des Fließmittels liegen die Substanzen in feinverteilter Form auf den Sorptionspartikeln. Da sie in dieser Phase besonders anfällig für äußere Einflüsse sind (z.B. Licht, Sauerstoff und Feuchtigkeit), sollte die Zeit bis zur Derivatisierung bzw. Detektion nicht unnötig lang sein.

Hauptzweck der Derivatisierung ist die Erhöhung der Selektivität und der Empfindlichkeit des Verfahrens. Durch die Umsetzung mit geeigneten Reagenzien zu Derivaten können Substanzen, die weder im ultravioletten noch im sichtbaren Spektralbereich Licht absorbieren, durch die Einführung von Chromophoren oder Fluorophoren detektiert werden.

Ein weiterer großer Vorteil der DC ist die Möglichkeit in Abhängigkeit vom analytischen Ziel unter einer Vielzahl von in der Literatur beschriebenen Reagenzien auswählen zu können (Jork et al. 1990).

Ein Problem bei der postchromatographischen Derivatisierung ist die gleichmäßige Umsetzung der Substanzen mit dem Reagenz. In der qualitativen DC wird das Derivatisierungsreagenz meistens auf die Platte gesprüht. Vorteil der Methode ist, dass durch Kontrolle der aufgesprühten Reagenzmenge ein Überschuss vermieden wird und die Gefahr der Elution von Substanzen aus einzelnen Zonen / Banden gering gehalten werden kann. Nachteil ist die inhomogene Verteilung des Reagenzes auf der Schicht, was am deutlichsten an einem uneinheitlichen Plattenhintergrund zu sehen ist.

Reproduzierbare Derivatisierung durch Sprühen ist trotzdem möglich, wenn in der Prüfanweisung sämtliche Parameter exakt beschrieben und festgelegt sind. Außerdem ist seit kurzer Zeit ein Gerät im Handel, mit dem reproduzierbares Auftragen des Reagenzes durch Sprühen möglich ist.

Eine gleichmäßigere, besser reproduzierbare Zuführung von Reagenzien ist durch Tauchen möglich. Hierfür müssen jedoch Lösungsmittel verwendet werden, die das Reagenz lösen, nicht jedoch die getrennten Substanzen. Bei der Derivatisierung durch Tauchen darf es weder zu einer Diffusion der Substanzzonen kommen noch zu einer Elution. Getauchte Platten haben einen deutlich homogeneren Hintergrund als besprühte Platten.

Die Entscheidung, welches Verfahren für die Derivatisierung angewendet wird, sollte in Abhängigkeit von dem Reagenz getroffen werden. Häufig werden Platten nach dem Aufbringen des Derivatisierungsreagenzes erhitzt. Hierfür sollte ein Plattenheizer mit ausreichend großem Hitzefeld gewählt werden, damit die Platte gleichmäßig erhitzt wird.

1.3.6 Dokumentation

Für die Identifizierung der Platten ist es unabdingbar, dass sie beschriftet werden. Dies sollte in der oberen rechten Ecke der Platte mit einem weichen Bleistift oder einem Fluoreszenzschreiber geschehen. Alternativ dazu ist es möglich, direkt GLP-

konforme Platten zu verwenden, die eine vorgegebene Nummer zur Identifizierung aufweisen.

Für die Dokumentation stehen heute Video- und Digitaldokumentationssysteme zur Verfügung. Diese sind in Verbindung mit einer kompatiblen Software GMP- / GLP-konform. Die Geräte sind mit einer geeigneten Lichteinheit verbunden, so dass es ohne großen Aufwand möglich ist, ein Chromatogramm vor und nach der Derivatisierung bei $\lambda=254$ nm, $\lambda=366$ nm (UV - Licht) und im Weißlicht zu detektieren und zu dokumentieren.

Qualitative DC wird visuell ausgewertet. Neben Identitäts- und Reinheitsprüfungen wird die Fingerprintanalytik für die Auswertung von Stabilitätsstudien eingesetzt. Gerade hierfür ist es wichtig, dass einzelne Chromatogramme so dokumentiert sind, dass sie über einen langen Zeitraum vergleichbar bleiben.

Semi-quantitative Auswertungen der Chromatogramme können videodensitometrisch erstellt werden. Es ist möglich, einzelne Fingerprints eines Chromatogramms in Form von Analogkurven zu vergleichen. Hierzu wird die Anzahl, die Lage der Zonen und die Fläche bzw. Höhe der Peaks im Fingerprint ausgewertet.

Die quantitative Auswertung der DC erfolgt mit einem Densitometer, die Quantifizierung von Substanzen durch Evaluierung mit Standards definierten Gehaltes.

1.4 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit war durch Anwendung standardisierter DC ein Qualitätsstandard in der Qualitätsanalytik von Phytopharmaka zu erarbeiten.

Dünnschichtchromatographische Verfahren für die Qualitätsanalytik von Phytopharmaka sollten unter Anwendung moderner Techniken entwickelt und optimiert werden. Für die qualitative DC sollte eine sinnvolle Validierungsstrategie erarbeitet werden. Dazu sollte ein Validierungsmasterplan erstellt und exemplarisch für die virtuelle "Firma Muster" ausgearbeitet werden. Ausgewählte Parameter, die für die Robustheit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens relevant sind, sollten erarbeitet, überprüft und optimiert werden.

Es sollten Qualitätssicherungsdokumente für das Verfahren "qualitative Dünnschichtchromatographie" konzipiert werden zur Anwendung in den Bereichen Arzneimittelentwicklung, In-Prozess-Kontrolle, Qualitätskontrolle und Stabilitätsanalytik von Phytopharmaka.

Methodenentwicklung, Optimierung und die damit einhergehende Validierung sollten an ausgewählten Beispielen aufgezeigt werden. Die Reproduzierbarkeit des Verfahrens war anhand von Ringversuchen, die von den im Projekt beteiligten Firmen durchgeführt wurden, zu untersuchen.

Die validierten Methoden sollten im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen angewendet werden.

Für die exemplarisch entwickelten und validierten Methoden sollten Monographieentwürfe erstellt werden.

Die Validierung eines quantitativen dünnschichtchromatographischen Verfahrens sollte exemplarisch für ein Fertigarzneimittel, das einen Extrakt enthält, durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Aceton R	Merck 100014
Acetonitril, HPLC grade	Promochem 9128
Acetonitril, p.a., ACS	Merck 100003
Ameisensäure, 98 -100 %, p. a., ACS	Merck 100264
Ammoniak, 25%, reinst, Ph. Eur., BP	Merck 105422
Anisaldehyd purum > 98 %	Fluka 10440
7-Chlor-4-Nitrobenzofurazan (NBD-Chlorid)	Merck 102660
Chloroform, p.a., ISO	Merck 102445
2,6-Dichlorchinon-4-chlorimid	Merck 159139
Dichlormethan, p. a. , ACS, ISO	Merck 106050
Diethylether >99 %, Ph. Eur., DAB	Roth 8810.1
Diethylether p.a., ACS, ISO	Merck 100921
4-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA)	Fluka 39421
Dimethylformamid, p. a. , ACS, ISO	Merck 103053
Diphenylboryloxyethylamin (Naturstoffreagenz) R (Ph. Eur.)	Roth 9920.2
Echtblausalz Merck	Merck 159627
Eisen(III)-chlorid, wasserfrei, p. a.	Merck 803945
Eisessig, p. a., ACS, ISO	Merck 100063
Essigsäure wasserfrei R (Ph. Eur.)	Merck 159520
Ethanol absolut, p. a. , ACS, ISO	Merck 100983
Ethanol, 96 %, reinst, Ph. Eur., BP	Merck 100971
Ethanol, vergällt, p.a.	Merck 100974
Ethylacetat, p. a., ACS, ISO	Merck 109623
Ethylformiat, zur Synthese	Merck 800891
Hexan, p.a., ACS	Merck 104367
Isopropanol, p. a., ACS, ISO	Merck 109634
Macrogol 400 R (Ph. Eur.)	Merck 159710

Methanol, p. a., ACS, ISO	Merck 106009
Methylethylketon, p.a., ACS	Merck 109708
Natriumcarbonat, wasserfrei, reinst	Merck 106398
ortho- Phosphorsäure, 85 %, p.a., ACS, ISO	Roth 6366.1
Polyethylenglycol 400, Ph. Eur.	Merck 817003
Salzsäure, 32 %, p.a.	Merck 100319
Schwefelsäure 95-98 %, reinst	Merck 100713
tertiär-Butylmethylether, p.a.	Merck 101849
Tetrahydrofuran, p.a., ACS	Merck 109731
Toluol, p. a., ACS, ISO	Merck 108325
Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd)	Merck 159466
Wasser, entmineralisiert	Reinstwassersystem Clear G 7795

2.2 Materialien und Geräte

Probenaufarbeitung

Analysemmühle, A11-basic	IKA Labortechnik
Chromabond® Polyamidsäule (500 mg PA 6), Art. Nr.: 730007	Macherey-Nagel
Festphasenextraktionsvorrichtung VacMaster 20 mit Membranpumpe VacMPC 101Z	IST
Kreuzschlagmühle	Braun
Reinstwasseranlage, Reinstwassersystem Clear G 7795 mit Aqua Purificator	Fa. SG
Rotationsverdampfer, Laborota 4002, Rotacool, Rotavac Pt100	Heidolph
Rotationsverdampfer Rotavapor R-124 mit Vakuumsystem B-178	Büchi
Rundfilter, MN 617, 9 cm Durchmesser	Macherey-Nagel

Schüttelgerät SM 25	Bühler Laborgerätebau
Trockenschrank, Wärmeschrank UM500	Memmert
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510H	Bandelin
Waagen	Sartorius M2P
	Sartorius MC210
	Sartorius BP610
	Mettler PC4400
	Mettler AG2425
Zentrifuge Roto Silenta II	Hettich
Zentrifuge, UEC Micro 14/B	UNIEQUIP
Zentrifuge, Megafuge 2.OR	Heraeus Instruments

DC-Platten

HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F 254 10x10 cm Nr.: 105628	Merck
HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F 254 20x10 cm Nr.: 105642	Merck
HPTLC-Fertigplatten, Nano SIL 20 UV 254 10x10 cm Nr.: 811022	Macherey-Nagel

Probenauftragung

Auftrageautomat TLS 100	Baron
Auftragesystem Nanomat 4 mit Kapillardispenser	CAMAG
Auftrageautomat ATS 4 mit "WIN CATS" Software	CAMAG

Entwicklung

Doppeltrogkammern (TTC) 10 X 10 cm und 20 X 10 cm mit Edelstahldeckel	CAMAG
Horizontal- Entwicklungskammern (HDC) 10 X 10 cm und 20 X 10 cm	CAMAG
Filterpapier	CAMAG

Derivatisierung

Chromatogramm Tauchvorrichtung III	CAMAG
DC-Sprühkabinett II mit Ventilator	CAMAG
DC-Plattenheizer III	CAMAG
Haartrockner	Braun
Kompressor ILM VAC, Typ 40	Saskia Hochvakuum und Labortechnik GmbH
Laborsprüher aus Glas	CAMAG, Merck
Plattenheizer Thermoplate S	Desaga
Sprühapparatur Eco Spray Ecological Sprayer	Labo Chimie France
Sprühdüse Ø 0,5 mm, Art. Nr.: N528	Roth
Tauchsystem DC-Tauch-fix II	Desaga
Tauchkammern	CAMAG, Desaga

Dokumentation

Drucker Photo 750	Epson
TLC Scanner 3 mit "WIN CATS" Software	CAMAG
Video-Auswertesystem, bestehend aus 3CCD- Farbkamera, VideoStore2- und VideoScan-Software, Reprostar 3, Lichtabdeckhaube mit Kamera-Stativ	CAMAG

Isolierung der Kaffeoylöpfelsäure

Fraktionssammler, LKB 2070, Ultrorac II	Bromma
Gefriertrocknungsanlage, P5-85	Piatkowski, Forschungsgeräte
HPLC-System: Waters alliance TM 2690 Separations Module, Waters 996 Photodiode Array Detector, Säulenofen Jetstream, Software Millennium 32 3.2	Waters, Eschborn
Polyamid SC 6, Korngröße 0,05-0,16 mm	Macherey-Nagel
Sephadex LH-20	Pharmacia Biotech, 254001

Identifizierung der Kaffeoyläpfelsäure

FT-IR Spektrometer FTS 135	Bio Rad Laboratories, USA
NMR-Gerät Avance 300 DPX	Bruker
Massenspektrometer, QZ Single Quadrupol Detektor	Waters

2.3 Referenzsubstanzen

Actein	Chromadex, USA
Arbutin	Roth 6115
Chlorogensäure	Roth 6385
Cimicifugasäure A	Schaper & Brümmer ¹⁾
Cimicifugasäure B	Schaper & Brümmer ¹⁾
Cimicifugasäure E	Schaper & Brümmer ¹⁾
Cimicifugasäure F	Schaper & Brümmer ¹⁾
27-Deoxyactein	Pure World Botanicals
Epicatechin	Roth 7293
Formononetin	Roth 83657
Hydrochinon	Roth 35861
Hyperosid	Roth 4215.1
Isoferulasäure	Schaper & Brümmer ¹⁾
Ferulasäure	Schaper & Brümmer ¹⁾
Kaffeensäure	Merck 24589
Kaffeoyläpfelsäure	Isoliert wie unter 2.19 beschrieben
Procyanidin B ₂ und Procyanidin B ₅	Leipolz ²⁾
Quercetin	Geiger ³⁾
Rutosid	Merck 59664
Scopoletin	Geiger ³⁾
Vitexin	Roth 9666

- 1) Diese Substanzen wurden freundlicherweise von der Firma Schaper & Brümmer zu Verfügung gestellt.
- 2) Diese Substanzen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Frau Dipl. Biologin Ingrid Leipolz aus *Aesculus hippocastanum* isoliert.
- 3) Diese Substanzen wurden freundlicherweise von Emeritus Prof. Dr. Hans Geiger zur Verfügung gestellt.

2.4 Fließmittel (FM)

FM 1: Ethylacetat / Ameisensäure / Wasser (9:1:0,6)

FM 2: Ethylacetat / Ameisensäure / Wasser (88:6:6), (Ph. Eur. 4.00, Monographie "Bärentraubenblätter")

FM 4: Toluol / Aceton / Ameisensäure (3:6:1), (Leipolz 1999)

FM 5: Oberphase eine Mischung von Ethylacetat / Eisessig / Wasser (100:20:30), (Hölzl und Strauch 1977)

FM 6: Ethylacetat / Ameisensäure / Eisessig / Wasser (100:12:12:24)

FM 7: Ethylformiat / Toluol / Ameisensäure (30:50:20)

FM 8: Ethylacetat / Methanol / Wasser / Ameisensäure (100:4:8:5), (Schomakers et al. 1995)

FM 9: Ethylacetat / Methanol / Wasser / Ameisensäure (50:4:4:2,5)

FM 10: Ameisensäure / Ethylmethylketon / Ethylacetat / Wasser (10:30:50:10), (DAB 1999, Monographie "Weißdornblätter mit Blüten")

FM 11: Methanol / Dichlormethan (10:90 V/V), (Pharmeuropa 14.1, 2002)

2.5 Derivatisierungsreagenzien

2.5.1 Anisaldehyd - Reagenz

Stammlösung 1 war eine Mischung aus 2 mL Anisaldehyd, 40 mL Eisessig und 340 mL Methanol. Diese Stammlösung 1 wurde im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert und war eine Woche haltbar. Unter Eiskühlung wurden 9,5 mL der Stammlösung 1 mit 0,5 mL Schwefelsäure versetzt (= Derivatisierungsreagenz). Das Reagenz wurde für jede Chromatographie frisch hergestellt und zum Tauchen und Sprühen verwendet.

Nach der Derivatisierung wurde die Platte bei 105°C erhitzt, bis sich die Zonen im Chromatogramm färbten (rosafarben).

2.5.2 Dichlorchinonchlorimidlösung

2,6-Dichlorchinon-4-chlorimid 1 % (m/V) in Methanol

2.5.3 Dichlorchinonchlorimid-Reagenz

Lösung 1: 2,6-Dichlorchinon-4-chlorimid 1 % (m/V) in Methanol.

Lösung 2: Natriumcarbonat wasserfrei 10 % (m/V) in Wasser.

Die Lösungen wurden nacheinander auf die Platte gesprüht. Die wässrige Lösung wurde mit einer sehr feinen Düse auf die Platte gesprüht. Während des Aufsprühens der wässrigen Carbonatlösung wurden kurze Pausen gemacht, da die wässrige Lösung nur sehr langsam von der Platte verdunstete. Diffuse Zonen konnten dadurch weitestgehend vermieden werden.

2.5.4 Dichlorchinonchlorimid-Reagenz Ph. Eur.

Lösung 1: 2,6-Dichlorchinon-4-chlorimid 1 % (m/V) in Methanol

Lösung 2: Natriumcarbonat wasserfrei 2 % (m/V) in Wasser

Die Lösungen wurden nacheinander auf die Platte gesprüht.

2.5.5 DMAZA - Reagenz

I) Dimethylaminozimtaldehyd 1 % (m/V) in einer Mischung aus gleichen Volumenteilen (VT) Salzsäure 6 N und Ethanol 96 %.

II) Dimethylaminozimtaldehyd 1 % (m/V) in Salzsäure 6 N.

III) Dimethylaminozimtaldehyd 1 % in einer Mischung aus 75 VT Salzsäure 6 N und 25 VT Ethanol 96 %. Die Lösung konnte zum Tauchen und zum Sprühen verwendet werden.

2.5.6 Echtblausalzreagenz

500 mg Echtblausalz wurden in 25 mL Wasser gelöst und mit Methanol auf 100 mL aufgefüllt. Die Platte wurde nach dem Besprühen bei 110°C 5 min erhitzt.

2.5.7 Folins - Reagenz

Folins Reagenz (1,2-Naphthochinon-4-Natriumsulfonat) wurde in Wasser gelöst (1:1 (m/m)). Die Platte wurde mit dieser Lösung besprüht und anschließend in eine mit Ammoniakdampf gesättigte Kammer gehalten.

2.5.8 Mangan-II-Chlorid-Reagenz

0,2 g Mangan-II-Chlorid wurden in 30 mL Wasser gelöst und mit 30 mL Methanol versetzt. Vorsichtig wurden 2 mL konz. Schwefelsäure zu diesem Gemisch getropft.

2.5.9 Naturstoffreagenz

I) Lösung 1: Naturstoff (2-Aminoethyldiphenylborinat) 1 % in Methanol (m/V). Lösung 2: Polyethylenglykol (Macrogol) 400 5 % in Methanol (m/V). Die Lösungen wurden direkt nacheinander auf die Platte gesprüht. Die Macrogollösung verstärkte die Fluoreszenz.

II) Lösung 1: Naturstoff (2-Aminoethyldiphenylborinat) 0,5 % in Ethylacetat (m/V). Lösung 2: Polyethylenglykol (Macrogol) 400 5 % in Dichlormethan (m/V).

Die Lösungen wurden direkt nacheinander auf die Platte gesprüht.

2.5.10 NBD-Chlorid Reagenz

Lösung 1: Natriumacetat wurde in Propanol-2 bis zur Sättigung gelöst.

Lösung 2: 0,1 g NBD-Chlorid wurde in 50 mL Propanol-2 gelöst.

Die Lösungen wurden nacheinander auf die Platte gesprüht, zwischendurch wurde die Platte im Warmluftstrom getrocknet, anschließend bei 70°C 10 min erhitzt.

2.5.11 Tetrazolblau-Reagenz

10 mL einer 0,5 % - igen methanolischen Terazoliumchloridlösung wurden mit 5 mL einer 25 % - igen wäßrigen Natronlauge und mit 5 mL Methanol vermischt.

2.5.12 Vanillinphosphorsäure-Reagenz

1 g Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) wurden in 25 mL Ethanol gelöst und mit 25 mL Wasser und 35 mL Phosphorsäure versetzt.

2.6 Probenaufarbeitung

Bei der Aufarbeitung der Proben wurde unter Berücksichtigung der chemischen Struktur der nachzuweisenden Inhaltsstoffe und/oder Inhaltsstoffgruppen respektive unter Beachtung des analytischen Ziels entschieden, ob und wie eine Zerkleinerung der Probe(n) vorzunehmen und welche Lösungsmittel für die Probenvorbereitung zu verwenden waren.

2.6.1 Festphasenextraktion zur Trennung der Procyanidine und Flavonoide

Für die Festphasenextraktion wurde eine Polyamidsäule verwendet (PA 500 mg). Mit Hilfe unterschiedlich polarer Elutionsmittel konnten die Procyanidine und die Flavonoide in drei getrennten Fraktionen von der Säule eluiert werden. Fraktion I enthielt die Flavonoide, Fraktion II die oligomeren Procyanidine (OPC) und Fraktion III die polymeren Procyanidine (PPC).

Festphasenextraktion I (Methodenentwicklung)

Die Säule wurde mit je 10 mL Wasser und Methanol vorkonditioniert. 10 mL Untersuchungslösung wurden auf die Säule gegeben. Als Elutionsmittel wurden Dimethylformamid-Ethanol-Mischungen (Hölzl und Strauch 1977) und Aceton-Ethanol-Wasser-Mischungen (Wagner und Bladt 1996) verwendet. Es wurden gemäß dem in Tabelle 2-1 aufgeführten Schema nacheinander drei Fraktionen von der Säule eluiert.

Tabelle 2-1: Elutionsmittel für Festphasenextraktion I

Fraktion	Elutionsmittel nach Wagner und Bladt	Elutionsmittel nach Hölzl und Strauch
Fraktion I	Ethanol 96 %	Ethanol 96 %
Fraktion II	Ethanol 96 % / Aceton / Wasser (80:16:4 V/V/V)	Ethanol 96 % / Dimethylformamid (80:20 V/V)
Fraktion III	Aceton / Wasser (70:30 V/V)	Dimethylformamid

Von jedem der Elutionsmittel wurden 50 mL verwendet.

Festphasenextraktion II

Die Säule wurde mit je 5 mL Methanol und Wasser vorkonditioniert. 1 mL der Untersuchungslösung wurde auf die Säule gegeben. Die Elution der einzelnen Fraktionen erfolgte gemäß dem in Tabelle 2-2 aufgeführten Schema.

Tabelle 2-2: Elutionsmittel für Festphasenextraktion II

Fraktion	Elutionsmittel	Menge Elutionsmittel
Fraktion I	Ethanol 96 %	4x10 ml
Fraktion II	Ethanol 96 % / Aceton / Wasser (80:16:4 V/V/V)	8x10 ml
Fraktion III	Aceton / Wasser (70:30 V/V)	1x10 ml

Die jeweils ersten 10 ml der Eluate wurden in einem Rundkolben aufgefangen und unter Vakuum bei 40 °C zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde jeweils in 1,0 mL Ethanol 96 % aufgenommen.

2.7 Fließmittelloptimierung

Mit der Probenlösung und den Referenzlösungen wurde die Fließmittelloptimierung in vier Stufen nach dem in der Einleitung unter 1.3.3 aufgeführten Schema durchgeführt.

Stufe 1:

Die Untersuchungslösungen wurden sequenziell mit folgenden, die Selektivitätsgruppen nach Snyder repräsentierenden Fließmitteln chromatographiert:

- Tertiär-Butylmethylether (BME)
- Diethylether (Et₂O)
- Ethanol (EtOH)
- Methanol (MeOH)
- Isopropanol (2PrOH)
- Tetrahydrofuran (THF)
- Dichlormethan (CH₂Cl₂)
- Ethylacetat (EtOAc)
- Acetonitril (ACN)
- Methyl ethylketon (MEK)
- Toluol (Toluen)
- Chloroform (CHCl₃)

Es wurden die Fließmittel ausgewählt, mit denen Chromatogramme erhalten wurden, die dem gewünschten chromatographischen Ergebnis am nächsten waren. Dazu wurden die R_f-Werte der zu trennenden Analyten bewertet. Die Chromatogramme bzw. die Fließmittel wurden in drei Gruppen geteilt: a) R_f > 0,8 b) 0,3 < R_f < 0,8 und c) R_f < 0,3. Die Fließmittel der Gruppen a und c wurden in Stufe 2, die Lösungsmittel aus Gruppe b wurden in Stufe 3 übernommen.

Stufe 2:

Fließmittel der Gruppe a lagen nicht vor. Fließmittel der Gruppe c wurden mit kleinen Mengen (1–10 %) eines polaren Lösungsmittels (Wasser, Essigsäure, Diethylamin, Methanol) verstärkt, bis die R_f-Werte ebenfalls in dem Bereich von 0,3 – 0,8 lagen.

Es wurden wieder die modifizierten Fließmittel ausgewählt, die Chromatogramme lieferten, die dem gewünschten chromatographischen Ergebnis am nächsten waren.

Stufe 3:

Um die Selektivität der Trennung zu verbessern, wurden die in Stufe 1 und 2 ausgewählten Fließmittel in verschiedenen Proportionen miteinander kombiniert.

Stufe 4:

Die Fließmittel bzw. Fließmittelkombinationen der Stufen 1 – 3, die Chromatogramme lieferten, die dem analytischen Ziel am nächsten waren, wurden auf dieser letzten Stufe geringfügig verändert, um die Trennung zu optimieren. Dazu wurden die proportionalen Anteile der Lösungsmittel variiert.

Alle Fließmittel wurden nur einmal verwendet.

2.8 Vorreinigen der HPTLC - Platten

Die Platten wurden durch Hineinstellen in eine 20 x 10 cm bzw. 10 x 10 cm große Doppeltrogkammer mit 20 mL bzw. 10 mL eines Gemisches aus Methanol und Ethylacetat (1:1 V/V) pro Trog gereinigt. 15 Minuten, nachdem das Fließmittel den oberen Plattenrand erreicht hatte, wurden die Platten aus der Kammer genommen. Der obere Plattenrand wurde mit einem Bleistiftstrich markiert, um bei späterer Verwendung die Laufrichtung erkennen zu können. Die Platten wurden im Trockenschrank bei 120°C für 20 Minuten getrocknet. Zum Abkühlen und Equilibrieren wurden die Platten bis zur Verwendung in einem Exsikkator ohne Trockenmittel aufbewahrt.

2.9 Probenauftragung

Mit dem Auftragegerät TLS 100 wurden die Probenlösungen durch Kontaktauftragung in 20 mm oder 10 mm breiten Startbanden auf die Platte aufgetragen. Der Abstand zum seitlichen Plattenrand betrug mindestens 15 mm. Der Abstand zum unteren Plattenrand betrug 10 mm.

Mit dem Probenautomat ATS4 wurden die Probenlösungen in 8 mm oder 10 mm breiten Startbanden auf die Platte gesprüht. Der Abstand zum seitlichen Plattenrand betrug mindestens 15 mm. Der Abstand zum unteren Plattenrand betrug 8 mm.

Das Auftragen der Probenlösungen wurde mit der Software WinCats am PC programmiert und gesteuert.

2.10 Chromatogrammentwicklung

2.10.1 Doppeltrogkammer

Bei der Entwicklung in der Doppeltrogkammer wurde die Platte immer so in die Kammer gestellt, dass die Kieselgelschicht zur Mitte der Kammer zeigte und die Glasplatte mit dem oberen Rand an die Wand der Kammer gelehnt war. Für die Chromatogrammentwicklung wurde die Kammer immer mit dem dafür vorgesehenen Deckel verschlossen.

Wenn das Fließmittel die markierte Front auf der Platte erreicht hatte, wurde diese aus der Kammer genommen. Die Platte wurde im Abzug getrocknet. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur oder mit einem handelsüblichen Haartrockner.

Bei der Entwicklung in der gesättigten Doppeltrogkammer wurde eine Seite der Kammer mit Filterpapier ausgekleidet. In jeden Trog wurden 5 mL Fließmittel gefüllt. Die Kammer wurde mit geschlossenem Deckel 15 min stehen gelassen. Für die Entwicklung wurde die Platte in den Trog gegenüber dem Filterpapier gestellt.

Bei der Entwicklung in der ungesättigten Doppeltrogkammer wurde nur ein Trog mit Fließmittel gefüllt. Die Platte wurde sofort in die Kammer gestellt und entwickelt.

Bei der Entwicklung in der vorkonditionierten Doppeltrogkammer wurde eine Seite der Kammer mit Filterpapier ausgekleidet. Der Trog, in dem sich das Filterpapier befand, wurde mit Fließmittel gefüllt. Die Platte wurde in den gegenüberliegenden Trog (ohne Fließmittel) gestellt. Die Kammer danach mit dem Deckel verschlossen und unter ambienten Bedingungen 15 min stehen gelassen. Anschließend wurde der Trog, in dem bereits die Platte stand, vorsichtig mit Fließmittel gefüllt.

2.10.2 Horizontal-Entwicklungskammer

Bei der Entwicklung in der Horizontal-Entwicklungskammer wurde die Platte immer mit der Kieselgelschicht nach unten auf die Auflagestege des Kammerkörpers gelegt. Es wurde nur von einer Seite aus entwickelt. Deshalb wurde die Platte immer so in die Kammer gelegt, dass die Seite, auf der sich die Startbanden der Proben

befanden, auf der Seite des mit Fließmittel befüllten Trogs lagen. Für die Entwicklung wurde die Kammer immer mit der dafür vorgesehenen Glasplatte verschlossen. Wenn die Fließmittelfront die markierte Stelle auf der Platte erreicht hatte, wurde die Platte aus der Kammer genommen. Die Platte wurde im Abzug getrocknet. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur oder mit einem handelsüblichen Haartrockner.

Bei der Entwicklung in der gesättigten Horizontal-Entwicklungskammer wurde die Gegenplatte entfernt. Die Konditionierwanne sowie einer der beiden Tröge wurden mit Fließmittel befüllt. Die zu entwickelnde Platte wurde eingelegt. Durch Umlegen des Glasstreifens wurde der Entwicklungsvorgang gestartet.

Bei der Entwicklung in der ungesättigten Horizontal-Entwicklungskammer wurde die Gegenplatte entfernt und einer der beiden Tröge mit Fließmittel befüllt. Die Platte wurde in die Kammer gelegt, und durch Umlegen des Glasstreifens wurde der Entwicklungsvorgang gestartet.

Bei der Entwicklung in der Sandwich-Konfiguration wurde die Platte mit der Kieselgelschicht nach unten auf die Gegenplatte gelegt. Einer der beiden Tröge wurde mit Fließmittel befüllt. Durch Umlegen des Glasstreifens wurde der Entwicklungsvorgang gestartet.

Bei der Entwicklung in der vorkonditionierten Horizontal-Entwicklungskammer wurde die Gegenplatte entfernt. Die Konditionierwanne sowie einer der beiden Tröge wurden mit Fließmittel befüllt. Die Kammer wurde mit der Abdeckplatte verschlossen und 15 min unter ambienten Bedingungen stehen gelassen. Anschließend wurde die zu entwickelnde Platte in die Kammer gelegt. Durch Umlegen des Glasstreifens wurde der Entwicklungsvorgang gestartet.

2.11 Derivatisierung

Bei der Derivatisierung durch Sprühen wurden ca. 20 mL Derivatisierungsreagenz in den Erlenmeyerkolben des Laborsprühers gefüllt. Mit Druckluft wurde das Reagenz auf die Platte gesprüht. Das Trocknen der Platte erfolgte unter dem Abzug bei Raumtemperatur oder mit einem handelsüblichen Haartrockner.

Bei der Derivatisierung durch Tauchen wurde die Tauchkammer mit Derivatisierungsreagenz befüllt. Die Platte wurde in die entsprechende Vorrichtung eingelegt. Das Tauchen erfolgte automatisch. Zeit und Geschwindigkeit wurden manuell eingestellt.

2.12 Dokumentation

Die Dokumentation erfolgte mit dem Videodokumentationssystem. Die Platte wurde in das System gelegt und die entsprechende Beleuchtung (UV-Licht bei $\lambda=254$ nm respektive $\lambda=366$ nm oder Weißlicht) eingeschaltet. Blende und Zoom wurden manuell an der Kamera eingestellt. Für die Aufnahme im UV-Licht bei $\lambda=366$ nm wurde ein Filter verwendet. Die Bildaufnahme wurde am Computer mit der Software VideoStore gesteuert. Für jede Analyse wurde eine Konfiguration zur Aufnahme des Bildes festgelegt und gespeichert. Die Kamera-Konfigurationen für die einzelnen Verfahren sind unter 2.16 für jedes Verfahren unter dem Punkt Dokumentation aufgeführt. Das Bild wurde mit der Videokamera aufgenommen und erschien auf dem Bildschirm des Computers. Das Bild wurde bearbeitet und als cpf-Datei gespeichert. Die cpf-Datei wurde als tif-Datei exportiert.

2.13 Semi-quantitative Auswertung

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software VideoScan. Start- und Frontlinie des Chromatogramms wurden am Computer markiert. Die Parameter für die Integration wurden festgelegt. Die R_f -Werte wurden mittels der Software bestimmt und Analogkurven der einzelnen Fingerprints ermittelt.

2.14 Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung erfolgte densitometrisch. Es wurde der Scanner 3 mit der Software WinCats verwendet. Die Platte wurde in den Scanner eingelegt und mit Magnetstreifen fixiert. Die quantitative Auswertung wurde am Computer mit Hilfe der Software gesteuert.

Einstellungen für die quantitative Auswertung der Analysen zur Hydrochinonbestimmung in Fertigarzneimitteln, die Bärentraubenblätterextrakt enthalten, sind unter 2.16 (Verfahren III) aufgeführt.

2.15 Identifizierung und Dokumentation der Platten

Die Platten wurden durch die Projektnummer und das Datum identifiziert. Für die Dokumentation wurden festgelegte Buchstaben für die Wellenlänge des Lichtes und gegebenenfalls das Derivatisierungsreagenz dieser Nummer beigefügt.

Jede Platte wurde durch die Beschriftung eindeutig identifiziert und im Laborjournal registriert. Die Angaben „Bzzzjjmmttx“ wurden auf der Platte vermerkt. Dabei bedeuteten:

BBzzz = Projektnummer bestehend aus zwei Großbuchstaben und drei Zahlen (Bsp.: MA001)

jjmmtt = Datum (Bsp.: 010618)

xx = laufende Plattennummer an dem bestimmten Datum (Bsp.: 01)

Die Beschriftung wurde in der rechten oberen Ecke der Platte mit einem Bleistift vorgenommen.

Bei der Dokumentation der Platte mit dem Video-Dokumentationssystem wurde die Beschriftung der Platte für die Bezeichnung des Bildes übernommen und durch einen Zusatz für die entsprechende Wellenlänge und das Derivatisierungsreagenz wie folgt ergänzt:

Keine Ergänzung: Aufnahme im UV-Licht bei 254 nm

F: Aufnahme im UV-Licht bei 366 nm

W: Aufnahme im Weißlicht (Auflicht)

Wt: Aufnahme im Weißlicht (Durchlicht)

Wtr: Aufnahme im Weißlicht (Durch- und Auflicht)

Die folgenden Abkürzungen für Derivatisierungsreagenzien wurden verwendet:

A: Anisaldehyd-Reagenz

DC: Dichlorchinonchlorimidreagenz

DMAZA: DMAZA - Reagenz

E: Echtblausalzreagenz

F: Folins Reagenz

M: Mangan II Chlorid-Reagenz

NP: Naturstoffreagenz

NBD: NBD - Chlorid Reagenz

T: Tetrazolblau - Reagenz

V: Vanillinphosphorsäure - Reagenz

2.16 Dünnschichtchromatographische Verfahren

Verfahren I (phenolische Inhaltsstoffe in Bärentraubenblättern):

Fließmittel: FM 1

Referenzsubstanzen: Arbutin, Gallussäure, Hydrochinon

Probenauftragung: 5 µL

Chromatographie: 10 x 10 cm Flachboden- oder Doppeltrogkammer,
Kammersättigung, Trennstrecke 9 cm.

Detektion: Weißlicht nach der Derivatisierung

Derivatisierung: Dichlorchinonchlorimidlösung

Verfahren II (phenolische Inhaltsstoffe in Bärentraubenblättern):

Fließmittel: FM 2

Untersuchungslösung:

700 mg pulverisierte Droge (Siebanalyse gemäß Ph. Eur., Zerkleinerungsgrad "feinst gemahlen") oder die entsprechende Menge Extrakt bzw. Fertigarzneimittel wurden mit 10 mL Methanol 50 % (V/V) versetzt, 10 min im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde mit Methanol durch Waschen des Filters auf 10,0 mL ergänzt.

Referenzsubstanzen: Arbutin, Gallussäure, Hydrochinon

Referenzlösungen:

5 mg Arbutin wurden in 10 mL Methanol gelöst.

1 mg Gallussäure wurde in 10 mL Methanol gelöst.

5 mg Hydrochinon wurden in 10 mL Methanol gelöst.

Die Referenzlösungen wurden vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Probenauftragung: Auftragesystem ATS 4, 8 mm Banden,

Untersuchungslösung (en): 5 µL, Referenzlösungen: 5 µL.

Nach dem Probenauftragen wurde die Platte 5 min unter ambienten Bedingungen getrocknet.

Chromatographie: gesättigte Doppeltrogkammer, Trennstrecke 5 cm. Nach beendeter Chromatographie wurde die Platte bei 120°C getrocknet bis der Geruch nach Ameisensäure verschwunden war.

Detektion: Weißlicht nach der Derivatisierung

Derivatisierungsreagenz: Dichlorchinonchlorimid - Reagenz

Dokumentation: Videodokumentationssystem

Kamerakonfiguration:

Aufnahme
Digitalisierkarte prysm32
Kamera ccir Color 3CCD HV-C20
Einstellungen Belichtungszeit: 1 Vollbilder
Belichtungszeit: 0.040 Sekunden
Bildakkumulation: An
(Stopp Bild bei Sättigung: An)
(Stopp Pixel bei Sättigung: Aus)
HV-C20 Betriebsart: Manuell
HV-C20 AGC: Aus
HV-C20 Maximum: +18 dB
HV-C20 Verstärkung: Ein
HV-C20 Wert: + 2 dB
HV-C20 Weissabgleich: Automatisch
HV-C20 Belichtungszeit: Aus
HV-C20 Zeit: 1/100 sec
HV-C20 Gamma: Aus
HV-C20 Kontrast: Aus
HV-C20 DTL: Normal
HV-C20 Korrektur: Farbe
Rothelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Rotkontrast der Digitalisierkarte: 0
Rotpegel der Digitalisierkarte: 128

Grünhelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Grünkontrast der Digitalisierkarte: 0
Grünpegel der Digitalisierkarte: 128
Blauhelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Blaukontrast der Digitalisierkarte: 0
Blaupegel der Digitalisierkarte: 128

Verfahren III (Hydrochinon in Fertigarzneimitteln, die Bärentraubenblätterextrakt enthalten):

Fließmittel: FM 2

Untersuchungslösung:

270 mg (100 % Wert) oder die entsprechende Menge der anderen Konzentrationsstufen pulverisierter Tabletten (Siebanalyse gemäß Ph. Eur., Zerkleinerungsgrad "feinst gemahlen") wurden mit 10 mL Methanol 50 % (V/V) versetzt, 10 min im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde mit Methanol durch Waschen des Filters auf 10,0 mL ergänzt.

Stammlösung: Hydrochinon 13,49 mg in 100 mL Methanol.

Probenauftragung: Auftragesystem ATS 4, 6 mm Banden. Nach dem Probenaufragen wurde die Platte 5 min unter ambienten Bedingungen getrocknet.

Chromatographie: gesättigte Doppeltröglkammer, Trennstrecke 5 cm. Nach beendeter Chromatographie wurde die Platte bei 120°C getrocknet bis der Geruch nach Ameisensäure verflögen war.

Auswertung: Densitometrisch mit dem Scanner 3. Folgende Einstellungen wurden gewählt:

Scan settings

Slit dimension : 6.00 x 0.45 mm, Micro

Optimize optical system for maximum : Light

Scanning speed : 20 mm/s

Data resolution : 100 µm/step

Measurement	
Wavelength	288 nm
Lamp	D2 & W
Measurement type	Remission
Measurement mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Automatic
Y-position for 0 adjust	5.0
Track # for 0 adjust	1
Track start for quick scan	Automatic
Track end for quick scan	Automatic
Track # for quick scan	Automatic
Analog offset	10 %
Sensitivity	Automatic

Verfahren IV (Leipolz 1999) (Procyanidine in Weißdorn):

Stationäre Phase: Kieselgel 60, DC-Platten (Alu) 0,2 mm Schichtdicke, Merck 5553

Mobile Phase: FM 4

Referenzsubstanzen: Epicatechin, Procyanidin A₂ und Procyanidin B₂.

Chromatographie: DC-Kammer 20X20 cm, 9 cm Laufstrecke. Trocknen der Platte, bis das Fließmittel verdunstet ist.

Derivatisierungsreagenz: DMAZA-Reagenz I.

Die Platte wurde 5 min unter ambienten Bedingungen getrocknet.

Detektion: nach der Derivatisierung im Weißlicht.

Verfahren V (Flavonoide und Procyanidine in Weißdorn):

Fließmittel: FM 6

Untersuchungslösung:

Die Untersuchungssubstanz wurde in einer Labormühle pulverisiert (Siebanalyse gemäß Ph. Eur., der Zerkleinerungsgrad sollte den Anforderungen "feinst gemahlen" entsprechen). 1 g Extrakt oder die entsprechende Menge der Droge bzw. des Fertigarzneimittels wurde eingewogen und mit 10 mL Ethanol 70 % (V/V) versetzt. Der Ansatz wurde 30 min maschinell geschüttelt oder 30 min im Ultraschallbad behandelt, zentrifugiert und filtriert. 1 mL des Filtrates wurde durch Festphasenextraktion weiter aufgearbeitet.

Referenzsubstanzen: Epicatechin, Procyanidin B₂, Hyperosid, Rutin

Referenzlösungen: Je 1 mg Referenzsubstanz wurde in je 10 mL Methanol gelöst. Die Referenzlösungen wurden vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Probenauftragung: Auftragesystem ATS4, 8 mm Banden

Untersuchungslösungen Fraktion 1: 5 µL

Untersuchungslösungen Fraktion 2: 6 µL

Untersuchungslösungen Fraktion 3: 6 µL

Referenzlösungen Epicatechin und Procyanidin B₂: 4 µL

Referenzlösung Hyperosid: 6 µL

Referenzlösung Rutin: 8 µL

Nach dem Probenauftragen wurde die Platte 5 min unter ambienten Bedingungen getrocknet.

Chromatographie:

Vorkonditionierte Horizontal-Entwicklungskammer, Trennstrecke 6 cm.

Nach beendeter Chromatographie wurde die Platte im Warmluftstrom getrocknet, bis der Fließmittelgeruch verfliegen war.

Detektion: Weißlicht nach Derivatisierung mit Dimethylaminozimtaldehyd Reagenz.

Derivatisierungsreagenz: DMAZA-Reagenz III.

Dokumentation: Videodokumentationssystem.

Kamerakonfiguration:

Aufnahme
Digitalisierkarte prysm32
Kamera ccir Color 3CCD HV-C20
Einstellungen Belichtungszeit: 1 Vollbilder
Belichtungszeit: 0,040 Sekunden
Bildakkumulation: An
(Stopp Bild bei Sättigung: An)
(Stopp Pixel bei Sättigung: Aus)
HV-C20 Betriebsart: Manuell
HV-C20 AGC: Aus
HV-C20 Maximum: +18 dB
HV-C20 Verstärkung: Ein
HV-C20 Wert: + 1 dB
HV-C20 Weissabgleich: Automatisch
HV-C20 Belichtungszeit: Aus
HV-C20 Zeit: 1/100 sec
HV-C20 Gamma: Aus
HV-C20 Kontrast: Aus
HV-C20 DTL: Normal
HV-C20 Korrektur: Farbe
Rothelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Rotkontrast der Digitalisierkarte: 0
Rotpegel der Digitalisierkarte: 128

Grünhelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Grünkontrast der Digitalisierkarte: 0
Grünpegel der Digitalisierkarte: 128
Blauhelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Blaukontrast der Digitalisierkarte: 0
Blaupegel der Digitalisierkarte: 128

Verfahren VI (Triterpenglykoside in Traubenkerzenwurzelstock):

Fließmittel: FM 7

Untersuchungslösung:

500 mg pulverisierte Droge (Siebanalyse gemäß Ph. Eur., Zerkleinerungsgrad "feinst gemahlen") oder die entsprechende Menge Extrakt bzw. Fertigarzneimittel wurden mit 5 mL Methanol versetzt, 10 min im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde mit Methanol durch Waschen des Filters auf 10,0 mL ergänzt.

Referenzsubstanzen: Actein, 27-Deoxyactein

Referenzlösungen:

1 mg Actein wurde in 10 mL Ethanol 60 % gelöst.

1 mg 27-Deoxyactein wurde in 10 mL Methanol gelöst.

Die Referenzlösung wurde vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Probenauftragung: Auftragesystem ATS4, 8 mm Banden,

Untersuchungslösung (en): 2 µL

Referenzlösung Actein: 5 µL

Referenzlösung 27-Deoxyactein: 4 µL

Nach dem Probenauftragen wurde die Platte 5 min unter ambienten Bedingungen getrocknet.

Chromatographie: gesättigte Doppeltrogkammer, Trennstrecke 6 cm. Nach beendeter Chromatographie wurde die Platte im Warmluftstrom getrocknet, bis der Fließmittelgeruch verfliegen war.

Detektion: Weißlicht nach der Derivatisierung mit Anisaldehyd - Reagenz.

Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd - Reagenz.

Dokumentation: Videodokumentationssystem

Kamerakonfiguration:

Aufnahme
Digitalisierkarte prism32
Kamera ccir Color 3CCD HV-C20
Einstellungen Belichtungszeit: 1 Vollbilder
Belichtungszeit: 0.040 Sekunden
Bildakkumulation: An
(Stopp Bild bei Sättigung: An)
(Stopp Pixel bei Sättigung: Aus)
HV-C20 Betriebsart: Manuell
HV-C20 AGC: Aus
HV-C20 Maximum: +18 dB
HV-C20 Verstärkung: Ein
HV-C20 Wert: +1 dB
HV-C20 Weissabgleich: Gespeichert
HV-C20 Belichtungszeit: Aus
HV-C20 Zeit: 1/100 sec
HV-C20 Gamma: Aus
HV-C20 Kontrast: Aus
HV-C20 DTL: Normal
HV-C20 Korrektur: Farbe
Rothelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Rotkontrast der Digitalisierkarte: 0
Rotpegel der Digitalisierkarte: 128

Grünhelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Grünkontrast der Digitalisierkarte: 0
Grünpegel der Digitalisierkarte: 128
Blauhelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Blaukontrast der Digitalisierkarte: 0
Blaupegel der Digitalisierkarte: 128

Verfahren VII (Hydroxycimtsäurederivate in Traubensilberkerzenwurzelstock):

Fließmittel: FM 7

Untersuchungslösung:

500 mg pulverisierte Droge (Siebanalyse gemäß Ph. Eur., Zerkleinerungsgrad "feinst gemahlen") oder die entsprechende Menge Extrakt bzw. Fertigarzneimittel wurden mit 5 mL Ethanol 50 % versetzt, 10 min im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde mit Ethanol 50 % durch Waschen des Filters auf 10,0 mL ergänzt.

Referenzsubstanzen: Kaffeesäure, Isoferulasäure.

Referenzlösungen:

1 mg Kaffeesäure wurde in 10 mL Methanol gelöst.

1 mg Isoferulasäure wurde in 10 mL Methanol gelöst.

Die Referenzlösungen wurden vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Probenauftragung: Probenauftragesystem ATS 4, 8 mm Banden,

Untersuchungslösung (en): 2 µL, Referenzlösung Isoferulasäure: 4 µL,

Referenzlösung Kaffeesäure: 2 µL.

Nach dem Probenauftragen wurde die Platte 5 min unter ambienten Bedingungen getrocknet.

Chromatographie: gesättigte Doppeltrogkammer, Trennstrecke 6 cm. Nach beendeter Chromatographie wurde die Platte im Warmluftstrom getrocknet, bis der Fließmittelgeruch verflogen war.

Detektion: UV $\lambda=366$ nm (UV₃₆₆) nach der Derivatisierung

Derivatisierungsreagenz: Naturstoffreagenz I

Dokumentation: Videodokumentationssystem

Kamerakonfiguration:

Aufnahme
Digitalisierkarte prysm32
Kamera ccir Color 3CCD HV-C20
Einstellungen Belichtungszeit: 12 Vollbilder
Belichtungszeit: 0.480 Sekunden
Bildakkumulation: An
(Stopp Bild bei Sättigung: An)
(Stopp Pixel bei Sättigung: Aus)
HV-C20 Betriebsart: Manuell
HV-C20 AGC: Aus
HV-C20 Maximum: +18 dB
HV-C20 Verstärkung: Ein
HV-C20 Wert: + 1 dB
HV-C20 Weissabgleich: Automatisch
HV-C20 Belichtungszeit: Aus
HV-C20 Zeit: 1/100 sec
HV-C20 Gamma: Aus
HV-C20 Kontrast: Ein
HV-C20 DTL: Normal
HV-C20 Korrektur: Farbe
Rothelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Rotkontrast der Digitalisierkarte: 0
Rotpegel der Digitalisierkarte: 128
Grünhelligkeit der Digitalisierkarte: 128

Grünkontrast der Digitalisierkarte: 0
Grünpegel der Digitalisierkarte: 128
Blauhelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Blaukontrast der Digitalisierkarte: 0
Blaupegel der Digitalisierkarte: 128

Verfahren VIII (Schomakers et al. 1995) (Flavonoide und Hydroxyzimtsäurederivate in Brennesselblättern):

Fließmittel: FM 8

Untersuchungslösung:

200 mg Droge wurden fein zerkleinert (Sieb 5) und mit 10 mL Methanol 80 % für 45 min im Ultraschallbad extrahiert. Der Extrakt wurde filtriert.

Referenzsubstanzen: Kaffeesäure, Kaffeoyläpfelsäure, Isoquercitrin, Chlorogensäure, Rutin

Probenauftragung: 15-20 µL

Chromatographie: DC - Aluminium Fertigplatten 60 F254

Detektion: Direktauswertung über Vis, UV-Licht $\lambda=254$ nm respektive $\lambda=366$ nm

Derivatisierung: Naturstoffreagenz II.

Verfahren IX (Kaffeoyläpfelsäure, Scopoletin und Flavonoide in Brennnesselblättern):

Fließmittel: FM 9

Untersuchungslösung:

500 mg pulverisierte Droge (Siebanalyse gemäß Ph. Eur., Zerkleinerungsgrad "feinst gemahlen") oder die entsprechende Menge Extrakt bzw. Fertigarzneimittel wurden mit 10 mL Ethanol 70 % versetzt, 10 min im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde unter Vakuum zur Trockne einrotiert und in 1 mL Ethanol 70 % wieder aufgenommen.

Referenzsubstanzen:

Scopoletin, Kaffeoyläpfelsäure, Chlorogensäure, Rutin

Vergleichssubstanzen: Hyperosid

Referenzlösungen: Je 1 mg Referenzsubstanz wurde in je 10 mL Methanol gelöst. Die Referenzlösungen wurden vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Probenauftragung: Auftragesystem ATS4, 8 mm Banden, Untersuchungslösung (en) : 2 µL, Referenzlösung Scopoletin: 1 µL, Referenzlösung Kaffeoyläpfelsäure: 3 µL, Referenzlösung Chlorogensäure: 2 µL, Vergleichslösung Hyperosid: 10 µL, Referenzlösung Rutosid: 10 µL.

Nach dem Probenauftragen wurde die Platte 5 min unter ambienten Bedingungen getrocknet.

Chromatographie: gesättigte Doppeltrogkammer, Trennstrecke 6 cm. Nach beendeter Chromatographie wurde die Platte im Warmluftstrom getrocknet, bis der Fließmittelgeruch verflogen war.

Detektion: UV $\lambda=366$ nm (UV₃₆₆) unmittelbar nach der Derivatisierung.

Derivatisierungsreagenz: Naturstoffreagenz I und Macrogollösung.

Dokumentation: Videodokumentationssystem

Kamerakonfiguration:

Aufnahme
Digitalisierkarte prysm32
Kamera ccir Color 3CCD HV-C20
Einstellungen Belichtungszeit: 7 Vollbilder
Belichtungszeit: 0,280 Sekunden
Bildakkumulation: An
(Stopp Bild bei Sättigung: An)
(Stopp Pixel bei Sättigung: Aus)
HV-C20 Betriebsart: Manuell
HV-C20 AGC: Aus
HV-C20 Maximum: +18 dB
HV-C20 Verstärkung: Ein
HV-C20 Wert: +1 dB
HV-C20 Weissabgleich: Automatisch
HV-C20 Belichtungszeit: Aus
HV-C20 Zeit: 1/100 sec
HV-C20 Gamma: Aus
HV-C20 Kontrast: Aus
HV-C20 DTL: Normal
HV-C20 Korrektur: Farbe
Rothelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Rotkontrast der Digitalisierkarte: 0
Rotpegel der Digitalisierkarte: 128

Grünhelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Grünkontrast der Digitalisierkarte: 0
Grünpegel der Digitalisierkarte: 128
Blauhelligkeit der Digitalisierkarte: 128
Blaukontrast der Digitalisierkarte: 0
Blaupegel der Digitalisierkarte: 128

2.17 Validierung qualitativer Dünnschichtchromatographie (Ein Validierungsplan und zugehörige Qualitätssicherungsdokumente sind im Anhang aufgeführt.)

2.17.1 Selektivität

Für die Selektivitätsprüfung der Identitätsprüfung einer Arzneidroge wurde der Fingerprint der zu analysierenden Droge mit dem Fingerprint des authentischen Drogenmaterials verglichen. Sofern kein authentisches Material vorlag, wurde der Fingerprint der Droge anhand der Zonen von Referenzsubstanzen charakterisiert. Bei Drogen mit einem anerkannten Wirkprinzip wurden Referenzsubstanzen der

Wirkstoffe bzw. des Wirkstoffes verwendet. Bei Drogen ohne allgemein anerkanntes Wirkprinzip, aber mit anerkannten charakteristischen Leitsubstanzen, wurden Referenzsubstanzen der Leitsubstanzen verwendet. Bei Drogen für die weder ein anerkanntes Wirkprinzip noch Leitsubstanzen bekannt waren, war die Identifizierung nur anhand von Referenzsubstanzen nicht möglich. Für diese Drogen musste authentisches Drogenmaterial verwendet werden, um eine eindeutige Identifizierung zu gewährleisten.

Um Verunreinigungen respektive Verfälschungen der Droge zu erkennen, wurde der Fingerprint der zu prüfenden Droge mit den Fingerprints von Drogen anderer Taxa und/oder Chemotypen mit gleichem oder ähnlichem Inhaltsstoffmuster verglichen. Die Fingerprints mussten eindeutig zu differenzieren sein.

Die Untersuchungssubstanzen wurden alle parallel auf einer Platte chromatographiert.

Für die Selektivitätsprüfung der Identitätsprüfung eines Extraktes wurde der Fingerprint des zu analysierenden Extraktes mit dem Fingerprint des authentischen Extraktmaterials oder mit dem Fingerprint des authentischen Drogenmaterials verglichen. Sofern kein authentisches Material vorlag, wurden entsprechend den Prüfungen der Droge Referenzsubstanzen verwendet. Durch Chromatographie der verwendeten Stellmittel wurde nachgewiesen, dass die Detektion nicht durch die Stellmittel gestört wurde. Die Untersuchungssubstanzen wurden alle parallel auf einer Platte chromatographiert.

Die Selektivitätsprüfung der Identitätsprüfung eines Fertigarzneimittels mit einem Extrakt als Wirkstoff (Monopräparat) wurde analog der Selektivitätsprüfung der Identitätsprüfung eines Extraktes durchgeführt. Durch Chromatographie der verwendeten Hilfsstoffe wurde nachgewiesen, dass die Detektion nicht durch Hilfsstoffe gestört wurde.

2.17.2 Robustheit

Stabilität des Analyten vor der Chromatographie in Lösung und auf der Platte

Die Probe wurde zum Zeitpunkt Null aufgearbeitet und auf einer HPTLC - Platte aufgetragen (Untersuchungslösung 1).

Untersuchungslösung 1 wurde bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Probengläschen aufbewahrt.

Die selbe Probe wurde nach 4 Stunden noch einmal aufgearbeitet (Untersuchungslösung 2) und ebenfalls direkt auf der Platte neben Untersuchungslösung 1 aufgetragen.

Die Untersuchungslösungen 1 und 2 wurden nochmals nebeneinander auf die HPTLC - Platte aufgetragen. Insgesamt waren auf der Platte 4 Startbanden.

Die Platte wurde entwickelt, detektiert und dokumentiert.

Auswertung:

Auf der Platte waren 4 Fingerprints zu sehen. Zwei Fingerprints zeigten die Stabilität des Analyten auf der Platte, die anderen beiden die Stabilität des Analyten in der Untersuchungslösung.

Als Annahmekriterium galt, dass die Fingerprints vergleichbar waren.

Stabilität des Analyten während der Chromatographie

Der Nachweis wurde durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie geführt.

2µL der Probelösung wurden punktförmig in der linken unteren Ecke einer 10 x 10 cm großen HPTLC - Platte aufgetragen. Die Auftragung erfolgte im Abstand von je 1 cm zum linken und 1 cm zum unteren Plattenrand. Die Platte wurde über eine Strecke von 6 cm vom unteren Plattenrand aus entwickelt und anschließend getrocknet bis der Geruch des Fließmittels verschwunden war.

Die Platte wurde um 90° nach links gedreht und noch einmal 6 cm vom unteren Plattenrand aus entwickelt (frisches Fließmittel!).

Auswertung:

Die Zonen im Chromatogramm lagen auf der Geraden, die die Auftrageposition mit dem Schnittpunkt der Fließmittelfronten verband.

Plattenmaterial

Für die Chromatographie wurden Platten der Hersteller Merck und Macherey-Nagel verwendet.

Annahmekriterien:

Die Chromatogramme der verschiedenen Platten waren vergleichbar in Bezug auf Lage und Farbe der Zonen, Farbe des Plattenhintergrundes und eventuell auftretende α - und / oder β -Fronten.

Temperatur und Luftfeuchtigkeit

Die Durchführung der Chromatographie erfolgte unter extremen, aber realistischen Temperatur- und Feuchtigkeitsunterschieden. An einem Tag wurden fünf Chromatogramme entwickelt.

Annahmekriterien:

Die Chromatogramme entsprachen einander in Bezug auf Lage, Farbe, Intensität und Anzahl der Zonen.

Kammersättigung und Kammertyp

Die Durchführung der Chromatographie erfolgte in der Horizontal-Entwicklungskammer und in der Doppeltrogkammer, einmal im gesättigten und einmal im ungesättigten Zustand. Zusätzlich wurde die Chromatographie in der Horizontal-Entwicklungskammer in Sandwich-Konfiguration durchgeführt.

Annahmekriterien:

Die Fingerprints der Chromatogramme, die in den gesättigten Kammern entwickelt wurden, waren vergleichbar in Bezug auf Anzahl, Farbe und Intensität der Zonen.

Die Fingerprints der Chromatogramme, die in den ungesättigten Kammern entwickelt wurden, waren ebenfalls vergleichbar in Bezug auf Anzahl, Farbe und Intensität der Zonen.

Die Fingerprints der Chromatogramme, die in der Horizontal-Entwicklungskammer in Sandwich-Konfiguration entwickelt wurden, waren mit den Fingerprints der Chromatogramme, die in den gesättigten Kammern entwickelt wurden, vergleichbar in Bezug auf Anzahl, Farbe und Intensität der Zonen.

Mobile Phase

Die entsprechende Menge Fließmittel für mindestens zwei Entwicklungen wurde hergestellt. Zum Zeitpunkt 0 und nach 18 respektive 24 Stunden wurde eine Platte unter Verwendung des Fließmittels chromatographiert.

Annahmekriterien:

Die Chromatogramme stimmten überein in Bezug auf Anzahl, Lage, Farbe und Intensität der Zonen.

Trennstrecke

Bei der Durchführung der Chromatographie wurde die Trennstrecke um 1 bzw. 2 cm verlängert. Die Fingerprints wurden mit dem Fingerprint eines Chromatogramms verglichen, das unter genauer Einhaltung der vorgeschriebenen Trennstrecke entwickelt wurde.

Annahmekriterien:

Die Fingerprints waren vergleichbar in Bezug auf die Lage der Zonen.

Trockenzeiten

Bei der Chromatographie von drei Platten wurden die folgenden Zeiten abweichend von der Vorschrift um 5 min verlängert:

Platte 1: Zeit zwischen Auftragung und Entwicklung

Platte 2: Zeit zwischen Entwicklung und Detektion

Platte 3: Zeit zwischen Detektion und Dokumentation.

Die Chromatogramme wurden mit denen verglichen, die unter Einhaltung der vorgeschriebenen Zeiten chromatographiert wurden.

Annahmekriterien:

Die Fingerprints stimmten überein in Bezug auf die Anzahl, Lage, Farbe, und Intensität der Zonen.

Die Farbe des Plattenhintergrundes war vergleichbar.

Derivatisierung

Bei der Chromatographie von drei Platten wurde die vorgeschriebene Temperatur für die Trocknung auf dem Plattenheizer nach der Derivatisierung nach oben und nach unten variiert.

Annahmekriterien:

Die Farben der Zonen in den Chromatogrammen und der Plattenhintergrund waren vergleichbar.

2.17.3 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit einer Methode wurde anhand von Ringversuchen überprüft.

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit des dünnenschichtchromatographischen Verfahrens zur Bestimmung der phenolischen Inhaltsstoffe in Bärentraubenblätterextrakt wurden zwei Ringversuche durchgeführt. Ein Ringversuch zu Beginn der Methodenoptimierung und ein zweiter am Ende. An dem ersten Ringversuch nahmen 9 Labors teil, an dem zweiten 14 Labors. Die einzelnen Labors erhielten neben der Prüfvorschrift eine Extraktprobe als Untersuchungsmuster und auf Anfrage Proben der Referenzsubstanzen.

Prüfvorschrift Ringversuch Bärentraubenblätterextrakt I

Stationäre Phase : HPTLC - Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ Firma Merck 20 x 10 cm bzw. 10x10 cm

Vorwaschen : Methanol/Ethylacetat zu gleichen Volumenteilen, 1 Stunde.

Trocknen der Platte im Trockenschrank bei 120 °C für 30 min., anschließend im Exsikkator aufbewahren.

Entwicklung : gesättigte vorkonditionierte Horizontal-Entwicklungskammer CAMAG 20x10 cm und 10x10 cm

Untersuchungslösung :

Ca. 500 mg Extrakt wurden mit 25 mL Lösungsmittel (Methanol und Wasser zu gleichen Volumenteilen) 10 min maschinell geschüttelt und anschließend filtriert (Rundfilter, Größe 9 cm, Porenweite MN 617, Macherey-Nagel). Das

Filtrat wurde unter Nachwaschen des Filters und des Kolbens mit der Methanol - Wasser Mischung auf 25,0 mL aufgefüllt.

Referenzsubstanzen: Arbutin R (Ph. Eur.), Gallussäure R (Ph. Eur.), Hydrochinon R (Ph. Eur.)

Referenzlösungen :

Arbutin ca. 50 mg in 10,0 ml Methanol

Gallussäure ca. 15 mg in 10,0 ml Methanol

Hydrochinon ca. 20 mg in 10,0 ml Methanol

Auftragungsmengen : Untersuchungslösung 5 µl, Referenzlösung 3 µl,

Bandbreite 10 mm

Fließmittel : Ethylacetat, Ameisensäure, Wasser (9:1:0,6 V/V/V), 4 ml als Fließmittel, 20 mL für die Konditionierung der Platte

Trennstrecke : 5 cm

Laufzeit: ca. 15 min

Trocknung : Bei 120 °C bis der Geruch nach Ameisensäure verfliegen ist, Platte auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

Sprühreagenzien: Dichlorchinonchlorimidlösung 1 % (m/V) in Methanol, anschließend direkt Natriumcarbonatlösung 10 % (m/V) in Wasser (Verwendung einer feinen Düse zum Besprühen, z. B. Roth Art. Nr. N 528 Ø 0,50 mm)

Dokumentation: Im Weißlicht

Auswertung: Arbutin zeigte im Chromatogramm eine blaue Zone zwischen den R_f - Werten 0.3 und 0.4. Gallussäure eine braune Zone bei R_f ca. 0,7 und Hydrochinon eine blaue Zone bei R_f ca. 0,8. Das Chromatogramm der Untersuchungslösung zeigte drei Zonen, die in Bezug auf Lage und Farbe den Zonen in den Chromatogrammen der Referenzlösungen entsprachen. Im Chromatogramm der Untersuchungslösung waren weitere braune und eine blaue Zone zu erkennen.

Prüfvorschrift Ringversuch Bärentraubenblätterextrakt II

Stationäre Phase: HPTLC - Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ Firma Merck 20 x 10 cm bzw. 10x10 cm

Vorwaschen : Methanol/Ethylacetat zu gleichen Volumenteilen, 1 Stunde.

Trocknen der Platte im Trockenschrank bei 120 °C für 30 min., anschließend im Exsikkator aufbewahren.

Entwicklung: Doppeltröglkammer, 10 min gesättigt mit Filterpapier oder Horizontal Entwicklungskammer, gesättigt.

Untersuchungslösung :

Ca. 200 mg Extrakt wurden mit 10 mL Lösungsmittel (Methanol und Wasser zu gleichen Volumenteilen) 10 min maschinell geschüttelt oder im Ultraschallbad behandelt und anschließend filtriert (Rundfilter). Das Filtrat wurde unter Nachwaschen des Filters und des Kolbens mit der Methanol - Wasser Mischung auf 10,0 mL aufgefüllt.

Referenzsubstanzen :

Arbutin R (Ph. Eur.)

Gallussäure R (Ph. Eur.)

Hydrochinon R (Ph. Eur.)

Referenzlösungen :

Arbutin ca. 1 mg in 10,0 ml Methanol

Gallussäure ca. 1 mg in 10,0 ml Methanol

Hydrochinon ca. 1 mg in 10,0 ml Methanol

Auftragungsmengen :

Untersuchungslösung 5 µl, Referenzlösung 3 µl, Bandbreite 8 mm

Fließmittel :

Ethylacetat, Ameisensäure, Wasser (88:6:6 V/V/V), 2 X 5 mL.

Trennstrecke: 5 cm

Laufzeit: ca. 10 min

Trocknung: Bei 120 °C bis der Geruch nach Ameisensäure verflogen ist,

Platte auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

Sprühreagenzien : Dichlorchinonchlorimidlösung 1 % (m/V) in Methanol, anschließend direkt Natriumcarbonatlösung 10 % (m/V) in Wasser.

Derivatisierung durch Tauchen war nicht möglich, aufgrund der wässrigen Carbonatlösung.

Dokumentation: Im Weißlicht

Auswertung :

Arbutin zeigte im Chromatogramm eine blaue Zone zwischen den R_f - Werten 0.2 und 0.3 Gallussäure eine braune Zone bei R_f ca. 0,7 und Hydrochinon eine blaue Zone bei R_f ca. 0,8. Das Chromatogramm der Untersuchungslösung zeigte drei Zonen, die in Bezug auf Lage, Form und Farbe denen der Referenzlösungen entsprachen. Im Chromatogramm der Untersuchungslösung waren weitere braune und eine blaue Zone zu erkennen.

2.18 Validierung quantitativer Dünnschichtchromatographie

Im Rahmen der Validierung der Methode zur quantitativen Hydrochinonbestimmung in Fertigarzneimitteln, die Bärentraubenblätterextrakt enthalten, wurden die folgenden Prüfungen durchgeführt.

Die Absorptionmessungen wurden bei $\lambda=288$ nm (Absorptionsmaximum der Substanz Hydrochinon) durchgeführt.

Selektivität

Zur Überprüfung der Selektivität wurden der Extrakt, das Fertigarzneimittel, die Placebomischung, die Placebomischung mit Hydrochinon und das reine Lösungsmittel parallel auf einer Platte chromatographiert.

Kalibrierfunktion

Die Kalibrierfunktion wurde anhand von sieben Konzentrationen einer methanolischen Hydrochinonlösung erstellt (13,49 mg Hydrochinon in 100 mL Methanol). Die geringste und die höchste Konzentration wurden sechsfach auf die Platte aufgetragen, die vier mittleren Konzentrationen doppelt. Absolute Mengen an

Hydrochinon der einzelnen Zonen: 134,9 ng; 337,25 ng; 674,5 ng; 1011,75 ng; 1349,00 ng; 1686,25 ng; 2023,5 ng.

Die Chromatographie aller Proben erfolgte parallel auf einer Platte.

Nachweisgrenze

Es wurde die Mindestkonzentration an Hydrochinon bestimmt, die in der reinen Stammlösung und in dem Extrakt nachgewiesen werden konnte. Die Bestimmung erfolgte sowohl densitometrisch als auch visuell.

Linearität

Die Linearität wurde anhand von fünf Konzentrationsstufen bestimmt. Jede Konzentrationsstufe wurde doppelt aufgearbeitet und doppelt auf die Platte aufgetragen. Die Chromatographie aller Proben erfolgte parallel auf einer Platte.

Vergleichspräzision

Zur Überprüfung der Systempräzision wurden sechs Proben mit einer Konzentration von 100 % analysiert. Die Proben wurden doppelt aufgearbeitet und doppelt aufgetragen. Die Chromatographie aller Proben erfolgte parallel auf einer Platte.

Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision wurde anhand von drei Konzentrationsstufen bestimmt. Jede Konzentrationsstufe wurde dreifach aufgearbeitet und doppelt aufgetragen. Die Chromatographie aller Proben erfolgte parallel auf einer Platte.

Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde anhand der Wiederfindung überprüft.

Zur Überprüfung der Wiederfindung wurde der Extrakt mit zur Arzneiform äquivalenten Mengen Hilfsstoffmischung versetzt. Es wurden Proben in drei Konzentrationsstufen jeweils dreifach aufgearbeitet. Die Chromatographie aller Proben erfolgte parallel auf einer Platte.

2.19 Isolierung von Referenzsubstanzen für die Dünnschichtchromatographie

Aus frischem Brennnesselkraut wurde die Substanz Kaffeoyläpfelsäure isoliert und anschließend identifiziert.

Die Brennnesseln wurden in Sinzig (Deutschland) gesammelt und mit Hilfe der Literatur (Rothmaler et al. 1988) als *Urtica dioica* identifiziert. Das Herbarmaterial wurde in den Geschäftsräumen der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e. V. in Sinzig hinterlegt.

Das gesammelte Brennnesselkraut von *Urtica dioica* wurde für ca. 2 Stunden bei -20°C tiefgefroren. Anschließend wurde an der Gefriertrocknung bei -80°C das Wasser entzogen. Hierbei reduzierte sich die Masse auf etwa 20-25 % der Anfangsmasse. Die gefriergetrockneten Brennnesseln wurden zerkleinert und die Stiele zerschnitten. Da Kaffeoyläpfelsäure lichtempfindlich ist, wurde - soweit möglich - unter Lichtschutz gearbeitet.

In einem großen Becherglas wurde unter Rühren mit einem Methanol-Wasser Gemisch (60:40) in drei Schritten extrahiert. Für den ersten Schritt verwendete man für ca. 10 g getrocknete Brennnesseln etwa 400 mL Extraktionsmittel, für den zweiten und den dritten Extraktionsschritt etwa 30 mL. Die einzelnen Extraktionsschritte dauerten etwa 1 Stunde. Den Extraktlösungen wurde am Rotationsverdampfer bei 100 mbar das Methanol entzogen; die Wasserbadtemperatur betrug 35°C . Die verbleibende Wasserphase wurde tiefgefroren und gefriergetrocknet. Der so erhaltene Trockenextrakt war stark hygroskopisch und wurde daher dicht verschlossen gelagert.

Um im weiteren Verlauf der Isolierung die einzelnen Produktfraktionen farblich besser unterscheiden zu können und um unnötige Verunreinigungen der Säulen zu vermeiden, wurde der größte Teil des Chlorophylls aus dem Extrakt abgetrennt. Hierzu wurden 10 g Trockenextrakt viermal mit jeweils 100 mL Ethylacetat geschüttelt. Das Ethylacetat wurde abgedampft.

Trennung über eine Polyamidsäule:

Für eine 55 cm lange Säule (6 cm Innendurchmesser) ließ man etwa 250 g Polyamid SC 6 über Nacht mit Wasser quellen, die Säule wurde nass gepackt.

Der Extrakt wurde in einer möglichst geringen Menge Wasser gelöst (ca. 0,5-1g / mL) und auf die Säule gegeben.

Mit den folgenden Lösungsmitteln wurde in der genannten Reihenfolge eluiert:

Wasser 2 L (gesammelte Fraktionsgröße je 200 mL)

Methanol 25 % 0,5 L (Fraktionsgröße 500 mL)

Methanol 50 % 0,5 L (Fraktionsgröße 500 mL)

Methanol 75 % 0,5 L (Fraktionsgröße 500 mL)

Methanol 100 % 1,5 L (gesammelte Fraktionsgröße je 500 mL)

Methanol 75 % + NH₃ 1 %, 1 L (gesammelte Fraktionsgröße je 200 mL)

Die Kaffeoyläpfelsäure wurde mit dem letzten Lösungsmittel (Methanol/Ammoniak) von der Säule eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden eingedampft.

Die Gesamtdauer der Trennung betrug ca. 12 Stunden. Anschließend wurde die Säule mit Wasser gereinigt.

Reinigung über eine Sephadexsäule:

Die Rückstände der einzelnen Fraktionen wurden in einem Gemisch aus gleichen Teilen Ethanol und Wasser gelöst und über eine Sephadex LH 20-Säule gereinigt.

Für eine 30 cm lange Säule ließ man etwa 100 g Sephadex LH 20 über Nacht mit einer Mischung aus gleichen Teilen Wasser und Ethanol 96 % quellen, die Säule wurde nass gepackt.

Elutionsmittel war ein Gemisch aus gleichen Teilen Ethanol 96 % und Wasser; die Geschwindigkeit betrug etwa 1 mL/min. Die kaffeoylhaltigen Fraktionen erkannte man an der braunen Färbung der Lösung. Diese Fraktionen wurden miteinander vereint und bis zur Wasserphase einrotiert. Anschließend wurde die Substanz tiefgefroren und gefriergetrocknet.

Die Kaffeoyläpfelsäure wurde bei -18°C dicht verschlossen und vor Licht geschützt gelagert.

2.19.1 Kontrolle der Fraktionen

Die Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie und mittels HPLC auf das Vorhandensein von Kaffeoyläpfelsäure kontrolliert.

Dünnschichtchromatographie

Fließmittel: FM 9

Probenauftragung: Auftragesystem ATS 4, 8 mm Banden, 15 µL Untersuchungslösung.

Chromatographie: 20 x 10 cm Doppeltrogkammer, gesättigt, Trennstrecke 6 cm. Nach beendeter Chromatographie wurde die Platte im Warmluftstrom getrocknet, bis das Fließmittel verfliegen war.

Detektion: UV-Licht $\lambda=366$ nm nach der Derivatisierung

Derivatisierungsreagenz: Naturstoffreagenz I

Dokumentation: Videodokumentationssystem

HPLC

Die einzelnen Fraktionen wurden mit dem unter 2.2 aufgeführten HPLC-System analysiert.

Fließmittel A: wässrige Phosphorsäure (pH 2)

Fließmittel B: Acetonitril

t [min]	Fließmittel B [%]	
0,0	25	Linear bis
30	100	Isokratisch bis
70	100	Linear bis
78	10	Isokratisch bis
88	10	Ende

Vorsäule: Merck LiChroCART 100RP – 19 endcapped, 4 X 4 mm

Säule: Merck Superspher 100RP – 19 endcapped, 125 X 4 mm

Temperatur: Säule bei 20°C

Detektion: UV - Licht bei $\lambda=330$ nm

Flussrate: 1 mL·min⁻¹

Injektionsvolumen: 10µL

2.19.2 Identifizierung der Kaffeoyläpfelsäure mittels NMR, MS und IR

IR-Spektroskopie

Zur Identifizierung funktioneller Gruppen der Kaffeoyläpfelsäure wurde IR-Spektroskopie eingesetzt. 0,5 mg der isolierten Substanz wurden mit 100 mg Kaliumbromid in einem Achat-Mörser verrieben. Aus diesem Gemisch wurde ein Pressling hergestellt.

NMR-Spektroskopie

Es wurden ein H-NMR- und ein C-NMR-Spektrum von der Kaffeoyläpfelsäure aufgenommen. Die Substanz wurde in CD₃OD gelöst.

Massenspektroskopie

Sowohl positive, als auch negative FAB-MS wurde mit einem Waters Single Quadrupol Detektor durchgeführt. Mobile Phase: Acetonitril / Wasser (mit 0,01 % TFA) 1:1 (V/V), Flussrate 0,1 mL·min⁻¹. Die Probe wurde in der mobilen Phase gelöst.

Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind die folgenden Parameter im Teil 2 "Material und Methoden" detailliert beschrieben: Fließmittel (FM), Derivatisierungsreagenzien, Vorreinigen der Platten, Probenauftragung, Chromatogrammentwicklung, Derivatisierung und Dokumentation.

Die angewendeten Verfahren sind unter 2.16 aufgeführt. Die Durchführung der Validierung qualitativer dünnschichtchromatographischer Verfahren ist unter 2.17 beschrieben.

Alle untersuchten Proben sind im Anhang unter 10.1 aufgeführt.

3 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Arzneidroge "Bärentraubenblätter" und daraus hergestellten Zubereitungen

3.1 Optimierung

Das dünnschichtchromatographische Verfahren der Monographie "Bärentraubenblätter" des europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur. 4.00, 1054) und das Verfahren I zur Identitätsprüfung der Droge "Bärentraubenblätter" wurden miteinander verglichen.

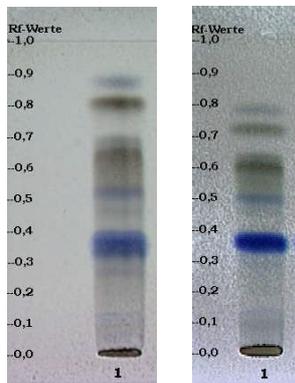
Die Verfahren wurden für die Identitätsprüfung eines Extraktes angewendet und optimiert. Es wurde überprüft, inwieweit das optimierte Verfahren für die Identitätsprüfung der Droge und des Fertigarzneimittels geeignet ist.

Die Untersuchungen zur Optimierung der Parameter "Fließmittel, Plattenmaterial, Trennstrecke, Entwicklungskammer" und "Derivatisierungsreagenz" wurden mit dem Extrakt (MA001-07) durchgeführt. Der Extrakt wurde gemäß dem Verfahren I aufgearbeitet. Die Probenauftragung erfolgte mit den Auftrageautomaten TLS 100 und ATS4. Die Trennstrecke wurde auf 8 cm festgelegt (Anpassung an die Größe der HPTLC-Platte). Die Chromatogrammentwicklung erfolgte in der gesättigten Horizontal-Entwicklungskammer. Die Derivatisierung wurde mit Dichlorchinonchlorimid-Reagenz durchgeführt. Auswertung und Dokumentation erfolgten nach der Derivatisierung im Weißlicht.

3.1.1 Fließmittel

Die Entwicklung der Chromatographie erfolgte mit den Fließmitteln FM 1 und FM 2. Im Chromatogramm waren nach Entwicklung der Chromatographie mit FM 2 deutlich schärfere Zonen zu erkennen als nach der Entwicklung mit FM 1 (Abbildung 3-1). Die oberen Zonen im Fingerprint lagen nach der Entwicklung mit FM 1 im R_f -Bereich von 0,8-0,9, nach der Entwicklung mit FM 2 im R_f -Bereich von 0,7-0,8. Zonen, die im oberen R_f -Bereich nahe der Fließmittelfront liegen, sind häufig nach der Derivatisierung nicht deutlich zu erkennen, da Interaktion mit der Fließmittelfront nie auszuschließen ist.

Für die weitere Durchführung der Chromatographie wurde FM 2 verwendet.



a) FM 1 b) FM 2

Abbildung 3-1: Fließmittelvergleich FM 1 und FM 2

3.1.2 Referenzsubstanzen

Es wurde überprüft, welche Referenzsubstanzen zur Identifizierung des Extrakts geeignet waren. Gemäß Arzneibuch (Ph. Eur. 4.00) werden die Substanzen Arbutin, Hydrochinon und Gallussäure zur Identifizierung der Droge verwendet. Neben diesen drei Substanzen wurden Benzochinon und Gallussäuremethylester als mögliche Referenzsubstanzen für die dünnschichtchromatographische Analyse untersucht. Benzochinon ist das Oxidationsprodukt des Hydrochinons. Da die Droge verschiedene Gallussäureester enthält, wurde Gallussäuremethylester als Beispiel für einen dieser Gallussäureester verwendet.

Die Referenzsubstanzen wurden parallel auf einer Platte chromatographiert (Abbildung 3-2). Die R_f -Werte der Zonen von Gallussäure und Gallussäuremethylester lagen so dicht beieinander, dass sie in einer Analyse nicht einzeln zu identifizieren waren. Die Zonen von Hydrochinon und Chinon lagen fast bei demselben R_f -Wert, daher wurde Chinon nicht als Referenzsubstanz für die Chromatographie verwendet.

Im weiteren Verlauf der Optimierung wurden die Referenzsubstanzen Arbutin, Gallussäure und Hydrochinon verwendet.

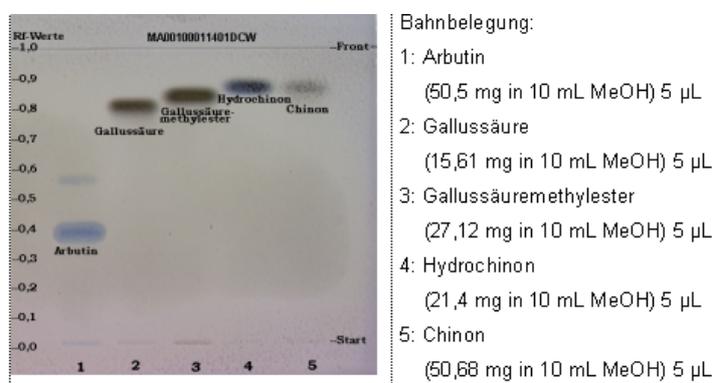


Abbildung 3-2: Referenz- und Vergleichssubstanzen der Droge Bärentraubenblätter.

3.1.3 Derivatisierungsreagenzien

Gemäß Verfahren I wurde die Derivatisierung mit Dichlorchinonchlorimidlösung durchgeführt. Gemäß Arzneibuch (Ph. Eur. 4.00) wird die Derivatisierung mit Dichlorchinonchlorimidlösung 1 % und anschließend Natriumcarbonatlösung 2 % (FM 2) durchgeführt. Da Dichlorchinonchlorimid giftig ist, wurden andere Reagenzien, wie Echtblausalz und NBD-Chlorid, die mit Phenolen ebenfalls Farbreaktionen geben, für die Derivatisierung verwendet.

Nach der Derivatisierung mit NBD-Chlorid Reagenz und Echtblausalzreagenz waren die Referenzsubstanzen Arbutin, Hydrochinon und Gallussäure im Fingerprint nicht deutlich zu erkennen (Abbildung 3-3).

Die Farbreaktion der Phenole mit Dichlorchinonchlorimidlösung lief nur in Verbindung mit einer alkalischen Lösung vollständig ab. Je höher die Konzentration der

Natriumcarbonatlösung war, desto weniger wässrige Lösung war notwendig, damit die Farbreaktion vollständig ablaufen konnte. Das Problem, dass die Zonen verliefen, wurde dadurch verringert. Alternativ wurde versucht, die Alkalisierung mit Ammoniak durchzuführen. Die Alkalisierung mit Ammoniakdämpfen ist jedoch nicht kontrollierbar, der Plattenhintergrund verfärbt sich sehr schnell dunkel. Im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit war diese Methode der Derivatisierung ungeeignet.

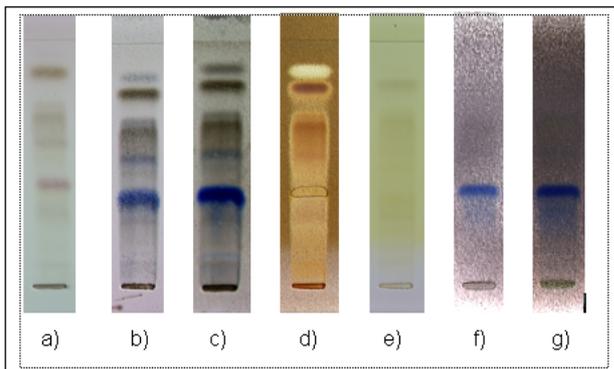


Abbildung 3-3: Vergleich unterschiedlicher Derivatisierungsreagenzien a) Dichlorchinonchlorimidlösung, b) Dichlorchinonchlorimidreagenz Ph. Eur., c) Dichlorchinonchlorimidreagenz, d) Echtblausalzreagenz, e) NBD-Clorid Reagenz, f) Dichlorchinonchlorimidlösung 1 % + Ammoniakdämpfe (10 %), g) Dichlorchinonchlorimidlösung 1 % + Ammoniakdämpfe (25 %).

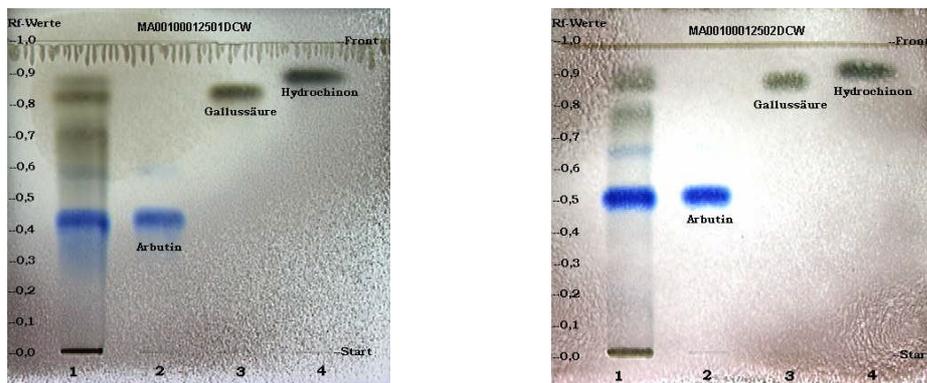
Die Methodenoptimierung wurde im Weiteren mit dem Dichlorchinonchlorimidreagenz (Dichlorchinonchlorimidlsg. 1 % und wässrige Carbonatlsg. 10 %) durchgeführt, da die Derivatisierungsreaktion mit diesem Reagenz optimal ablief.

3.1.4 Plattenmaterial

Da die HPTLC-Platten der Firma Merck zu spät bestellt und daher zunächst nicht verfügbar waren, wurden für die Chromatographie anfangs neben diesen auch Platten der Firma Macherey-Nagel verwendet.

Die Chromatographie mit den verschiedenen Platten wurde mehrfach durchgeführt. Exemplarisch sind zwei chromatographische Ergebnisse in Abbildung 3-4 dargestellt.

Auf der Platte MA00100012501 waren nach der Derivatisierung an der Fließmittelfront Verunreinigungen zu erkennen, die die Chromatographie störten. Auf der Platte MA00100012502 war eine gerade Fließmittelfront zu erkennen; die Detektion wurde nicht gestört. Die Probleme mit der Fließmittelfront traten bei allen Chromatographien auf, die mit den Platten der Firma Macherey-Nagel durchgeführt wurden. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen ausschließlich mit den Platten der Firma Merck gearbeitet.



a) MA00100012501 (Macherey-Nagel)

b) MA00100012502 (Merck)

Abbildung 3-4: Vergleich von DC-Platten unterschiedlicher Hersteller.

3.1.5 Trennstrecke

Die Trennstrecke wurde von 8 cm auf 5 cm verringert. In der Theorie ist eine Trennstrecke von 5-6 cm für eine optimale Trennung der Zonen im Fingerprint ausreichend. Weiter wurde überprüft, inwieweit sich ein Nichteinhalten der vorgegebenen Trennstrecke (sogenanntes "Überlaufen") auf die Lage der Zonen im Fingerprint auswirkte.

Die Trennstrecke von 5 cm war ausreichend für eine Trennung der Zonen im Fingerprint (Abbildung 3-5). Das sogenannte Überlaufen der Platte um ca. 1 cm hatte keine Auswirkungen auf die Lage der Zonen im Fingerprint. Ein solcher Fingerprint könnte auch im Rahmen einer Stabilitätsuntersuchung verwendet werden, da es trotzdem gewährleistet wäre, dass alle Fingerprints der Stabilitätsstudie miteinander vergleichbar wären.

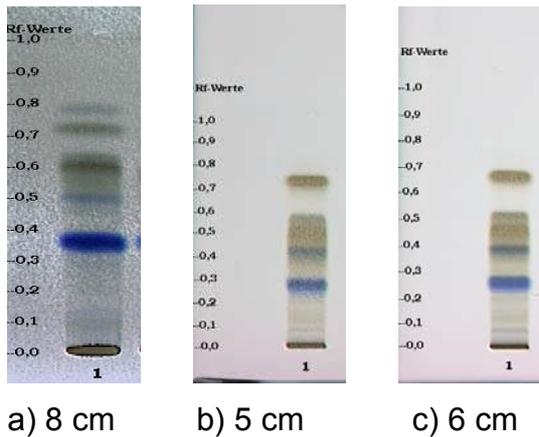
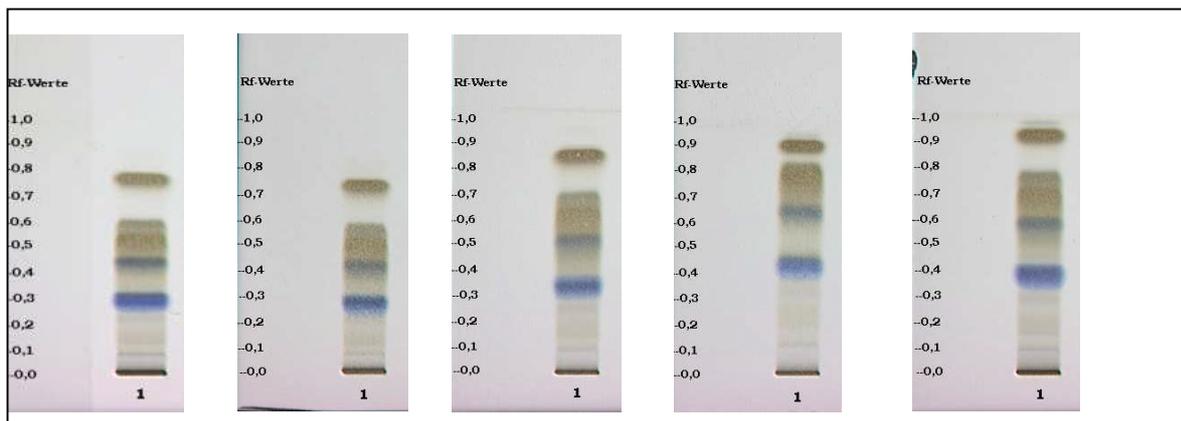


Abbildung 3-5: Fingerprintvergleich nach Entwicklung der Chromatographie über unterschiedliche Trennstrecken.

3.1.6 Entwicklungskammer

Eine Optimierung des Fingerprints erfolgte in Bezug auf die Lage, die Form und die Schärfe der Zonen. Die Chromatographie wurde in der Horizontal-Entwicklungskammer (HDC) und in der Doppeltrogkammer (TTC) unter ungesättigten und gesättigten Bedingungen durchgeführt. In der HDC erfolgte außerdem die Entwicklung in der sogenannten Sandwich-Konfiguration (Abbildung 3-6).



a) gesättigte HDC b) gesättigte TTC c) Sandwich HDC d) ungesättigte HDC e) ungesättigte TTC

Abbildung 3-6: Vergleich des Fingerprints der Droge Bärentraubenblätter, entwickelt in unterschiedlichen Kammern unter veränderten Konditionen; (a) gesättigte HDC, b) gesättigte TTC, c) HDC Sandwichkonfiguration, d) ungesättigte HDC, e) ungesättigte TTC.

Die Fingerprints der Chromatogramme, die in der gesättigten Doppeltrugkammer und in der gesättigten Horizontal-Entwicklungskammer entwickelt wurden, zeigten im unteren bis mittleren R_f -Bereich die schärfsten Zonen. Im oberen R_f -Bereich waren keine Zonen erkennbar.

Im Weiteren wurde die Chromatographie in der gesättigten Doppeltrugkammer oder alternativ in der gesättigten Horizontal-Entwicklungskammer durchgeführt.

3.1.7 Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung unter Anwendung von Hitze (Erhitzen unter Rückfluss) gemäß Ph. Eur. und die Aufarbeitung bei Raumtemperatur (RT) gemäß Verfahren I wurden sowohl mit der Droge MA001-03, als auch mit dem daraus hergestellten Extrakt MA001-10, dem Fertigarzneimittel MA001-11-3 und der Placebomischung MA001-14 durchgeführt. Für die Chromatogrammentwicklung wurde die Vorschrift gemäß Verfahren III angewendet.

In den Fingerprints der unterschiedlich aufgearbeiteten Proben zeigten sich keine Unterschiede bezüglich Position, Farbe und Form der Zonen (Abbildung 3-7). In den Fingerprints der Droge auf den Bahnen 1 und 2 waren Unterschiede in der Intensität der Zonen im oberen R_f -Bereich zu erkennen. Diese Intensitätsunterschiede sind nicht relevant für die Identitätsprüfung und die Stabilitätsprüfung. Es handelt sich hier um die Zonen der Gallussäureester, die in unterschiedlicher Zusammensetzung und Menge in der Droge vorhanden sind.

Da Droge, Extrakt, Fertigarzneimittel und Placebomischung untersucht wurden, wurde bei diesem Versuch auch gezeigt, dass das optimierte Verfahren ebenso für die Identitätsprüfung der Droge und des Fertigarzneimittels anwendbar ist.

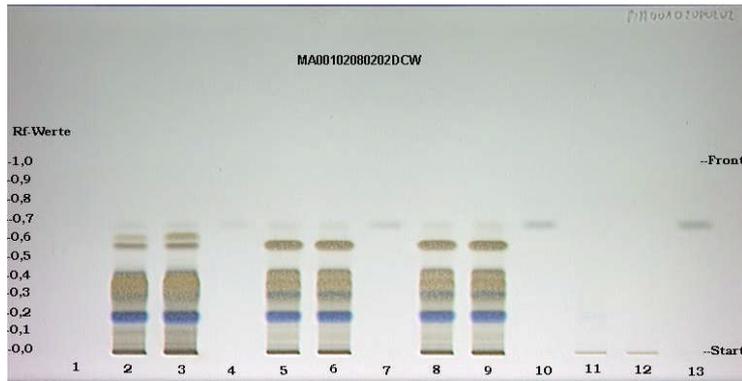


Abbildung 3-7: Dünnschichtchromatographischer Vergleich von Droge, Extrakt, Fertigarzneimittel und Placebomischung nach Probenaufarbeitung unter Anwendung von Hitze respektive bei Raumtemperatur; Droge bei RT aufgearbeitet (Bahn 2), Droge unter Hitze aufgearbeitet (Bahn 3), Extrakt bei RT aufgearbeitet (Bahn 5), Extrakt unter Hitze aufgearbeitet (Bahn 6), Fertigarzneimittel bei RT aufgearbeitet (Bahn 8), Fertigarzneimittel unter Hitze aufgearbeitet (Bahn 7), Hilfsstoffmischung bei RT aufgearbeitet (Bahn 11), Hilfsstoffmischung unter Hitze aufgearbeitet (Bahn 12), Hydrochinon (Bahn 1,4,7,10,13).

Gegenüber dem Verfahren des Europäischen Arzneibuchs erfolgte eine Optimierung der Probenaufarbeitung und der Chromatographie.

Die Probenaufarbeitung wurde in der Weise vereinfacht, dass kein Erhitzen der Probe mehr notwendig ist. Es konnte gezeigt werden, dass durch einfaches Extrahieren der Probe mit einem Methanol-Wasser Gemisch im Ultraschallbad die Inhaltsstoffe Arbutin, Gallussäureester und Hydrochinon ebenso in Lösung gehen, wie durch Extraktion unter Anwendung von Hitze.

Die Chromatographie wurde auf HPTLC - Platten durchgeführt. Daraus resultierend wurde die Trennstrecke verringert und die Entwicklungskammer angepasst. Die Zusammensetzung des Derivatisierungsreagenzes wurde so verändert, dass die Derivatisierungsreaktion optimiert ablief.

Das optimierte Verfahren zum dünnschichtchromatographischen Nachweis der phenolischen Inhaltsstoffe in Bärentraubenblättern und in den daraus hergestellten Zubereitungen ist im Anhang unter 10.4 aufgeführt.

3.2 Validierung

3.2.1 Selektivität

Zum Nachweis der Selektivität des Verfahrens II wurden folgende Proben parallel auf einer Platte chromatographiert: Droge MA001-03, daraus hergestellter Extrakt MA001-10 und Fertigarzneimittel MA001-11-3 und Placebomischung MA001-14. Als Referenzsubstanzen wurden Arbutin, Gallussäure und Hydrochinon verwendet (Abbildung 3-8).

Nach der Derivatisierung erkannte man im Weißlicht die Referenzsubstanzen Arbutin, Gallussäure und Hydrochinon. Die Zone des Arbutins war blau gefärbt und lag im unteren R_f -Bereich bei 0,2 - 0,3. Die Zone der Gallussäure war braun-grau gefärbt und lag im oberen R_f -Bereich bei ca. 0,7. Die Zone des Hydrochinons war grau gefärbt und lag im oberen R_f -Bereich bei ca. 0,8. Die Fingerprints der Untersuchungslösungen auf den Bahnen 1-3 zeigten jeweils Zonen, die denen des Arbutins, der Gallussäure und des Hydrochinons in Bezug auf Lage, Form und Farbe entsprachen. Die blaue Zone des Arbutins war in den Fingerprints der drei Untersuchungslösungen sehr intensiv; die Zone der Gallussäure war vor allem in den Fingerprints des Extraktes und des Fertigarzneimittels sehr intensiv. Die Zone des Hydrochinons war in allen drei Fingerprints nur sehr schwach zu erkennen.

Die Untersuchungslösung auf Bahn 4 zeigte keine Zonen. Die Detektion wurde also nicht durch die Hilfsstoffmischung gestört.

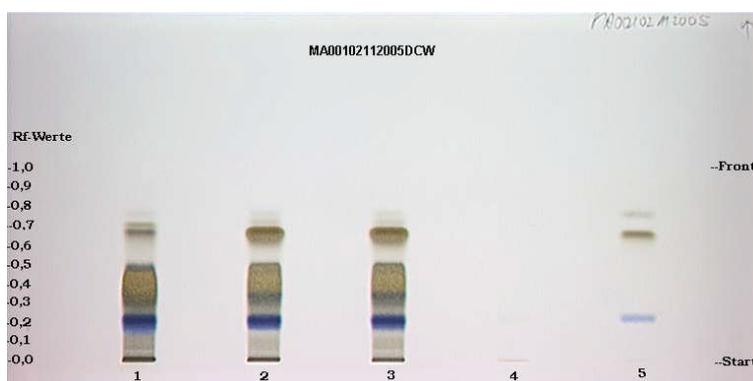


Abbildung 3-8: Selektivität eines Fertigarzneimittels, das Bärentraubenblätterextrakt als Wirkstoff enthält; Droge (Bahn 1), Extrakt (Bahn 2), Fertigarzneimittel (Bahn 3), Hilfsstoffmischung (Bahn 4), Referenzsubstanzen: Arbutin, Gallussäure, Hydrochinon nach aufsteigenden R_f -Werten (Bahn 5).

3.2.2 Robustheit

Die Stabilität des Fertigarzneimittels MA001-11-3 während der Chromatographie wurde durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie nachgewiesen (Abbildung 3-9).

Auf der Geraden, zwischen dem Auftragepunkt und den Fließmittelfronten waren deutlich die Zonen des Arbutins und der Gallussäure zu erkennen. Hydrochinon war auf der Geraden nicht zu erkennen. Bei der untersuchten Konzentration der Probenlösung war die Hydrochinonkonzentration zu gering, um detektiert zu werden. Da oberhalb der Zone der Gallussäure keine weiteren Zonen auf oder neben der Gerade zu erkennen waren, ist nicht von einer Instabilität des Hydrochinons auszugehen. Bei der zweiten Dimension sah man auf der Startbahn einige bräunliche Zonen. Diese rührten wahrscheinlich von Gerbstoffpolymerisaten her, haben aber keinen störenden Einfluss auf die Chromatographie. Die Inhaltsstoffe Arbutin und Gallussäure waren stabil.

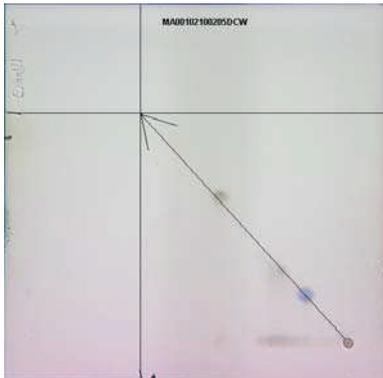


Abbildung 3-9: Stabilität eines Fertigarzneimittels, das Bärentraubenblätterextrakt enthält, während der Chromatographie.

3.3 Reproduzierbarkeit

3.3.1 Ringversuche

Im Rahmen der Methodenoptimierung wurden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit zwei Ringversuche durchgeführt. Die Durchführung ist unter 2.17.3 beschrieben. Die Auswertung ist im Anhang unter 10.2 tabellarisch aufgeführt. In dem ersten Versuch, waren die Chromatogramme der einzelnen Labors in weiten Teilen nicht miteinander vergleichbar. Im zweiten Versuch dagegen, waren die chromatographischen Ergebnisse aller Labors miteinander vergleichbar. Die Unterschiede zwischen Prüfvorschrift I (2.17.3) und Prüfvorschrift II (2.17.3) waren jedoch nicht so gravierend. Es wurden lediglich einige Parameter, wie zum Beispiel die Aufarbeitung der Probe oder die Konzentrationen der Referenzlösungen geändert. Im weiteren war im Rahmen der Optimierung der Methode das Fließmittel geändert worden. Für die Entwicklung der Chromatographie war sowohl die gesättigte Doppeltrogkammer als auch die gesättigte Horizontal – Entwicklungskammer in die Vorschrift II aufgenommen worden, da vielen Labors keine Horizontal – Entwicklungskammer vorhanden war und gezeigt wurde, dass in beiden Kammern vergleichbare Resultate erzielt werden können (siehe 3.1.6).

Die Ringversuche zeigten, dass es wichtig ist, Prüfvorschriften so unkompliziert wie möglich und so präzise wie nötig zu formulieren. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten ist es aber ebenso wichtig, dass die ausführende Person die Chromatographie mit dem nötigen Sachverstand durchführt.

Das Verfahren zur Bestimmung der Inhaltsstoffe Arbutin, Gallussäure und Hydrochinon in Bärentraubenblätterextrakt war reproduzierbar.

3.4 Stabilitätsuntersuchungen

Proben von drei Chargen (MA001-11-7, MA001-11-8 und MA001-11-9) eines Fertigarzneimittels wurden unter den Klimabedingungen 25°C/60 % r. F., 30°C/60 % r. F. und 40°C/75 % r. F. eingelagert und nach 3, 6, 9, 12, 18 und 24 Monaten aus den Klimaschränken entnommen. Anschließend wurden die Proben in einem temperaturkontrollierten Raum gelagert und dann gemäß Verfahren II analysiert.

Für eine übersichtliche Darstellung der Stabilität wurden die Bahnen jeder einzelnen Charge ausgeschnitten und nebeneinander ausgewertet.

3.4.1 Stabilität über einen Zeitraum von 24 Monaten unter den Klimabedingungen 25°C/60 % relative Feuchte

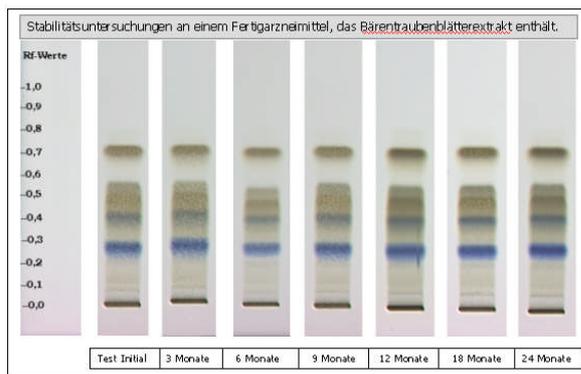


Abbildung 3-10: Stabilität der Probe MA001-11-7, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 24 Monaten.

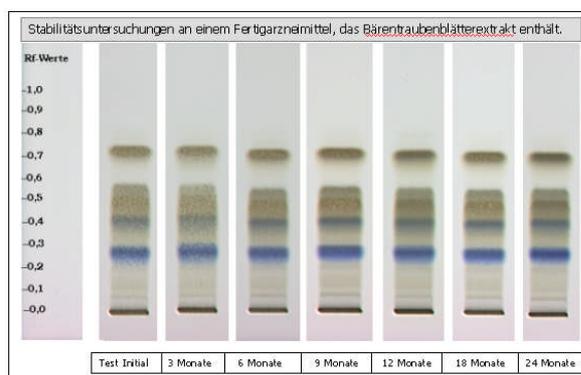


Abbildung 3-11: Stabilität der Probe MA001-11-8, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 24 Monaten.

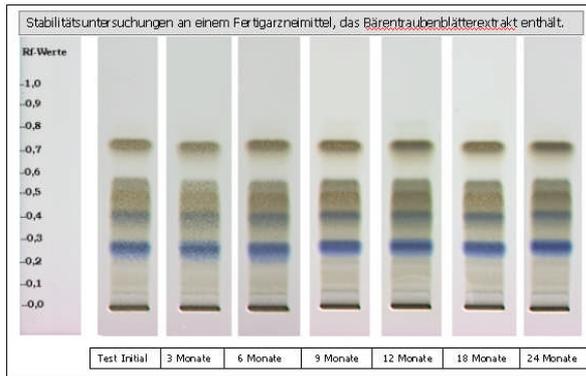


Abbildung 3-12: Stabilität der Probe MA001-11-9, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 24 Monaten.

3.4.2 Stabilität über einen Zeitraum von 12 Monaten unter den Klimabedingungen 30°C/60 % relative Feuchte

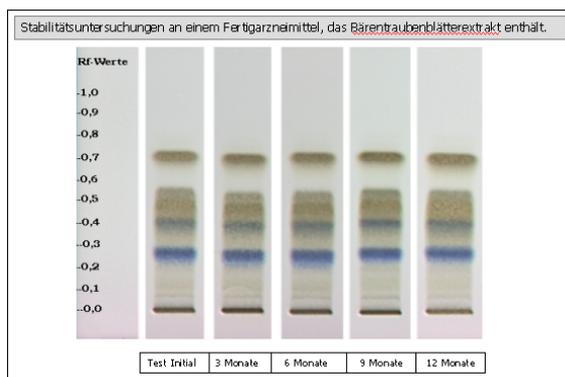


Abbildung 3-13: Stabilität der Probe MA001-11-7, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.

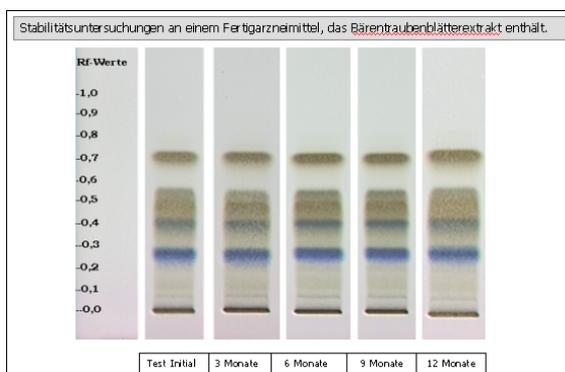


Abbildung 3-14: Stabilität der Probe MA001-11-8, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.

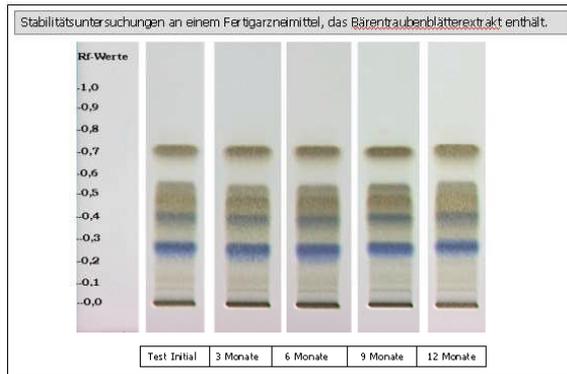


Abbildung 3-15: Stabilität der Probe MA001-11-9, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.

3.4.3 Stabilität über einen Zeitraum von 6 Monaten unter den Klimabedingungen 40°C/75 % relative Feuchte

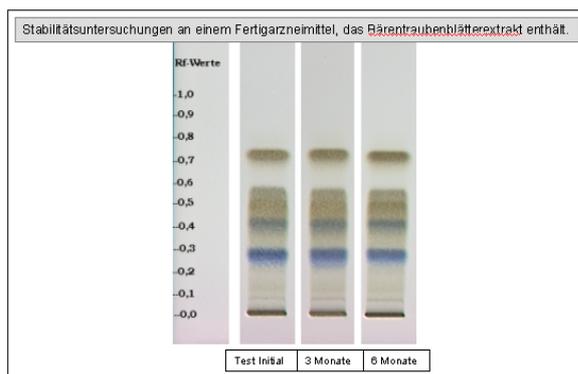


Abbildung 3-16: Stabilität der Probe MA001-11-7, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten.

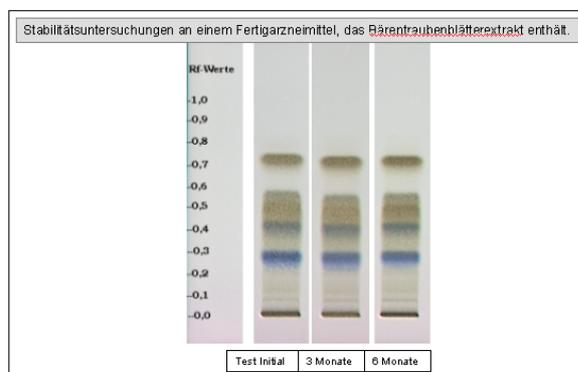


Abbildung 3-17: Stabilität der Probe MA001-11-8, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten.

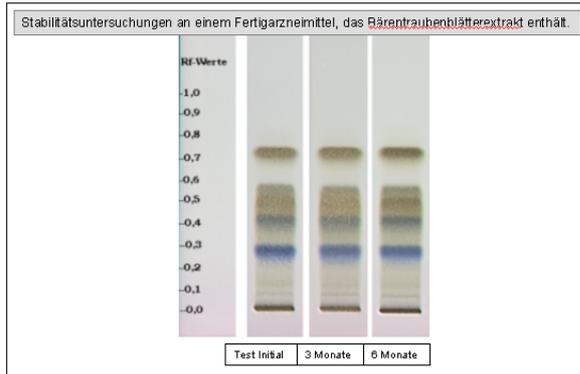


Abbildung 3-18: Stabilität der Probe MA001-11-9, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten.

Das Fertigarzneimittel war über einen Zeitraum von 24 Monaten unter den Klimabedingungen 25°C / 60 % relative Feuchte stabil. Die Fingerprints jeder der drei untersuchten Chargen waren über diesen Zeitraum vergleichbar mit dem Startchromatogramm bezüglich Anzahl, Lage, Farbe, Form und Intensität der Zonen. Im Weißlicht waren die Zonen der Inhaltsstoffe Arbutin und Gallussäure deutlich zu erkennen. Die Zone des Arbutins war blau gefärbt und lag im unteren R_f -Bereich bei ca. 0,2 - 0,3; die Zone der Gallussäure war braun-grau gefärbt und lag im oberen R_f -Bereich bei ca. 0,7. Die Zone des Hydrochinons war nicht deutlich zu erkennen. Im mittleren R_f -Bereich waren außerdem eine blaue Zone und mehrere braun bzw. braun-grau gefärbte Zonen zu sehen.

Die Stabilität des Fertigarzneimittels war ebenfalls erwiesen durch Vergleich der einzelnen Fingerprints mit dem Startchromatogramm hinsichtlich Anzahl, Lage, Farbe, Form und Intensität der Zonen nach Einlagerung bei 30°C / 60 % relative Feuchte über einen Zeitraum von 12 Monaten und nach Einlagerung bei 40°C / 75 % relative Feuchte über einen Zeitraum von 6 Monaten (accelerated testing).

Einige der Zonen in den Chromatogrammen waren verlaufen bzw. zeigten einen Siebdruckeffekt, da mit einer wässrigen Natriumcarbonatlösung derivatisiert wurde. Die wässrige Lösung verdunstete sehr langsam von der Platte, so dass sie nur in geringen Mengen aufgesprüht werden konnte. Andererseits war eine bestimmte Menge der alkalischen Lösung nötig, damit die Derivatisierungsreaktion vollständig ablief. Im Rahmen der Validierung zeigte sich aber, dass mit der wässrigen

Natriumcarbonatlösung trotz der erwähnten Nachteile die besten chromatographischen Ergebnisse zu erzielen waren.

3.5 Quantitative Hydrochinonbestimmung in Fertigarzneimitteln, die Bärentraubenblätterextrakt enthalten

Die Hydrochinonbestimmung erfolgte gemäß Verfahren III.

3.5.1 Validierung

Für die Validierung wurde die Probe MA001-11-3 verwendet. Die Validierung wurde wie unter 0 beschrieben durchgeführt. Die densitometrische Auswertung der Platten erfolgte wie unter 2.16, Verfahren III beschrieben.

Die Parameter Linearität, Vergleichspräzision, Wiederholpräzision und Wiederfindung wurden mit Hilfe der Software "Validat 2000" (Version 3.056.1251) ausgewertet. Die Validierungsdaten und Graphiken sind im Anhang unter 10.3 aufgeführt.

3.5.1.1 Selektivität

Der Hydrochinonpeak war sowohl im Chromatogramm der Extraktlösung als auch in dem der Fertigarzneimittellösung deutlich zu erkennen. Die Placebomischung zeigte keine Zonen im Chromatogramm; die Detektion war daher nicht gestört. Das Lösungsmittel zeigte ebenfalls keine Zonen, die die Chromatographie stören könnten. Die Messung der UV-Absorptionsspektren (Absorptionsmaximum des Hydrochinons bei 288 nm) zeigte, dass die Detektion und Quantifizierung des Hydrochinons nicht durch störende Matrixbestandteile oder Verunreinigungen negativ beeinflusst wurde.

3.5.1.2 Kalibrierfunktion und Kalibrierbereich

Verwendete Hydrochinonstammlösung: 13,49 mg Hydrochinon / 100 mL Methanol. Der Kalibrierbereich für Hydrochinon lag zwischen 134,9 ng und 2023,5 ng Hydrochinon (Absolute Mengen an Hydrochinon der einzelnen Zonen: 134,9 ng / 337,25 ng / 674,5 ng / 1011,75 ng / 1349,00 ng / 1686,25 ng / 2023,5 ng).

Da es sich um eine Absorptionsmessung handelte, ergab sich für die Kalibriergerade eine Polynominalfunktion. Die Auswertung erfolgte sowohl über die Höhe der Peaks, als auch über ihre Fläche. Die Zone mit dem Gehalt von 1349,00 ng wurde nicht in die Auswertung einbezogen. Die Zone im Chromatogramm war nicht detektierbar.

Auswertung über die Höhe: $Y = 4,207 + 0,382 \cdot X + -0,000 \cdot X^2 /$

$r = 0,99907 / CV: 2,68\%$.

Auswertung über die Fläche: $Y = -174,080 + 9,149 \cdot X + -0,002 \cdot X^2 /$

$r = 0,99929 / CV: 2,61\%$.

Um den linearen Bereich genau zu definieren, wurde eine weitere Kalibrierfunktion erstellt. Verwendete Hydrochinonstammlösung: 10,26 mg Hydrochinon / 100 mL Methanol. Der Kalibrierbereich war 51,3 ng bis 1026,0 ng Hydrochinon (Absolute Mengen an Hydrochinon der einzelnen Zonen: 51,3 ng / 102,6 ng / 205,2 ng / 410,4 ng / 615,6 ng / 820,8 ng / 1026,0 ng). Die Hydrochinonkonzentration von 51,3 ng lag unterhalb der Erfassungsgrenze.

Da die Konzentrationen im linearen Bereich der Kalibrierkurve lagen, ergab sich für die Kalibriergerade eine Linearfunktion. Die Auswertung erfolgte ebenfalls über die Höhe der Peaks und über ihre Fläche.

Auswertung über die Höhe: $Y = -12,278 + 0,235 \cdot X / r = 0,99875 / CV: 3,75\%$.

Auswertung über die Fläche: $Y = -379,578 + 5,486 \cdot X / r = 0,99850 / CV: 3,98\%$.

3.5.1.3 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des Hydrochinons lag für die densitometrische Auswertung bei 102 ng und für die visuelle Auswertung bei 205 ng.

3.5.1.4 Linearität

Die Linearität wurde anhand von Probenlösungen des Fertigarzneimittels untersucht. Die Auswertung ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,987$. Der Residuenplot zeigte eine ungleichmäßige Verteilung der Messwerte.

3.5.1.5 Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision wurde anhand von Probenlösungen des Fertigarzneimittels untersucht. Die Auswertung ergab einen Variationskoeffizienten von $CV = 8,01\%$.

3.5.1.6 Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision wurde anhand von Probenlösungen des Fertigarzneimittels untersucht. Die Auswertung ergab einen Variationskoeffizienten von $CV = 1,97\%$.

3.5.1.7 Richtigkeit

Für die Richtigkeit wurde der Extrakt mit zur Arzneiform äquivalenten Mengen Hilfsstoffgemisch versetzt. Es ergab sich eine mittlere Wiederfindung von $91,394\% \pm 4,370$. Der 100% Wert war nicht innerhalb des Vertrauensbereichs der Wiederfindung.

Die Methode war nicht als valide anzusehen. Aufgrund des Korrelationskoeffizienten von $0,987$ und der ungleichmäßigen Verteilung der Messwerte im "Residual Plot" war die Linearität nicht gewährleistet. Weiterhin konnte die Richtigkeit der Methode durch die Messwerte nicht belegt werden und für die Präzision ergaben sich relativ hohe Variationskoeffizienten.

4 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Arzneidroge “Weißdornblätter mit Blüten“ und daraus hergestellten Zubereitungen

4.1 Entwicklung und Optimierung

Ausgehend von Verfahren IV sollte ein dünnschichtchromatographisches Verfahren zum qualitativen Nachweis der Flavonoide und Procyanidine in der Droge und dem daraus hergestellten Extrakt bzw. Fertigarzneimittel entwickelt und optimiert werden. Abweichend von Verfahren IV wurde auf vorgeeinigten HPTLC-Platten gearbeitet. Die Entwicklung erfolgte in der vorkonditionierten Horizontal-Entwicklungskammer über eine Trennstrecke von 8 cm. Die Proben wurden mit den Geräten TLS 100 und ATS4 aufgetragen.

4.1.1 Probenaufarbeitung

Zunächst wurde versucht, die gemahlene Frucht Droge MA002-01 und die gemahlene Droge der Blätter mit Blüten MA002-02 (Siebanalyse gemäß Ph. Eur., feinst gemahlen) mit den reinen Lösungsmitteln Wasser, Ethanol 40 %, Ethanol 70 %, Methanol, Ethylacetat und Aceton zu extrahieren. Mit Wasser quollen die Drogen so stark, dass keine Filtration möglich war.

Nach der dünnschichtchromatographische Analyse dieser 12 Ansätze waren nur im Chromatogramm des Extraktes aus Blättern mit Blüten schwache grüne und gelbe Zonen zu erkennen. Im Chromatogramm des Fruchtextraktes waren keine Zonen zu sehen.

In der Auswertung des Verfahrens IV wurde beschrieben, dass die Procyanidine als blaue Zonen im Chromatogramm zu erkennen waren. Da die meisten Derivatisierungsreaktionen durch Zufuhr von Hitze beschleunigt ablaufen, wurde die Platte nach der Derivatisierung kurz auf die Heizplatte bei 120°C gelegt, um zu prüfen, ob eine Blaufärbung der grün gefärbten Zonen im Chromatogramm erreicht werden konnte.

In den Chromatogrammen der Extrakte aus Blättern mit Blüten, hergestellt mit Lösungsmitteln Ethanol 40 %, Ethanol 70 %, Methanol, Ethylacetat und Aceton, waren blaue Zonen zu erkennen (Abbildung 4-1). Auf den Bahnen 1, 3 und 4 war eine stark blau gefärbte Startzone zu erkennen. Es konnte vermutet werden, dass sich Procyanidine nicht in dem Fließmittel lösen und mit der mobilen Phase chromatographiert wurden.

Durch das Erhitzen der Platte nach dem Aufsprühen des Derivatisierungsreagenzes färbten sich die Zonen im Chromatogramm blau und der Plattenhintergrund gelb. Im weiteren Verlauf der Entwicklung wurde die Platte nach dem Aufbringen des Derivatisierungsreagenz erhitzt.

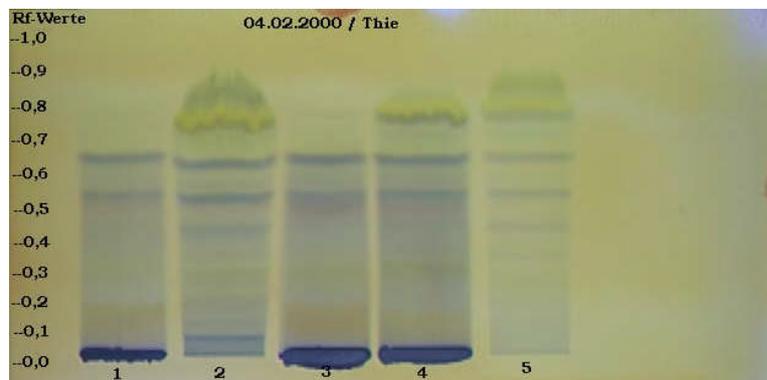


Abbildung 4-1: Extrakte aus der Droge Blätter mit Blüten; ethanolisch (40 %) (Bahn 1), acetonisch (Bahn 2), ethanolisch 70 % (Bahn 3), methanolisch (Bahn 4), ethylacetonisch (Bahn 5).

Die Probenaufarbeitung durch Extraktion bei Raumtemperatur ermöglichte eine Gesamtanalyse der Procyanidine in der Droge, jedoch keine Analyse der oligomeren- (OPC) und der polymeren (PPC) Procyanidine getrennt voneinander.

Zur Trennung der OPC und der PPC wurde deshalb eine Festphasenextraktion durchgeführt.

Es lagen Methoden vor, in denen die Aufarbeitung der Droge *Crataegi folium cum flore* durch Festphasenextraktion über eine Polyamid-Säule beschrieben wurde (Wagner und Blatt 1996; Rohr 1999; Hölz und Strauch 1977). Die Proben MA002-03 (Fruchtextrakt) und MA002-06 (Extrakt aus Blättern mit Blüten) wurden gemäß dieser Methoden aufgearbeitet, um zu sehen, ob diese Methoden geeignet waren, die Procyanidine voneinander zu trennen.

Jeweils 5 g der Extrakte wurden mit je 25 mL Ethanol 70 % versetzt, 15 min maschinell geschüttelt und filtriert.

Gemäß der Methode von Wagner und Blatt wurde der Ansatz vor der Festphasenextraktion gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Da starke Emulsionsbildung auftrat, wurden die polaren Phasen zur Phasentrennung zentrifugiert .

Die Festphasenextraktion nach Wagner und Blatt erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Die Fraktionen der Procyanidine (OPC und PPC) wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Außerdem wurde die polare Phase, die nach dem Ausschütteln gegen Dichlormethan vorlag, untersucht.

In den Fingerprints beider Procyanidinfraktionen (OPC und PPC) des Extrakts aus Blättern und Blüten erkannte man schwache, unscharfe blaue Zonen. Die Procyanidinfraktionen des Fruchtextrakts zeigten keine Zonen im Chromatogramm. Die Ethanolphasen auf den Bahnen 5 und 6 ergaben ebenfalls keine Zonen im Chromatogramm (Abbildung 4-2).

Mit beiden Probenansätzen wurde noch einmal die Festphasenextraktion gemäß Wagner und Blatt und gemäß Hölzl und Strauch (2.6.1) durchgeführt. Das Ausschütteln gegen Dichlormethan wurde nicht mehr durchgeführt. Die Proben wurden per Hand aufgetragen, daher entstanden uneinheitliche Startbanden. Dies hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf die Chromatographie.

In den Fingerprints des Fruchtextrakts waren wieder keine Zonen zu erkennen (Abbildung 4-3). Die Procyanidine konnten in dem Fruchtextrakt dünnschichtchromatographisch nicht nachgewiesen werden. Daher wurde im Weiteren nur noch der Extrakt aus Blättern und Blüten untersucht.

In den Fingerprints des Extrakts aus Blättern und Blüten waren blaue Zonen zu sehen. Die Referenzsubstanzen Epicatechin, Procyanidin A₂ und Procyanidin B₂ zeigten blaue Zonen im Chromatogramm. In den Fingerprints der Probenlösungen waren Zonen zu erkennen, die mit denen der Referenzsubstanzen in Lage und Farbe übereinstimmten (Abbildung 4-3).

Die Fingerprints der Proben, die mit unterschiedlichen Lösungsmitteln aufgearbeitet worden waren, waren miteinander vergleichbar in Bezug auf die Anzahl, Lage und Farbe der Zonen.

Für die Festphasenextraktion wurden im Weiteren die Lösungsmittel Ethanol, Aceton und Wasser verwendet. Das giftige Dimethylformamid konnte ausgeschlossen werden.

Da die Zonen in den Fingerprints der Extraktlösungen teilweise nur schwach zu erkennen waren, wurde die Probe am Rotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockne eingengt und dann wieder in 1 mL Ethanol 70 % aufgenommen. Nach der so erzielten Aufkonzentrierung der Untersuchungslösung, waren im Chromatogramm deutlich intensivere blaue Zonen zu erkennen (Abbildung 4-4). Im Bezug auf dünnschichtchromatographische Untersuchungen wirkte sich die Temperatur von 40 °C nicht negativ auf die Stabilität der Procyanidine aus.

In den Chromatogrammen der Lösungen, die nach dem Eluieren direkt aufgetragen wurden, waren die Zonen bei den gleichen R_f -Werten ebenfalls blau gefärbt, aber sehr viel schwächer zu sehen.

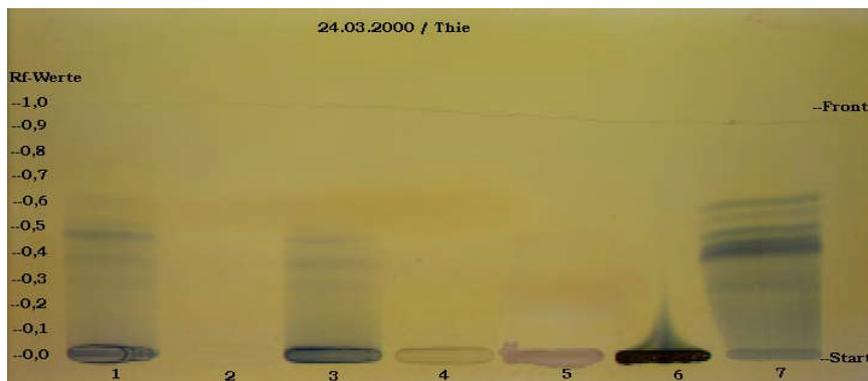


Abbildung 4-2: Probenaufarbeitung gemäß Wagner und Bladt (Wagner und Bladt 1996); OPC Fraktion des Blätter mit Blütenextrakts (Bahn 1), OPC Fraktion des Blattextrakts (Bahn 2), PPC Fraktion des Blätter mit Blütenextrakts (Bahn 3), PPC Fraktion des Fruchtextrakts (Bahn 4), Ethanolphase des Blätter mit Blütenextrakts (Bahn 5), Ethanolphase des Blattextrakts (Bahn 6), Referenzsubstanzen Epicatechin, Procyanidin A₂ und Procyanidin B₂ (Bahn 7).

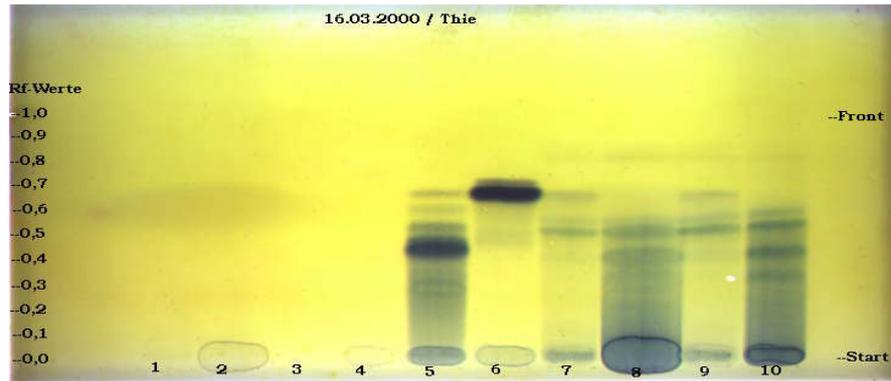


Abbildung 4-3: Probenaufarbeitung gemäß Wagner und Blatt (Wagner und Blatt 1996) und Hölzl und Strauch (Hölzl und Strauch 1977); OPC Fraktion des Fruchtextrakts gemäß Hölzl und Strauch (Bahn 1), PPC Fraktion des Fruchtextrakts gemäß Hölzl und Strauch (Bahn 2), OPC Fraktion des Fruchtextrakts gemäß Wagner und Blatt (Bahn 3), PPC Fraktion des Fruchtextrakts gemäß Wagner und Blatt (Bahn 4), Referenzsubstanzen: Epicatechin, Procyanidin B₂, Procyanidin A₂ (Bahn 5), Referenzsubstanz: Epicatechin (Bahn 6), OPC Fraktion des Blattextrakts gemäß Hölzl und Strauch (Bahn 7), PPC Fraktion des Blattextrakts gemäß Hölzl und Strauch (Bahn 8), OPC Fraktion des Blattextrakts gemäß Wagner und Blatt (Bahn 9), PPC Fraktion des Blattextrakts gemäß Wagner und Blatt (Bahn 10).

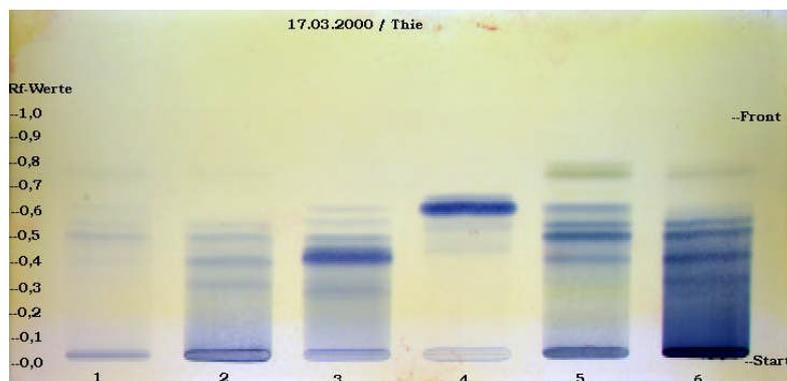


Abbildung 4-4: Probenvergleich vor und nach der Aufkonzentrierung; OPC des Blattextrakts direkt nach der Festphasenextraktion (Bahn 1), PPC des Blattextrakts direkt nach der Festphasenextraktion (Bahn 2), Referenzsubstanzen: Epicatechin, Procyanidin B₂, Procyanidin A₂ (Bahn 3), Referenzsubstanz: Epicatechin (Bahn 4), OPC des Blattextrakts nach der Aufkonzentrierung (Bahn 5), PPC des Blattextrakts nach der Aufkonzentrierung (Bahn 6).

In der ersten Fraktion der Festphasenextraktion wurden Flavonoide nachgewiesen. Die Flavonoidfraktion wurde nach der Festphasenextraktion eines Frucht- und eines Blattextrakts (MA002-03 und MA002-06) untersucht. Als Referenzsubstanzen wurden Rutosid, Chlorogensäure, Hyperosid, Epicatechin und Vitexin verwendet. Die Entwicklung erfolgte in der vorkonditionierten Horizontal-Entwicklungskammer mit Fließmittel FM 10 über eine Trennstrecke von 8 cm. Es wurde mit Naturstoffreagenz I derivatisiert und unter UV-Licht bei $\lambda=366$ nm dokumentiert.

Die Flavonoide zeigten eine intensive Fluoreszenz. In dem Fingerprint des Blattextrakts waren Zonen zu erkennen, die denen der Referenzsubstanzen in Bezug auf Lage, Farbe und Intensität entsprachen. In dem Fingerprint des Fruchtextrakts waren nur schwache Zonen zu sehen; eine Zone, die im Bezug auf die Lage mit der Zone des Hyperosids übereinstimmte war zu erkennen, sie war jedoch in Bezug auf die Farbe und die Intensität abweichend. Ebenso war in dem Fingerprint des Fruchtextraktes eine blaue Zonen zu erkennen, die in Bezug auf die Lage und die Farbe mit der Zone der Chlorogensäure übereinstimmte, in Bezug auf die Intensität jedoch stark differierte (Abbildung 4-5).

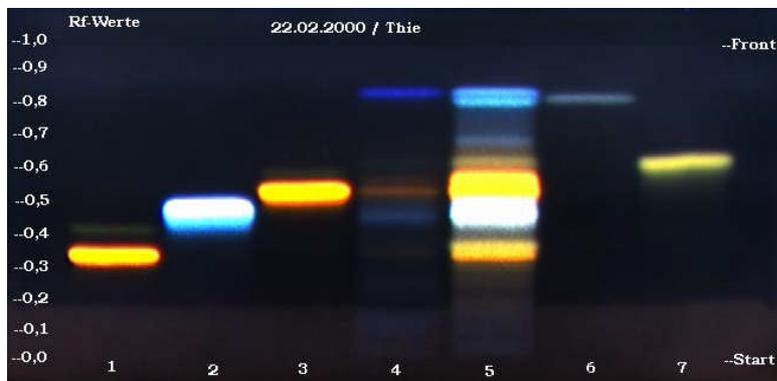


Abbildung 4-5: Flavonoidfraktion nach der Festphasenextraktion; Rutosid (Bahn 1), Chlorogensäure (Bahn 2), Hyperosid (Bahn 3), Fruchtextrakt (Bahn 4), Blattextrakt (Bahn 5), Epicatechin (Bahn 6), Vitexin (Bahn 7).

In den Fingerprints der OPC und der PPC waren Zonen zu erkennen, die hinsichtlich ihrer Lage übereinstimmten. Deshalb wurde versucht, die Trennung durch die Festphasenextraktion zu verbessern. Alle drei Fraktionen wurden untersucht.

Zunächst wurde die Menge an Untersuchungslösung, die auf die Säule gegeben wurde verringert. Eine Überladung der Säule wurde so ausgeschlossen. 1 mL der Untersuchungslösung reichte aus, um durch Festphasenextraktion eine Trennung der Procyanidine zu erzielen (Abbildung 4-6). Allerdings waren in den Fingerprints der Procyanidinfraktionen OPC und PPC wieder Zonen zu sehen, die hinsichtlich ihrer Lage übereinstimmten. Deshalb wurden in einem weiteren Versuch die Lösungsmittelmengen für die Elution der Procyanidine erhöht.

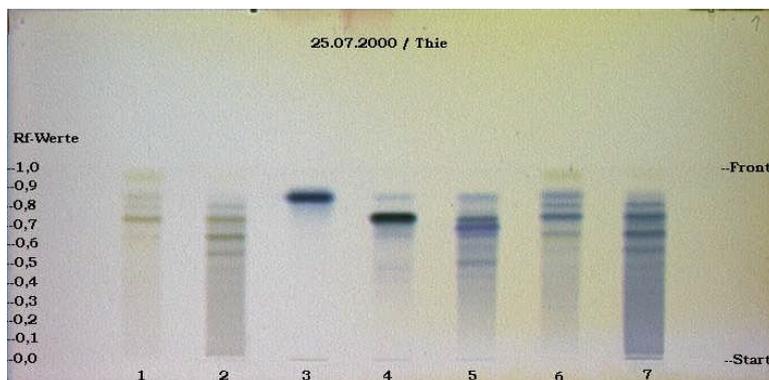


Abbildung 4-6: Fingerprints der OPC und PPC nach Trennung von 1 mL (OPC (Bahn 1), PPC (Bahn 2)) und 2 mL Probenlösung durch Festphasenextraktion (OPC (Bahn 6), PPC (Bahn 7)).

Die Menge an Elutionsmittel für die Festphasenextraktion wurde so optimiert, dass die Fraktionen sauber getrennt gewonnen werden konnten. Es wurden die ersten und die letzten 10 mL jeder Fraktion untersucht. Bei Elutionsmengen von 40 mL (Fraktion I) bzw. 80 mL (Fraktion II und III) waren in den letzten 10 mL jeder Fraktion keine Zonen mehr zu erkennen (Abbildung 4-7).

Die Bahnen 1 und 2 zeigten die Flavonoidfraktion, die Bahnen 5 und 6 die OPC-Fraktion und die Bahnen 7 und 8 die PPC-Fraktion. Auf den Bahnen 6 und 8 waren keine eindeutigen Zonen zu erkennen. Die eindeutige Trennung der Procyanidine war damit nachgewiesen. Die Auftragemenge war so hoch gewählt (20 μ L, 10 mm Banden), dass ausgeschlossen werden konnte, dass das Fehlen der Zonen auf eine zu geringe Konzentration zurückzuführen war.

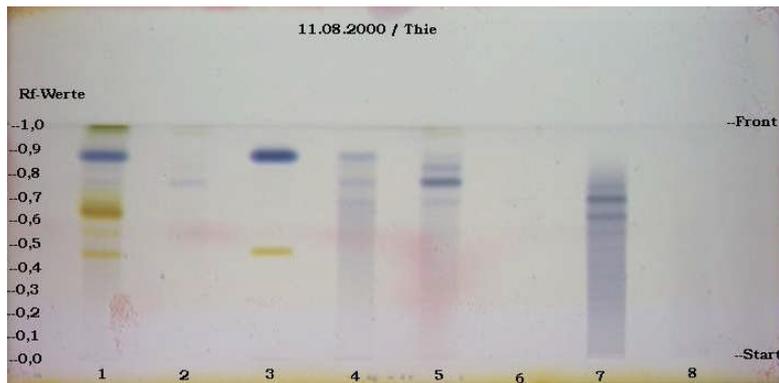


Abbildung 4-7: Fingerprints der ersten und der letzten 10 mL jeder einzelnen Fraktion der Festphasenextraktion; Flavonoidfraktion die ersten 10 mL (Bahn 1), Flavonoidfraktion die letzten 10 mL (Bahn 2), Referenzsubstanzen Epicatechin, Rutosid (Bahn 3), Referenzsubstanz Procyanidin B₂ (Bahn 4), OPC-Fraktion die ersten 10 mL (Bahn 5), OPC-Fraktion die letzten 10 mL (Bahn 6), PPC-Fraktion die ersten 10 mL (Bahn 7), PPC-Fraktion die letzten 10 mL (Bahn 8).

Alternativ zu der Trennung durch Festphasenextraktion über Polyamid wurde die Trennung durch Gelchromatographie über Sephadex Säulen versucht.

Dazu wurden Sephadex G25 und Sephadex LH20 verwendet. Es wurde jedoch keine Trennung der Flavonoide und Procyanidine in klar erkennbare Fraktionen erreicht (Abbildung 4-8, Abbildung 4-9).

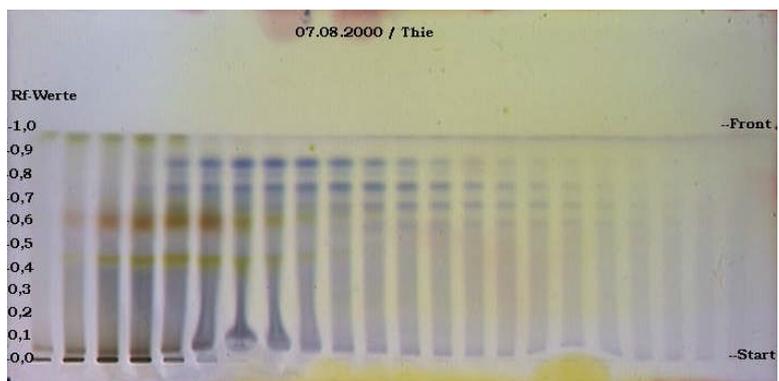


Abbildung 4-8: Gelchromatographie eines Extrakts der Droge Weißdornblätter mit Blüten über Sephadex G25.



Abbildung 4-9: Gelchromatographie eines Extrakts der Droge Weißdornblätter mit Blüten über Sephadex LH 20.

4.1.2 Chromatographie

4.1.2.1 Fließmittel

Um die optimale Trennung der Zonen der Procyanidine im Fingerprint zu erzielen, wurden verschiedene Fließmittel eingesetzt. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte mit den Fließmitteln FM 4 und FM 5.

Zwei Extrakte aus Blättern und Blüten der Droge (MA002-06 und MA002-07) wurden durch Festphasenextraktion wie unter (2.6.1) beschrieben aufgearbeitet. Es wurden jeweils die Fraktionen der oligomeren (OPC) und der polymeren (PPC) Procyanidine dünnschichtchromatographisch untersucht (Abbildung 4-10, Abbildung 4-11).

Mit dem polarereren Fließmittel FM 5 wurden die Procyanidine im Fingerprint schärfer voneinander getrennt, als mit dem Fließmittel FM 4.

Die Referenzlösung der Substanz Procyanidin B₂ war nicht frisch zubereitet worden. Wahrscheinlich hatten sich Umlagerungs- oder Zersetzungsprodukte in der Lösung gebildet. Aus diesem Grund waren im Fingerprint dieser Lösung mehrere Zonen zu erkennen.

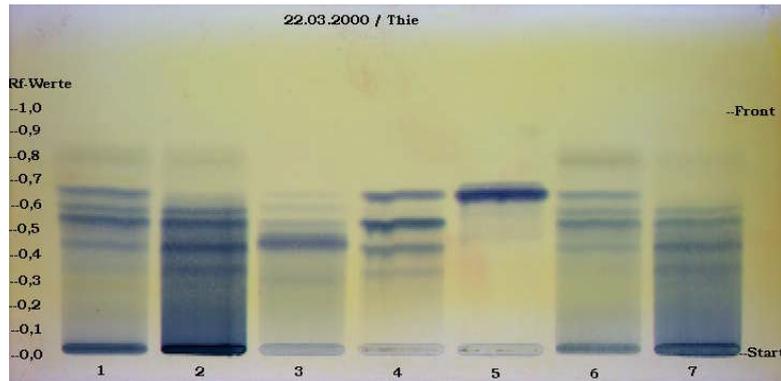


Abbildung 4-10: FM 4; Extrakt MA002-06 OPC Fraktion (Bahn 1), Extrakt MA002-06 PPC Fraktion (Bahn 2), Procyanidin A₂ (Bahn 3), Procyanidin B₂ (Bahn 4), Epicatechin (Bahn 5), Extrakt MA002-07, OPC Fraktion (Bahn 6), Extrakt MA002-07, PPC Fraktion (Bahn 7).

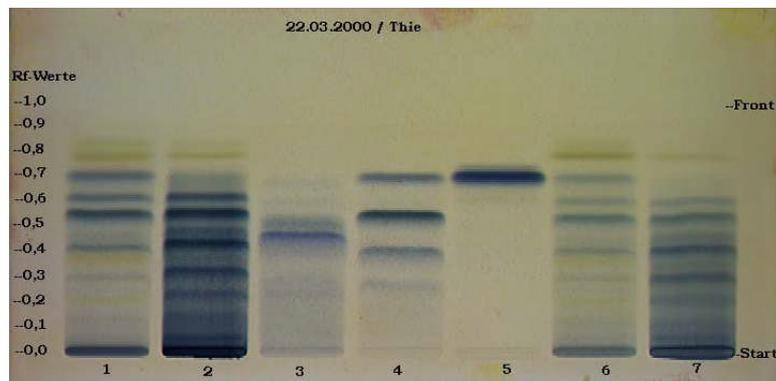


Abbildung 4-11: FM 5; Extrakt MA002-06 OPC Fraktion (Bahn 1), Extrakt MA002-06 PPC Fraktion (Bahn 2), Procyanidin A₂ (Bahn 3), Procyanidin B₂ (Bahn 4), Epicatechin (Bahn 5), Extrakt MA002-07 OPC Fraktion (Bahn 6), Extrakt MA002-07 PPC Fraktion (Bahn 7).

Da jedoch die Bildung der Oberphase von FM 5 nicht kontrollierbar war, wurde der Versuch mit einem anderen Fließmittel (FM 6) durchgeführt. Für diesen Versuch wurden wieder die beiden Extrakte MA002-06 und MA002-07 verwendet. Alle drei Fraktionen der Festphasenextraktion wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Die Entwicklung der Chromatographie mit diesem Fließmittel ergab ebenfalls voneinander getrennte Zonen im Fingerprint. Die R_f -Werte lagen allerdings höher, als bei den beiden ersten Fließmitteln (Abbildung 4-12). Im Rahmen der Optimierung des Fließmittels wurde die Trennstrecke von 8 auf 6 cm verringert, um über diese Distanz eine optimale Trennung der Zonen in den Fingerprints zu erreichen. Die Auftragemengen der einzelnen Fraktionen wurden für 8 mm breite

Startbanden auf 5 μL für die Untersuchungslösungen der Flavonoidfraktionen und auf 6 μL für die Proben der OPC- und PPC - Fraktionen festgelegt.

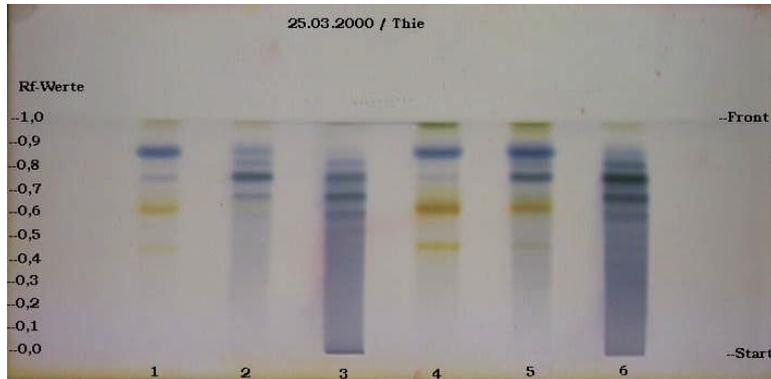


Abbildung 4-12: FM 6; Extrakt MA002-06 Flavonoidfraktion (Bahn 1), Extrakt MA002-06 OPC Fraktion (Bahn 2), Extrakt MA002-06 PPC Fraktion (Bahn 3), Extrakt MA002-07 Flavonoidfraktion (Bahn 4), Extrakt MA002-07 OPC Fraktion (Bahn 5), Extrakt MA002-07 PPC Fraktion (Bahn 6).

4.1.2.2 Derivatisierung

Nach der Entwicklung wurde die Platte mit DMAZA-Reagenz I besprüht und anschließend so lang erhitzt (Plattenheizer 120°C), bis sich die Farben der Zonen nicht mehr veränderten. Die Zonen waren zunächst grün, färbten sich aber durch die Hitze blau. Der Plattenhintergrund färbte sich gelb.

In einigen Fällen färbte sich der Hintergrund der HPTLC-Platten rot. Die Zonen im Chromatogramm waren nicht mehr eindeutig zu erkennen (Abbildung 4-13). Ursache waren vermutlich eine Instabilität des Derivatisierungsreagenzes oder äußere Einflüsse während der Detektion der Chromatographie.

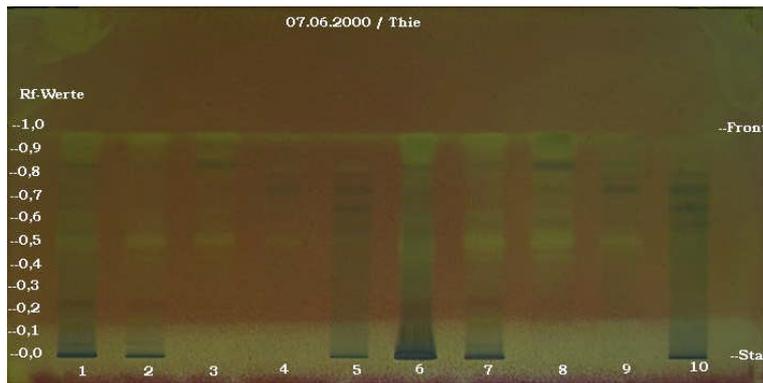


Abbildung 4-13: Derivatisierung einer HPTLC-Platte mit DMAZA-Reagenz.

In den Versuchen zu dieser Problematik wurde mit einer neuen Charge Dimethylaminozimtaldehyd gearbeitet, um einen Verfall des Reagenz auszuschließen. Zunächst wurde die Trocknung der Platte vor und nach dem Besprühen mit DMAZA-Reagenz 1 variiert. Es zeigte sich aber, dass weder die Art der Trocknung (Plattenheizer 120 °C oder Kaltluftstrom), noch das Besprühen der Platte in heißem oder abgekühltem Zustand, ausschlaggebend für die Verfärbung der Platte waren.

Entscheidend für die Färbung des Plattenhintergrundes war der Säuregehalt des Reagenzes. Mit zunehmendem Abdampfen der Säure von der Platte durch das Erhitzen auf dem Plattenheizer färbten sich die Zonen im Chromatogramm blau und der Hintergrund gelb bzw. rot. Wurde die Platte bei geringerer Temperatur (50–60 °C) erhitzt, färbten sich die Zonen blau; der Hintergrund blieb jedoch weiß.

Die Platte musste direkt nach der Derivatisierung dokumentiert werden, da die Färbung des Plattenhintergrunds instabil war. In Abhängigkeit von der Zeit, die zwischen der Detektion und der Dokumentation lag, verfärbte sich der Hintergrund gelb.

Für das optimierte Verfahren wurden die Trocknungszeiten nicht explizit festgelegt. Die Zeit des Erhitzens war durch die Blaufärbung der Zonen im Chromatogramm begrenzt.

Um eine einheitliche Benetzung der Kieselgelschicht mit Dimethylaminozimtaldehyd zu gewährleisten, wurden die Platten getaucht (Tauchzeit 1 bis 2 Sekunden).

Die Zusammensetzung des Reagenzes wurde so verändert, dass der Anteil der Salzsäure erhöht wurde, um die Verfärbung des Plattenhintergrundes durch einen

Mangel an Säure auszuschließen. Ein Mischungsverhältnis von 75 VT Salzsäure und 25 VT Ethanol 96 % erwies sich als optimal, um eine Blaufärbung der Zonen zu erzielen und die Verfärbung des Plattenhintergrundes gering zu halten.

Das entwickelte Verfahren zur dünn-schichtchromatographischen Analyse der "Weißdornblättern mit Blüten" und den daraus hergestellten Zubereitungen ist primär auf den Nachweis der Procyanidine fokussiert. Im Rahmen der Probenaufarbeitung durch Festphasenextraktion werden zwar auch die Flavonoide fraktioniert, der Nachweis der Flavonoide sollte jedoch immer auch durch die Derivatisierung mit Naturstoffreagenz erfolgen.

Das neue Verfahren zum dünn-schichtchromatographischen Nachweis der Flavonoide und Procyanidine in "Weißdornblättern mit Blüten" und in den daraus hergestellten Zubereitungen ist im Anhang unter 10.4 aufgeführt.

4.2 Validierung

4.2.1 Selektivität

Zum Nachweis der Selektivität des Verfahrens V wurden die folgenden Proben parallel auf einer Platte chromatographiert: Droge (MA002-02a), daraus hergestellter Extrakt (MA002-08a) und Fertigarzneimittel (MA002-17). Als Referenzsubstanzen wurden Epicatechin, Procyanidin B₂, Hyperosid und Rutosid verwendet.

Nach der Derivatisierung waren im Weißlicht die Referenzsubstanzen Rutin (R_f 0,4-0,5) und Hyperosid (R_f ca. 0,6) als gelbe Zonen und die Referenzsubstanzen Epicatechin (R_f ca. 0,9) und Procyanidin B₂ (R_f ca. 0,8) als blau-grün gefärbte Zonen zu erkennen. Die Untersuchungslösungen auf den Bahnen 1-3 (Flavonoid- und Catechinfractionen) zeigten Zonen, die in Bezug auf Lage, Form und Farbe mit Rutin, Hyperosid und Epicatechin eindeutig übereinstimmen. Eine weitere schwach blau gefärbte Zone, die in Bezug auf Farbe und Lage mit Procyanidin B₂ übereinstimmte, war zu sehen.

In den Fingerprints der Untersuchungslösungen auf den Bahnen 5-7 (Fraktionen der oligomeren Procyanidine) war eine Zone zu erkennen, die bezüglich der Farbe und des R_f -Werts mit der Zone des Procyanidin B_2 übereinstimmte. Unterhalb dieser Zone war in den Fingerprints der OPC-Fraktionen eine weitere blaue Zone zu erkennen.

Auf den Bahnen 9-11 (Fraktionen der polymeren Procyanidine) waren in den Fingerprints der Untersuchungslösung im mittleren R_f -Bereich eindeutig mehrere blau-grün gefärbte Zonen zu erkennen.

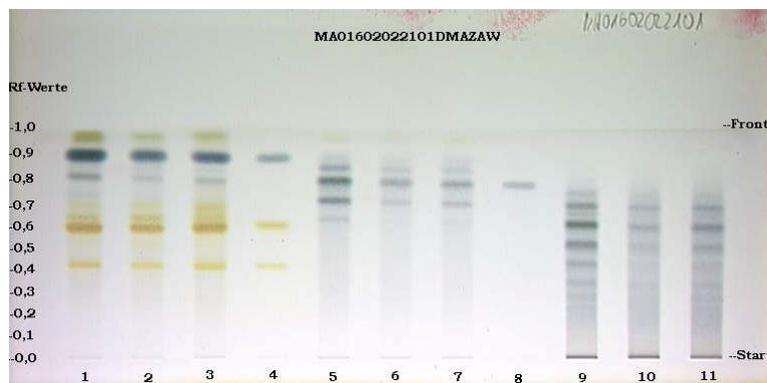


Abbildung 4-14: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung der Flavonoide und Procyanidine in einem Fertigarzneimittel, das Extrakt aus Weißdornblättern mit Blüten als Wirkstoff enthält; Droge Flavonoidfraktion (Bahn 1), Extrakt Flavonoidfraktion (Bahn 2), Fertigarzneimittel Flavonoidfraktion (Bahn 3), Referenzsubstanzen: Rutosid, Hyperosid, Epicatechin nach aufsteigenden R_f -Werten (Bahn 4), Droge OPC-Fraktion (Bahn 5), Extrakt OPC-Fraktion (Bahn 6), Fertigarzneimittel OPC-Fraktion (Bahn 7), Referenzsubstanz Procyanidin B_2 (Bahn 8), Droge PPC-Fraktion (Bahn 9), Extrakt PPC-Fraktion (Bahn 10), Fertigarzneimittel PPC-Fraktion (Bahn 11).

4.2.2 Robustheit

Im Rahmen der Robustheitsprüfungen wurde die Fließmittelstabilität über einen Zeitraum von 24 Stunden nachgewiesen. Es wurde belegt, dass sich die Fingerprints nicht verändern.

Prüfungen zur Stabilität des Derivatisierungsreagenzes wurden bereits im Rahmen der Methodenentwicklung und -optimierung durchgeführt.

4.3 Untersuchungen von acht Fertigarzneimitteln des deutschen Marktes, die Extrakt aus "Weißdornblättern mit Blüten" enthalten

Die Selektivität des Verfahrens V wurde neben dem oben aufgeführten Nachweis (4.2.1) belegt durch den chromatographischen Vergleich von Proben der Fertigarzneimittel mit und ohne Drageehülle bzw. Filmüberzug. Die Drageehülle bzw. der Filmüberzug wurden sorgfältig von den Kernen entfernt.

Die Aufarbeitung der Arzneimittel erfolgte durch Festphasenextraktion (2.6.1) Alle drei Fraktionen, die Flavonoide, die OPC und die PPC wurden analysiert.

Für die acht Fertigarzneimittel konnte belegt werden, dass die Hilfsstoffe des Überzuges die Detektion und Chromatographie nicht stören. (Abbildung 4-15, Abbildung 4-16, Abbildung 4-17). Die Chromatogramme der einzelnen Proben mit und ohne Drageehülle bzw. Filmüberzug stimmten überein in Bezug auf Anzahl, Lage, Farbe und Intensität der Zonen. Die Verzerrungen in dem unteren R_f -Bereich des Chromatogramms (Abbildung 4-15) resultierten aus einem technischen Problem beim Tauchen der Platte. Durch die Klammern, die zum Befestigen der Platte beim Tauchen dienen, entstanden die gelb gefärbten Unregelmäßigkeiten am unteren Plattenrand. Die Chromatographie wurde dadurch nicht negativ beeinflusst.

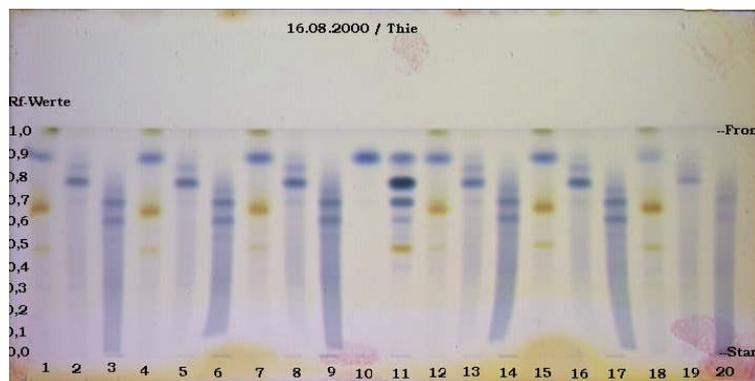


Abbildung 4-15: Fingerprints von drei Fertigarzneimitteln (MA002-9, MA002-10, MA002-11) **mit und ohne Filmüberzug**; die Fraktionen jedes Arzneimittels wurden in der Reihenfolge Flavonoide, OPC, PPC analysiert; MA002-9-A mit Filmüberzug (Bahn 1-3), MA002-10-A mit Filmüberzug (Bahn 4-6), MA002-11-A mit Filmüberzug (Bahn 7-9), Epicatechin (Bahn 10), Procyanidin B₂, Rutosid (Bahn 11), MA002-9-A ohne Filmüberzug (Bahn 12-14), MA002-10-A ohne Filmüberzug (Bahn 15-17), MA002-11-A ohne Filmüberzug (Bahn 18-20).

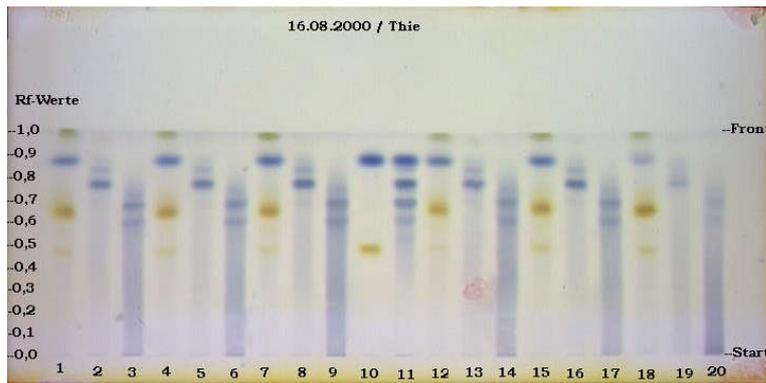


Abbildung 4-16: Fingerprints von drei Fertigarzneimitteln (MA002-12, MA002-13, MA002-14) **mit und ohne Drageehülle**; die Fraktionen jedes Arzneimittels wurden in der Reihenfolge Flavonoide, OPC, PPC analysiert; MA002-12-A mit Drageehülle (Bahn 1-3), MA002-13-A mit Drageehülle (Bahn 4-6), MA002-14-A mit Drageehülle (Bahn 7-9), Epicatechin (Bahn 10), Procyanidin B₂, Rutosid (Bahn 11), MA002-12-A ohne Drageehülle (Bahn 12-14), MA002-13-A ohne Drageehülle (Bahn 15-17), MA002-14-A ohne Drageehülle (Bahn 18-20).

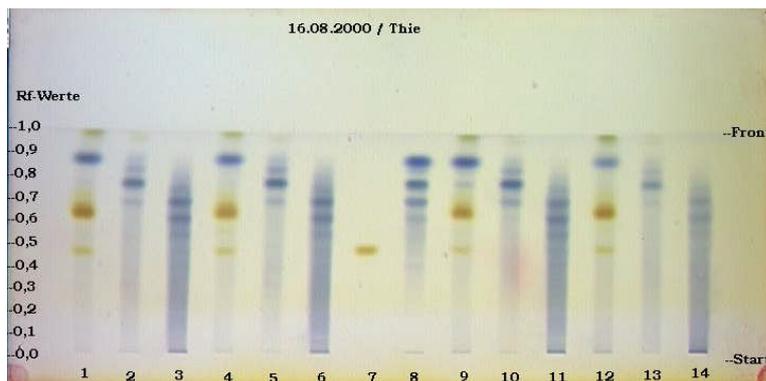


Abbildung 4-17: Fingerprints von zwei Fertigarzneimitteln (MA002-15, MA002-16) **mit und ohne Filmüberzug**; die Fraktionen jedes Arzneimittels wurden in der Reihenfolge Flavonoide, OPC, PPC analysiert; MA002-15-A mit Filmüberzug (Bahn 1-3), MA002-16-A mit Filmüberzug (Bahn 4-6), Rutosid (Bahn 7), Procyanidin B₂, Epicatechin (Bahn 8), MA002-15-A ohne Filmüberzug (Bahn 9-11), MA002-16-A ohne Filmüberzug (Bahn 12-14).

Unterschiedliche Chargen der Arzneimittel MA002-9, MA002-10, MA002-11, MA002-12, MA002-13, MA002-14, MA002-15 und MA002-16 wurden gemäß Verfahren V dünnschichtchromatographisch untersucht. Alle Arzneimittel wurden unter denselben Bedingungen analysiert, so dass ein objektiver Vergleich der einzelnen Chargen möglich war.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Abbildungen 4-18 bis 4-26 dargestellt. Die Fingerprints der einzelnen Fraktionen waren hinsichtlich Anzahl der Zonen sowie deren Lage und Farbe miteinander vergleichbar. In den Chromatogrammen der Flavonoidfraktion aller Untersuchungslösungen waren Zonen zu sehen, die denen der Referenzsubstanzen Epicatechin und Rutosid in Lage und Farbe entsprachen. In den Chromatogrammen der Procyanidinfraktionen waren die blauen Zonen der Procyanidine deutlich zu erkennen.

In den Chromatogrammen der Fraktionen der oligomeren Procyanidine (2-8 Monomere) war im oberen R_f -Bereich die blaue Zone des Procyanidin B_2 zu identifizieren. Im R_f -Bereich von 0,6 bis 0,0 waren keine Zonen zu erkennen. In den Chromatogrammen der Fraktionen der polymeren Procyanidine waren im mittleren R_f -Bereich blaue Zonen zu erkennen. Für die Bestimmung der polymeren Procyanidine wäre es nötig, die entsprechenden Procyanidine zu isolieren und zu identifizieren.

Qualitativ waren alle in diesem Projekt untersuchten Arzneimittel hinsichtlich ihrer Fingerprints gleich zu bewerten. Flavonoide, Catechine und Procyanidine - sowohl oligomere als auch polymere - waren in den Fertigarzneimitteln enthalten.

Der visuelle Vergleich der Fingerprints der einzelnen Chargen ergab jedoch Differenzen in Bezug auf die Intensität der Zonen. Dies ließ auf einen schwankenden Gehalt an Flavonoiden und Procyanidinen schließen.

Dünnschichtchromatographische Analyse des Arzneimittels MA002-09

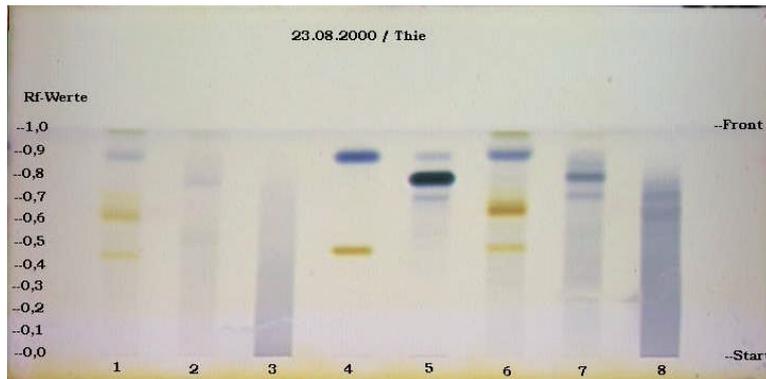


Abbildung 4-18: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von zwei Chargen des Arzneimittels MA002-09; Flavonoidfraktion MA002-09-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-09-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-09-A (Bahn 3), Epicatechin, Rutosid (Bahn 4), Procyanidin B₂ (Bahn 5), Flavonoidfraktion MA002-09-B (Bahn 6), OPC-Fraktion MA002-09-B (Bahn 7), PPC-Fraktion MA002-09-B (Bahn 8).

Dünnschichtchromatographische Analyse des Arzneimittels MA002-10

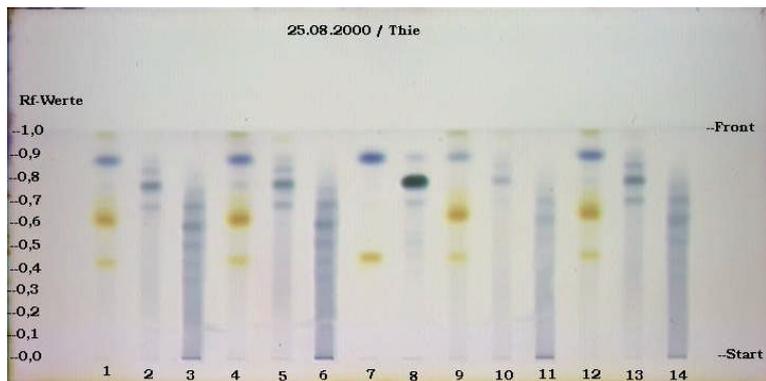


Abbildung 4-19: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von vier Chargen des Arzneimittels MA002-10; Flavonoidfraktion MA002-10-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-10-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-10-A (Bahn 3), Flavonoidfraktion MA002-10-C (Bahn 4), OPC-Fraktion MA002-10-C (Bahn 5), PPC-Fraktion MA002-10-C (Bahn 6), Epicatechin, Rutosid (Bahn 7), Procyanidin B₂ (Bahn 8), Flavonoidfraktion MA002-10-D (Bahn 9), OPC-Fraktion MA002-10-D (Bahn 10), PPC-Fraktion MA002-10-D (Bahn 11), Flavonoidfraktion MA002-10-B (Bahn 12), OPC-Fraktion MA002-10-B (Bahn 13), PPC-Fraktion MA002-10-B (Bahn 14).

Dünnschichtchromatographische Analyse des Arzneimittels MA002-11 (Chargen A,B,D)

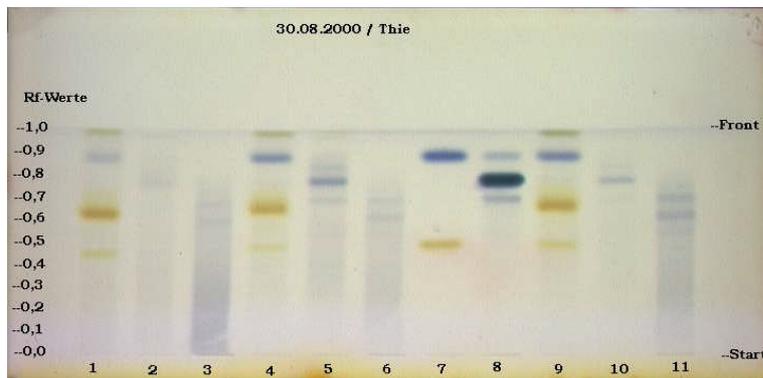


Abbildung 4-20: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von drei Chargen des Arzneimittels MA002-11; Flavonoidfraktion MA002-11-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-11-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-11-A (Bahn 3), Flavonoidfraktion MA002-11-B (Bahn 4), OPC-Fraktion MA002-11-B (Bahn 5), PPC-Fraktion MA002-11-B (Bahn 6), Epicatechin, Rutosid (Bahn 7), Procyanidin B₂ (Bahn 8), Flavonoidfraktion MA002-11-D (Bahn 9), OPC-Fraktion MA002-11-D (Bahn 10), PPC-Fraktion MA002-11-D (Bahn 11).

Dünnschichtchromatographische Analyse des Arzneimittels MA002-11 (Chargen C, F, E)

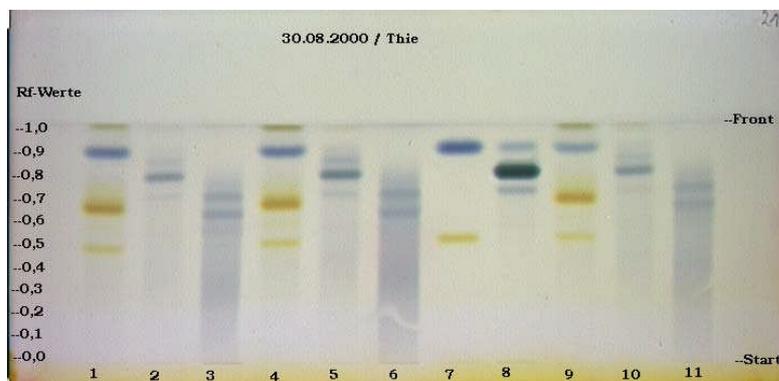


Abbildung 4-21: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von drei Chargen des Arzneimittels MA002-11; Flavonoidfraktion MA002-11-F (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-11-F (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-11-F (Bahn 3), Flavonoidfraktion MA002-11-C (Bahn 4), OPC-Fraktion MA002-11-C (Bahn 5), PPC-Fraktion MA002-11-C (Bahn 6), Epicatechin, Rutosid (Bahn 7), Procyanidin B₂ (Bahn 8), Flavonoidfraktion MA002-11-E (Bahn 9), OPC-Fraktion MA002-11-E (Bahn 10), PPC-Fraktion MA002-11-E (Bahn 11).

Dünnschichtchromatographische Analyse des Arzneimittels MA002-12

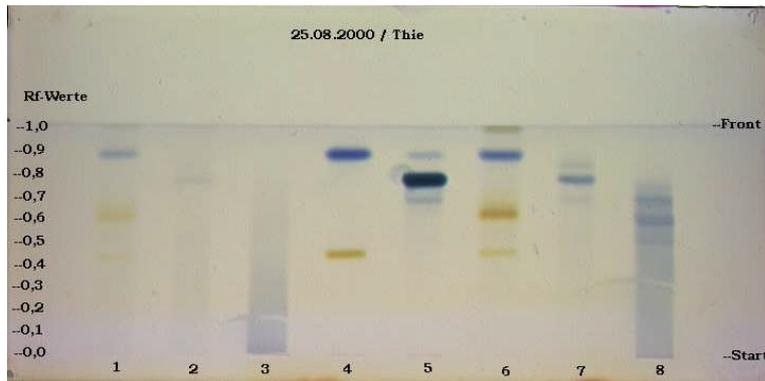


Abbildung 4-22: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von zwei Chargen des Arzneimittels MA002-12; Flavonoidfraktion MA002-12-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-12-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-12-A (Bahn 3), Epicatechin, Rutosid (Bahn 4), Procyanidin B₂ (Bahn 5), Flavonoidfraktion MA002-12-B (Bahn 6), OPC-Fraktion MA002-12-B (Bahn 7), PPC-Fraktion MA002-12-B (Bahn 8).

Vergleich der Arzneimittel MA002-11, MA002-12, MA002-13 (die Arzneimittel enthalten differierende Mengen des Extrakts)

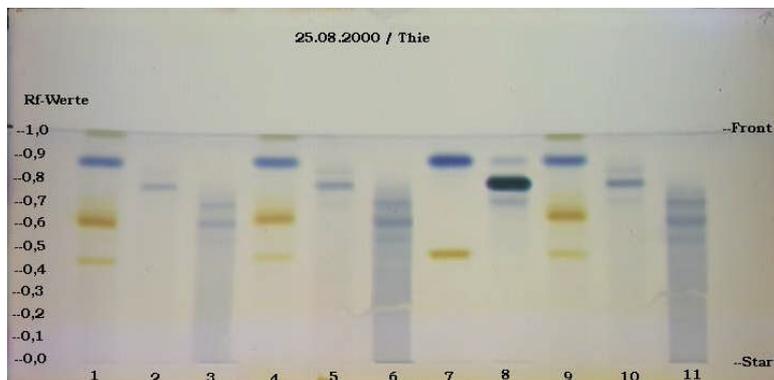


Abbildung 4-23: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von drei Chargen der Arzneimittel MA002-11, MA002-12, MA002-13; Flavonoidfraktion MA002-11-D (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-11-D (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-11-D (Bahn 3), Flavonoidfraktion MA002-13 (Bahn 4), OPC-Fraktion MA002-13 (Bahn 5), PPC-Fraktion MA002-13 (Bahn 6), Epicatechin, Rutosid (Bahn 7), Procyanidin B₂ (Bahn 8), Flavonoidfraktion MA002-12-A (Bahn 9), OPC-Fraktion MA002-12-A (Bahn 10), PPC-Fraktion MA002-12-A (Bahn 11).

Dünnschichtchromatographische Analyse des Arzneimittels MA002-14

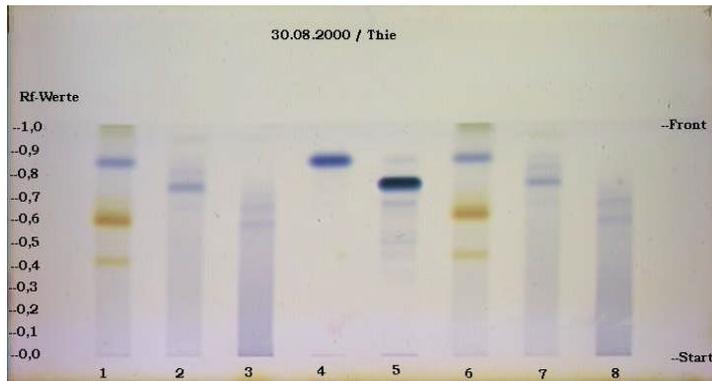


Abbildung 4-24: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von zwei Chargen des Arzneimittels MA002-14; Flavonoidfraktion MA002-14-B (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-14-B (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-14-B (Bahn 3), Epicatechin, Rutosid (Bahn 4), Procyanidin B₂ (Bahn 5), Flavonoidfraktion MA002-14-A (Bahn 6), OPC-Fraktion MA002-14-A (Bahn 7), PPC-Fraktion MA002-14-A (Bahn 8).

Dünnschichtchromatographische Analyse des Arzneimittels MA002-15

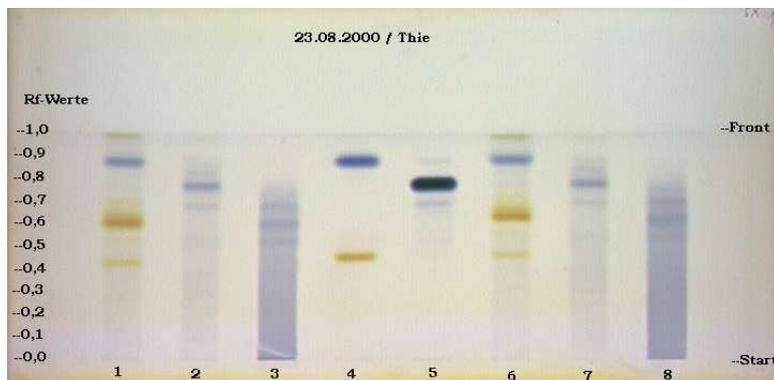


Abbildung 4-25: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von zwei Chargen des Arzneimittels MA002-15; Flavonoidfraktion MA002-15-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-15-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-15-A (Bahn 3), Epicatechin, Rutosid (Bahn 4), Procyanidin B₂ (Bahn 5), Flavonoidfraktion MA002-15-B (Bahn 6), OPC-Fraktion MA002-15-B (Bahn 7), PPC-Fraktion MA002-15-B (Bahn 8).

Dünnschichtchromatographische Analyse des Arzneimittels MA002-16

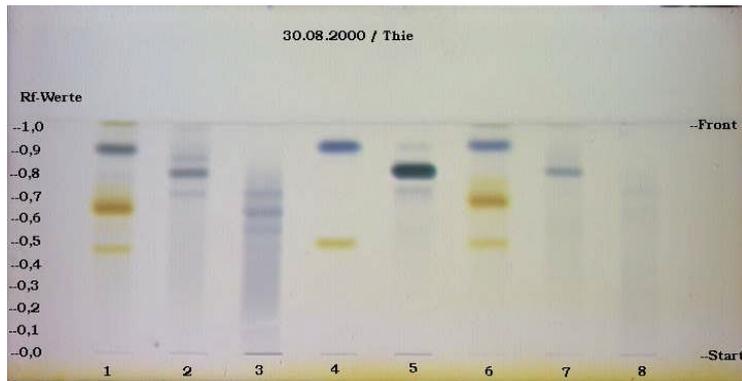


Abbildung 4-26: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von zwei Chargen des Arzneimittels MA002-16; Flavonoidfraktion MA002-16-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-16-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-16-A (Bahn 3), Epicatechin, Rutosid (Bahn 4), Procyanidin B₂ (Bahn 5), Flavonoidfraktion MA002-16-B (Bahn 6), OPC-Fraktion MA002-16-B (Bahn 7), PPC-Fraktion MA002-16-B (Bahn 8).

5 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Arzneidroge "Traubensilberkerzenwurzelstock" und daraus hergestellten Zubereitungen

Ein dünnschichtchromatographisches Verfahren zur Identitätsprüfung der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock, des daraus hergestellten Extrakts und der Fertig- arzneimittel, die diesen Extrakt als aktive Substanz enthalten, sollte entwickelt und optimiert werden. Als Referenzsubstanzen sollten Actein, 27-Deoxyactein, Cimiracemoside, Kaffeesäure und Formononetin verwendet werden.

Da diese Substanzen nicht parallel in einem Chromatogramm zu detektieren waren, wurden zwei Verfahren entwickelt. Ein Verfahren zur Analyse der Triterpenglykoside in Traubensilberkerzenwurzelstock und ein zweites zur Analyse der Hydroxyzimtsäurederivate.

5.1 Triterpenglykoside in Traubensilberkerzenwurzelstock

5.1.1 Entwicklung und Optimierung

Die Anwendung der Methoden zur Analyse der Droge von Wagner und Blatt (Wagner und Blatt 1996) und des britischen Arzneibuchs (BHP 1996) ergaben keine Chromatogramme, die geeignet waren, die Droge zu identifizieren. Die Zonen der Triterpenglykoside im Fingerprint waren nicht ausreichend getrennt. Die Identifizierung der Flavonoide und Hydroxyzimtsäurederivate war nicht eindeutig möglich.

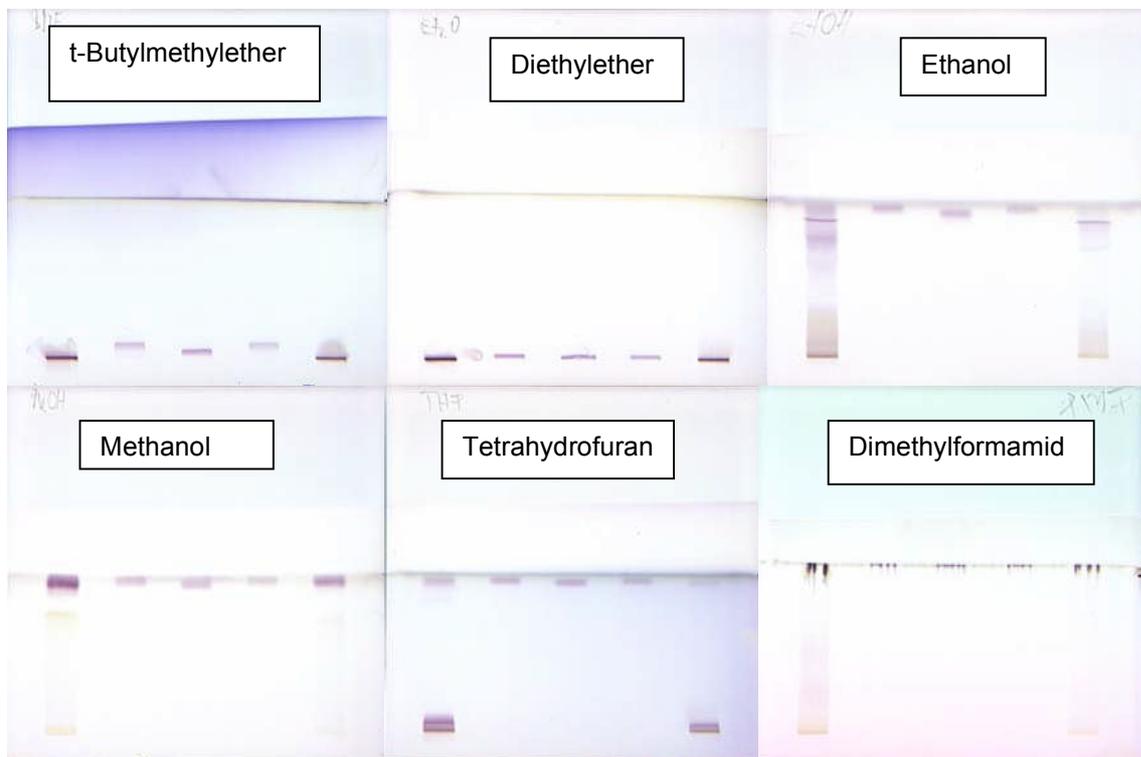
Die Methodenentwicklung wurde analog den bereits erläuterten Entwicklungen und Optimierungen (3.1 und 4.1) durchgeführt. Aus diesem Grund sind in diesem Kapitel nicht alle Analysen wiederholt erläutert. Es werden die durchgeführte Fließmittelloptimierung und die Versuche zur Problematik der Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz erläutert.

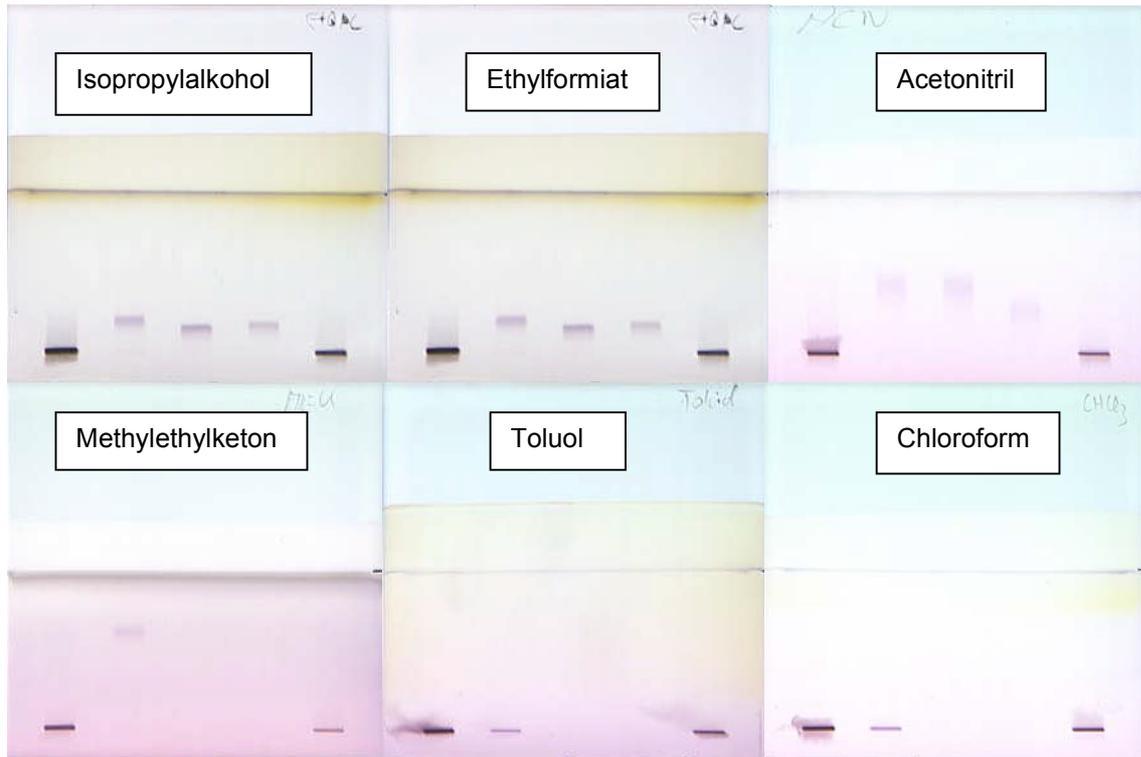
5.1.1.1 Fließmitteloptimierung

Die Fließmitteloptimierung erfolgte wie unter 2.7 beschrieben. Sie ist in Abbildung 5-1 dargestellt. Die Chromatographie wurde mit der authentischen Droge MA007-066 (immer Bahn 1 und 5) und den Referenzsubstanzen Actein (immer Bahn 2), 27-Deoxyactein (immer Bahn 3) und Cimiracemoside (immer Bahn 4) durchgeführt. Zunächst wurden die Platten mit den reinen Lösungsmitteln entwickelt. Die Derivatisierung erfolgte mit Anisaldehyd - Reagenz.

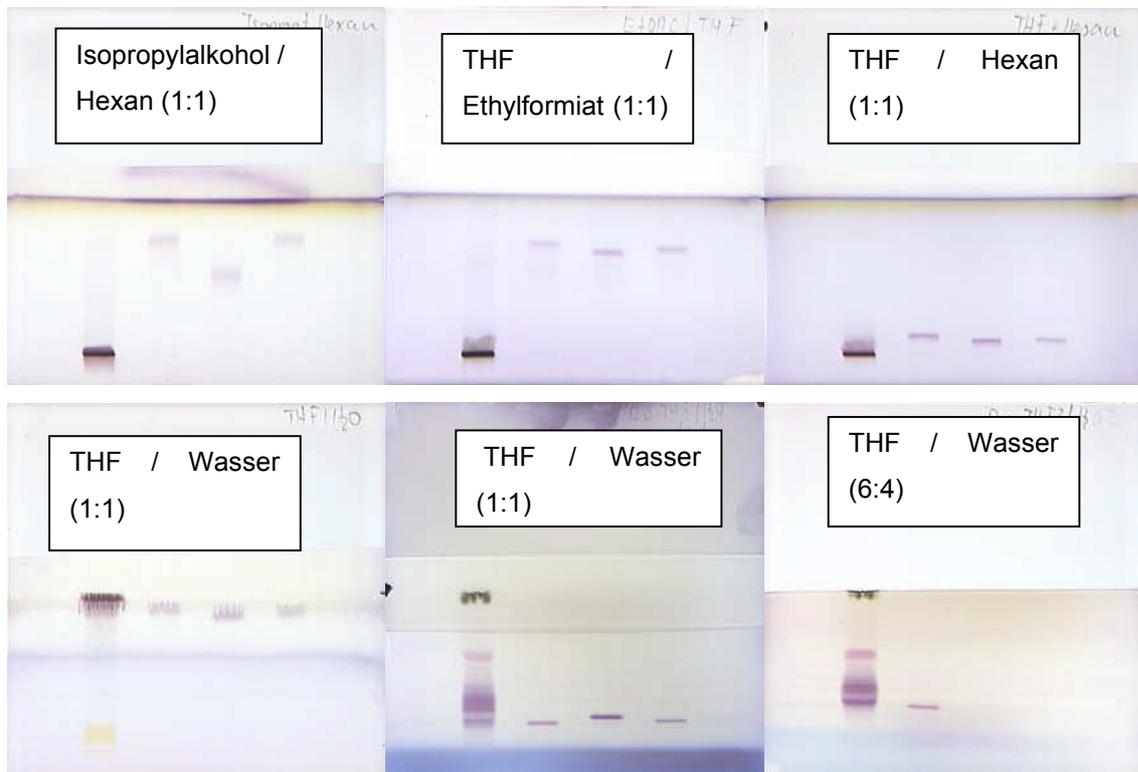
Die Lösungsmittel Isopropylalkohol, Ethylformiat und Tetrahydrofuran (THF) wurden in der zweiten Stufe der Optimierung mit Hexan und Wasser kombiniert. Eine zufriedenstellende Trennung der Triterpenglykoside konnte nicht erzielt werden. Erst die Kombination mit Ameisensäure und Toluol ermöglichte eine Trennung der Substanzen Actein und 27-Deoxyactein. Die Cimiracemoside lagen auf einer Höhe mit Actein und wurden daher nicht weiter als Referenzsubstanzen für die Chromatographie verwendet. Mit dem Lösungsmittelgemisch Ethylformiat / Toluol / Ameisensäure (3:5:2) wurde die schärfste Trennung der Zonen erreicht. Die Zonen von Actein und 27-Deoxyactein lagen so dicht beieinander, weil sie sich chemisch nur durch eine Hydroxygruppe am Atom C₂₇ unterscheiden.

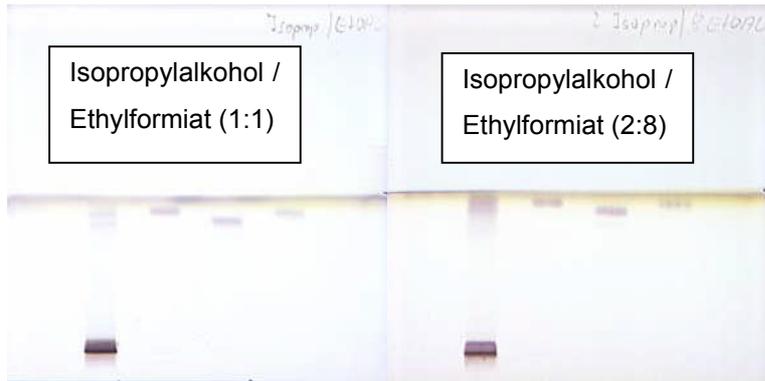
Stufe 1:





Stufe 2:





Stufe 3 und 4:

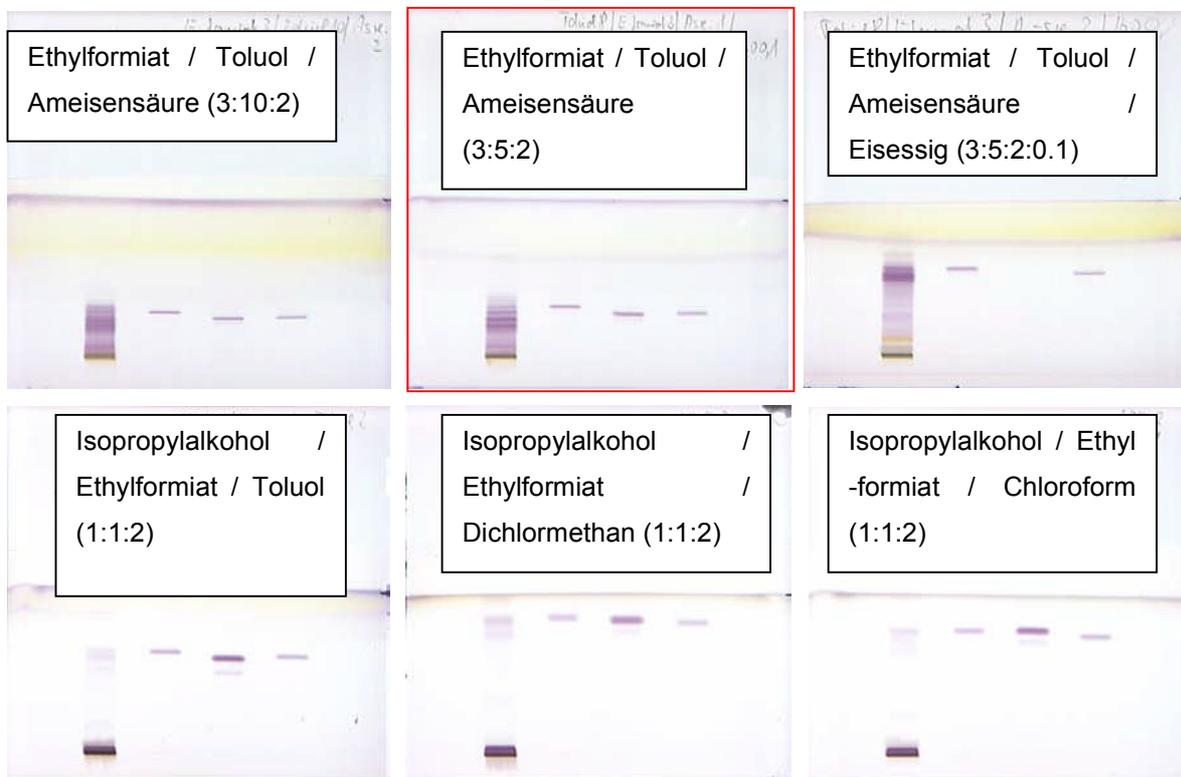


Abbildung 5-1: Fließmitteloptimierung; Trennung der Triterpenglykoside in der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock.

5.1.1.2 Derivatisierung

Die Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz ist wenig reproduzierbar, da die Färbung der Zonen und des Plattenhintergrunds durch äußere Einflüsse stark variieren kann. Aus diesem Grund wurde versucht, stabilere Reagenzien zu verwenden. Untersucht wurden Schwefelsäurereagenz (Schwefelsäure in Wasser und in Methanol), Manganchlorid-Reagenz, Tetrazolblaureagenz und Folins-Reagenz. Schwefelsäurereagenz wird in der Phytoanalytik häufig verwendet. Es ist ein stabiles Reagenz und die Färbung der Zonen ist gut reproduzierbar. Für die Derivatisierung der Triterpenglykoside war es jedoch nicht optimal, da die Zonen mit dem wässrigen Reagenz gar nicht angefärbt wurden und mit der methanolischen Schwefelsäure nur unscharf und diffus zu erkennen waren. Mit Manganchlorid-reagenz wurden die Zonen der Triterpenglykoside zwar angefärbt, waren aber ebenfalls diffus. Folins Reagenz färbte die Zonen von Actein und 27-Deoxyactein gar nicht an. Der Vergleich der Reagenzien ergab, dass Anisaldehyd-Reagenz die Zonen anfärbte und dabei auch die schärfsten Zonen im Chromatogramm entstanden. Allerdings war es notwendig bei der Derivatisierung mit diesem Reagenz alle Schritte explizit festzulegen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Die entsprechenden Untersuchungen wurden im Rahmen der Validierung durchgeführt (5.1.2.2).

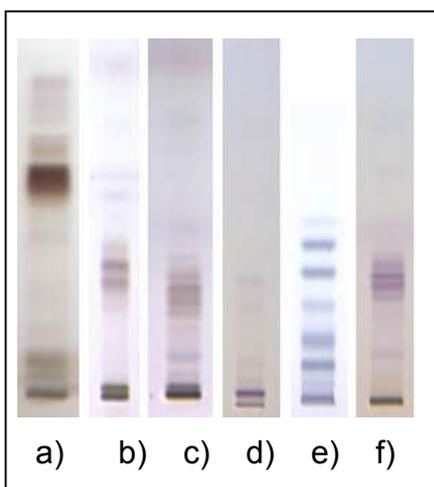


Abbildung 5-2: Vergleich unterschiedlicher Derivatisierungsreagenzien, a) Schwefelsäure 10 % in Wasser, b) Schwefelsäure 19 % in Methanol, c) Manganchlorid-Reagenz, d) Tetrazolblau - Reagenz, e) Folins Reagenz, f) Anisaldehyd - Reagenz.

Das neue Verfahren zum dünnschichtchromatographischen Nachweis der Triterpenglykoside in "Traubensilberkerzenwurzelstock" und in den daraus hergestellten Zubereitungen ist im Anhang unter 10.4 aufgeführt.

5.1.2 Validierung

Das Verfahren VI wurde wie unter 2.17 beschrieben validiert.

5.1.2.1 Selektivität

Die Selektivität des Verfahrens zur Identitätsprüfung der Droge wurde belegt durch vergleichende Fingerprintanalytik von authentischen Drogen (MA007-066, MA007-123, MA007-124, MA007-125 authentische Drogen laut Zertifikat) mit folgenden Drogen: eine unbekannte Serratula Spezies mit der Deklaration: Guan Dong Sheng Ma-Sheng Ma (MA007-065), eine Droge mit der Deklaration: *Cimicifuga racemosa* (MA007-067), eine weitere unbekannte Spezies mit der Deklaration: Sheng Ma (MA007-068) und eine Droge mit der Deklaration *Actaea podocarpa* (MA007-113) (Abbildung 5-3).

Die Chromatogramme der Referenzlösungen zeigten jeweils im mittleren R_f -Bereich eine Zone, die mit der Farbe rosa-lilafarben zu beschreiben war. Die Zone des Actein lag bei $R_f = 0,41$, die Zone des 27-Deoxyactein bei $R_f = 0,37$. In den Chromatogrammen des Drogenmaterials auf den Bahnen 7-10 und der als *Cimicifuga racemosa* deklarierten Droge auf Bahn 2 waren Zonen zu sehen, die denen der Referenzsubstanzen in Bezug auf Farbe, Form und Lage entsprachen. In diesem Bereich werden die für *Cimicifuga racemosa* spezifischen Triterpenglykoside detektiert. In dem Fingerprint der authentischen Droge auf Bahn 7 war im unteren R_f -Bereich eine weitere lilafarbene Zone zu erkennen. Diese Zone war in den Fingerprints der Drogen, die als *Cimicifugae rhizoma* deklariert waren nicht zu erkennen. Da die Zone jedoch auch in dem Fingerprint der Droge auf Bahn 7 nur sehr schwach zu sehen war, sollte sie nicht zur Differenzierung der Fingerprints herangezogen werden. Der Vergleich einzelner Fingerprints sollte immer anhand charakteristischer Zonen erfolgen, da das Inhaltsstoffmuster von Pflanzenmaterial oft kleine Variabilitäten zeigt (siehe 7.2 Selektivität).

Im Fingerprint der Droge auf Bahn 1 waren im mittleren R_f -Bereich keine Zonen zu erkennen. Im Chromatogramm der Droge auf Bahn 3 waren zwei rosa-lilafarbene Zonen im mittleren R_f -Bereich zu erkennen, die bezüglich ihrer Lage jedoch nicht mit Actein und 27-Deoxyactein übereinstimmten. Im Fingerprint der Droge auf Bahn 4 war die Zone des Acteins nicht zu erkennen, aber auf der Höhe des 27-Deoxyacteins war eine rosafarbene Zone zu sehen.

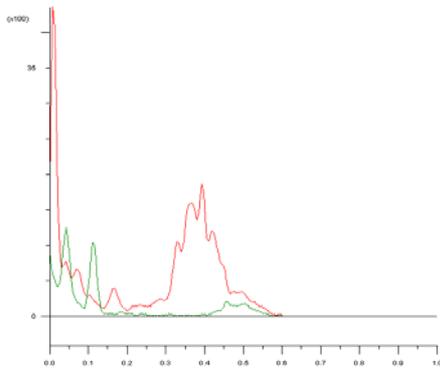
Der Vergleich der Analogkurven zeigte, dass der Fingerprint der authentischen Droge (MA007-066) nicht mit den Fingerprints der Drogen MA007-065, MA007-068 und MA007-113 übereinstimmte (Abbildung 5-4). Die Identität der als *Cimicifuga racemosa* deklarierten Droge auf Bahn 2 hingegen konnte über den Analogkurvenvergleich bestätigt werden. Ein Analogkurvenvergleich der vier als *Cimicifuga racemosa* deklarierten und zertifizierten Drogen ergab übereinstimmende Kurven.

Es konnte somit belegt werden, dass die Methode geeignet ist, die Droge Traubensilberkerzenwurzelstock zu identifizieren.

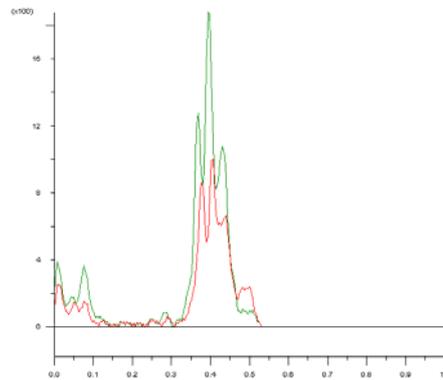


Abbildung 5-3: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock anhand der Triterpenglykoside; MA007-065 (Bahn 1), MA007-067 (Bahn 2), MA007-068 (Bahn 3), MA007-113 (Bahn 4), Referenzlösung Actein (Bahn 5), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 6), MA007-066 (Bahn 7), MA007-123 (Bahn 8), MA007-124 (Bahn 9), MA007-125 (Bahn 10).

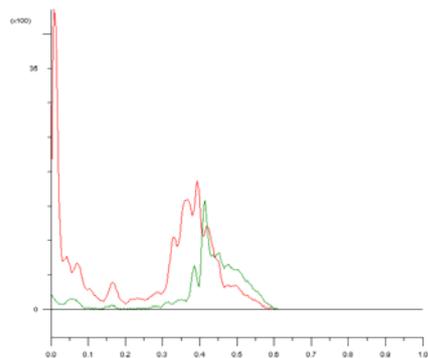
Vergleich der Analogkurven der Drogen MA007-066 (*Cimicifuga racemosa*, authentische Droge laut Zertifikat), MA007-065 eine unbekannte *Serratula* Spezies mit der Deklaration: Guan Dong Sheng Ma-Sheng Ma, MA007-067 eine Droge mit der Deklaration: *Cimicifuga racemosa*, MA007-068 eine weitere unbekannte Spezies mit der Deklaration: Sheng Ma und MA007-113 eine Droge mit der Deklaration *Actaea podocarpa*. Der Analogkurvenvergleich der authentischen Droge (MA007-006, MA007-123, MA007-124, MA007-125) konnte aus technischen Gründen nicht abgebildet werden.



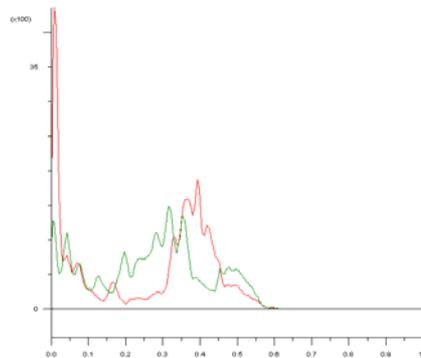
MA007-066 – MA007-065



MA007-066 – MA007-067



MA007-066 – MA007-068



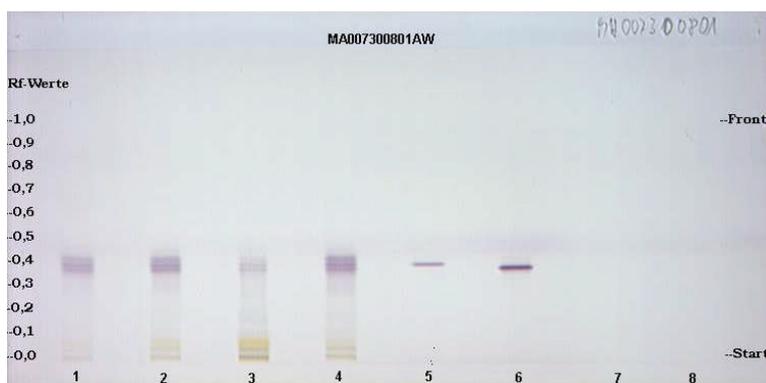
MA007-066 – MA007-113

Abbildung 5-4: Analogkurvenvergleich der authentischen Droge MA007-066 (jeweils rote Kurve) mit den Drogen MA007-065, MA007-067, MA007-068, MA007-113 (jeweils grüne Kurve).

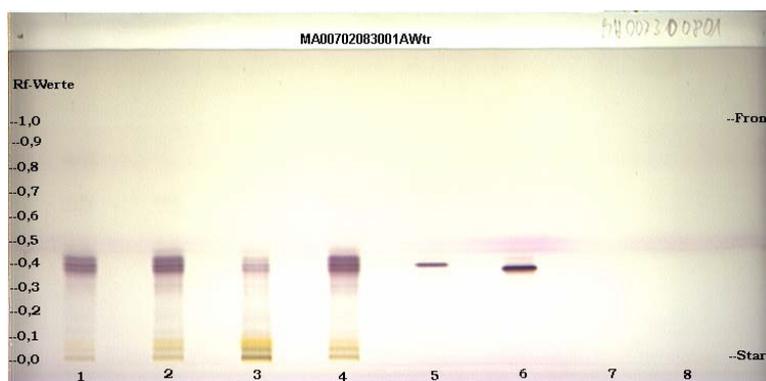
Fingerprintanalytik des Extraktes

Die Fingerprints des Extraktes (MA007-120) und der Ausgangsdroge (MA007-117) wurden mittels vergleichender Fingerprintanalytik untersucht. Neben dem nativen Extrakt (MA007-120) wurden auch zwei Versuchsextrakte (MA007-118, MA007-119), die aus derselben Droge hergestellt wurden, in die Prüfung einbezogen (Abbildung 5-5). Im mittleren R_f -Bereich des Chromatogramms waren die rosa-violettfarbenen Zonen der Referenzsubstanzen Actein ($R_f = 0,40$) und 27-Deoxyactein ($R_f = 0,39$) zu erkennen. In den Fingerprints der Droge (Bahn 1) und der Extrakte (Bahn 2-4) waren Zonen zu erkennen, die denen von Actein und 27-Deoxyactein in Bezug auf Lage, Farbe und Intensität entsprachen. Die Auswertung der Platte im Durchlicht zeigte deutlich die gelb-braunen Zonen im unteren R_f -Bereich aller Fingerprints.

Die Fingerprints von Droge und Extrakt stimmten überein. Auf den Bahnen 7 und 8 waren keine Zonen zu erkennen. Die Stellmittel störten die Chromatographie nicht.



Aufnahme im Weißlicht



Aufnahme mit Durchlicht

Abbildung 5-5: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung des Extrakts der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock anhand der Triterpenglykoside; MA007-117 (Bahn 1), MA007-118 (Bahn 2), MA007-119 (Bahn 3), MA007-120 (Bahn 4), Referenzlösung Actein (Bahn 5), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 6), MA007-121 (Bahn 7), MA007-122 (Bahn 8).

Fingerprintanalytik des Fertigarzneimittels

Die Fingerprints des Fertigarzneimittels (MA007-126), des Extrakts (MA007-131) und der Hilfsstoffmischung (MA007-130) wurden miteinander verglichen.

Im Chromatogramm waren auf den Bahnen 1 und 6 bzw. 2 und 7 im mittleren R_f -Bereich die rosa-lilafarbenen Zonen des Acteins ($R_f=0,41$) und des 27-Deoxyacteins ($R_f=0,39$) zu erkennen. In den Fingerprints des Extrakts (MA007-131) auf Bahn 3 und des Fertigarzneimittels (MA007-126) auf Bahn 4 waren die Zonen der Referenzsubstanzen deutlich zu sehen. Sie waren vergleichbar in Bezug auf Farbe, Lage und Intensität. Im unteren R_f -Bereich der Fingerprints waren gelb-braune Zonen zu erkennen. Auf Bahn 5 waren keine Zonen zu detektieren. Die Hilfsstoffe störten die Chromatographie nicht.



Abbildung 5-6: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung eines Fertigarzneimittels, das Extrakt der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock enthält; Referenzlösung Actein (Bahn 1), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 2), MA007-131 (Bahn 3), MA007-126 (Bahn 4), MA007-130 (Bahn 5), Referenzlösung Actein (Bahn 6), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 7).

Die Methode ist selektiv für die dünnschichtchromatographische Fingerprintanalyse der Triterpenglykoside in der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock und daraus hergestelltem Extrakt und Fertigarzneimittel.

5.1.2.2 Robustheit

Stabilität des Analyten

Stabilität vor der Chromatographie

Die Stabilität der authentischen Droge (Probe MA007-066) wurde über einen Zeitraum von 4 Stunden in Lösung und auf der Platte nachgewiesen.

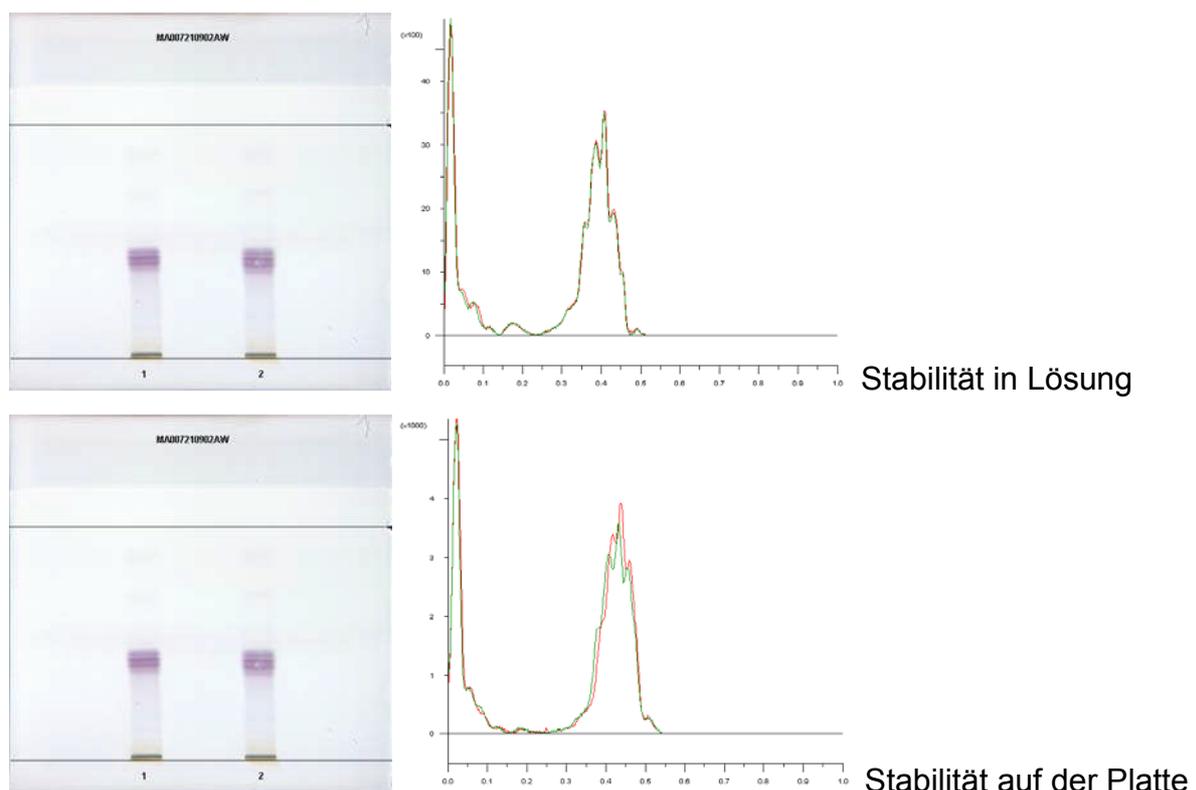


Abbildung 5-7: Stabilität der Droge (MA007-066) in der Probenlösung und auf der Platte.

Die Fingerprints auf beiden Platten stimmten überein in Bezug auf Anzahl, Farbe, Intensität und Position der Zonen. Der Analogkurvenvergleich zeigte, dass die Chromatogramme gleich sind.

Die Droge ist vor der Chromatographie sowohl in Lösung als auch auf der Platte stabil.

Stabilität während der Chromatographie

Der Nachweis wurde durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie erbracht.



Abbildung 5-8: Stabilität der Extraktlösung während der Chromatographie.

Die Zonen lagen alle auf der Geraden zwischen Auftragepunkt und Schnittpunkt der Fließmittelfronten. Neben der Geraden waren keine Zonen zu erkennen, die auf Instabilitäten der Droge hindeuten könnten.

Die Probenlösung der Droge ist während der Chromatographie stabil.

Temperatur und Luftfeuchtigkeit

Die Veränderungen der R_f -Werte unter dem Einfluss steigender Temperatur und sinkender relativer Feuchte im Labor wurden überprüft. Fünf dünnschichtchromatographische Analysen der Droge MA007-066 wurden an einem heißen Sommertag in einem nicht klimatisierten Labor durchgeführt. Die R_f -Werte der Referenzsubstanzen Actein und 27-Deoxyactein wurden verglichen.

In Tabelle 1 sind die Temperatur- und Feuchtigkeitswerte, die zum jeweiligen Prüfzeitpunkt gemessen wurden, aufgeführt. Außerdem sind die R_f -Werte der Substanzen Actein und 27-Deoxyactein der fünf Chromatogramme aufgelistet. Der Fingerprintvergleich zeigte deutlich, dass die R_f -Werte abnehmen (Abbildung 5-9).

Die R_f -Werte im Chromatogramm verringern sich mit steigender Temperatur und abnehmender Luftfeuchtigkeit.

Tabelle 5-1: R_f -Werte der Referenzsubstanzen Actein und 27-Deoxyactein sowie Temperatur und Luftfeuchtigkeit zum Zeitpunkt der Chromatographie.

	Temperatur [°C]	Luftfeuchtigkeit [% relative Feuchte]	R_f - Wert Actein	R_f - Wert 27-Deoxyactein
1	27	52	0,41	0,38
2	28	50	0,38	0,35
3	30	48	0,35	0,32
4	31	47	0,33	0,31
5	32	46	0,27	0,23

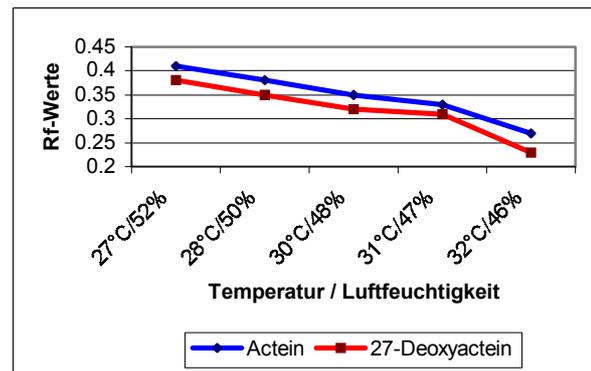
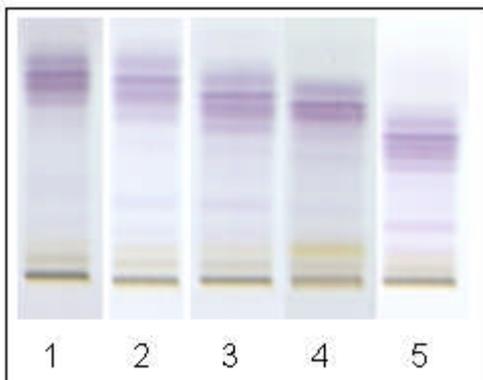


Abbildung 5-9: Darstellung von fünf Fingerprints, die unter dem Einfluss von Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen erstellt wurden und Veränderung der R_f -Werte von Actein und 27-Deoxyactein in Abhängigkeit von Temperatur und Luftfeuchtigkeit

Entwicklungskammer

Die Entwicklung der Chromatographie wurde in der gesättigten Horizontal-Entwicklungskammer und der gesättigten Doppeltröckammer durchgeführt.

Die Sequenz der Zonen beider Fingerprints war gleich. Die R_f -Werte lagen jedoch bei der Entwicklung in der Horizontal-Entwicklungskammer höher als bei der Doppeltröckammer (Abbildung 5-10).

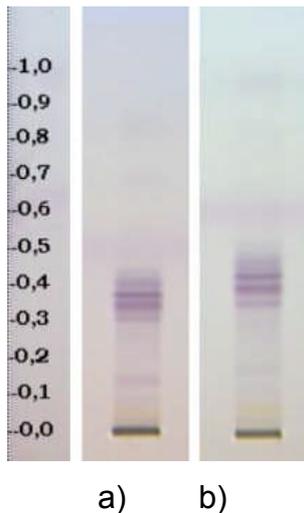


Abbildung 5-10: Fingerprintvergleich nach Entwicklung in der gesättigten Doppeltrogkammer (a) und nach Entwicklung in der gesättigten Horizontal-Entwicklungskammer (b).

Für Identitätsprüfungen können beide Kammertypen verwendet werden. Um über einen längeren Zeitraum vergleichbare Fingerprints zu erzielen, müssen Chromatogramme im Rahmen von Stabilitätsstudien jedoch immer in derselben Kammer entwickelt werden.

Stabilität des Fließmittels

Die Fließmittelstabilität wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden belegt. Die Auswertung erfolgte durch vergleichende Fingerprintanalytik und durch Analogkurvenvergleich (Abbildung 5-11). Die Fingerprints waren miteinander vergleichbar in Bezug auf die Anzahl, die Lage, die Farbe und die Intensität der Zonen vergleichbar. Die unterschiedliche Färbung des Plattenhintergrundes war auf die Derivatisierung zurückzuführen.

Das Fließmittel war über einen Zeitraum von 24 Stunden stabil.

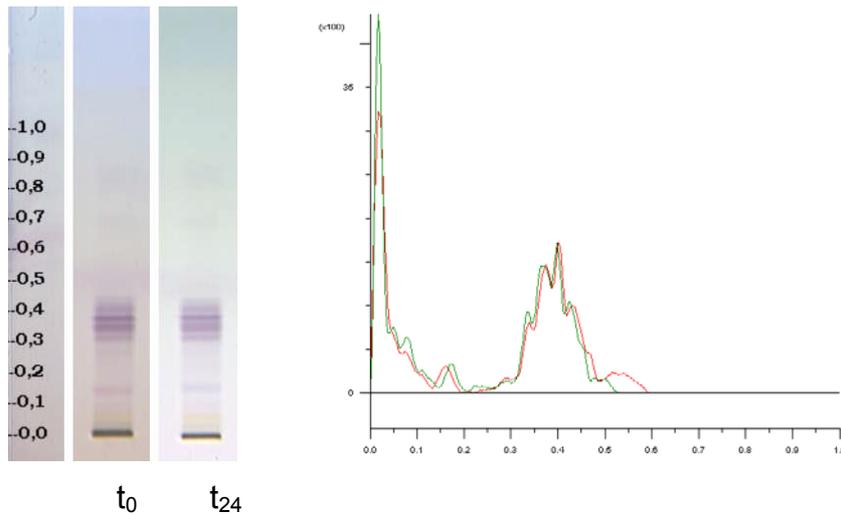


Abbildung 5-11: Fließmittelstabilität über 24 Stunden.

Trennstrecke

Der Einfluss der Trennstrecke auf die R_f -Werte wurde überprüft. Die Trennstrecke wurde von 6 auf 8 cm verlängert. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Fingerprints. Die R_f -Werte veränderten sich nicht, die Sequenz der Zonen im Fingerprint blieb gleich (Abbildung 5-12).

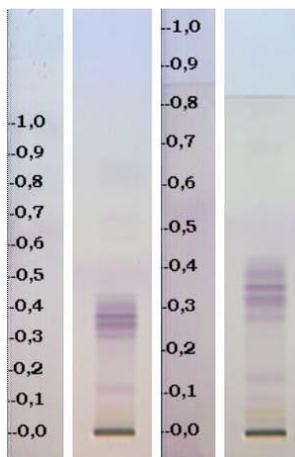


Abbildung 5-12: Fingerprintvergleich unterschiedlich langer Laufstrecken.

Wird das Verfahren für Identitätsprüfungen angewendet, so hat die Trennstrecke keinen Einfluss auf das Ergebnis. Im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen muss die Trennstrecke von 6 cm strikt eingehalten werden, da die resultierenden Fingerprints sonst nicht miteinander vergleichbar sind.

Stabilität des Derivatisierungsreagenzes

Die Stabilität des Anisaldehyd-Reagenzes wurde überprüft, da die Färbung der Zonen im Chromatogramm und vor allem des Plattenhintergrundes nach der Derivatisierung häufig nicht vergleichbar war.

Zwei entwickelte Platten wurden in einem Zeitabstand von 90 Minuten in demselben Reagenz getaucht. Es zeigte sich, dass schon nach so kurzer Zeit die Ergebnisse nicht mehr miteinander vergleichbar waren. Der Hintergrund der zweiten Platte zeigte zwei rosa gefärbte Fronten (Abbildung 5-13).

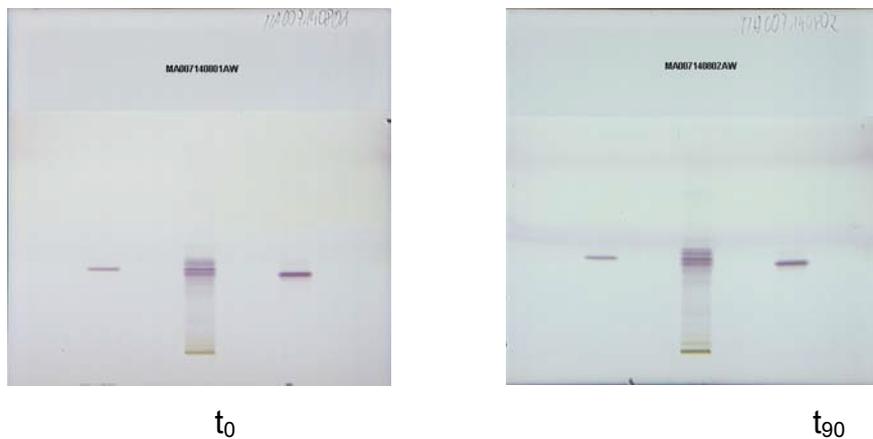


Abbildung 5-13: Stabilität des Anisaldehyd-Reagenzes über einen Zeitraum von 90 Minuten. Referenzlösung Actein (Bahn 1), authentische Droge (MA007-066) (Bahn 2), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 3).

Anisaldehyd-Reagenz sollte für jede Analyse frisch hergestellt werden, um vergleichbare Chromatogramme zu erzielen.

Derivatisierung auf dem Plattenheizer

Es wurde überprüft, inwieweit sich das chromatographische Ergebnis veränderte, wenn die Platte länger, als in der Prüfvorschrift angegeben (5 min statt 1 min) auf dem Plattenheizer erhitzt wurde. Durch das längere Erhitzen entstanden rosa gefärbte Fronten auf der Platte. Der Hintergrund verfärbte sich zwischen diesen Fronten gelb und wurde dunkler (Abbildung 5-14).

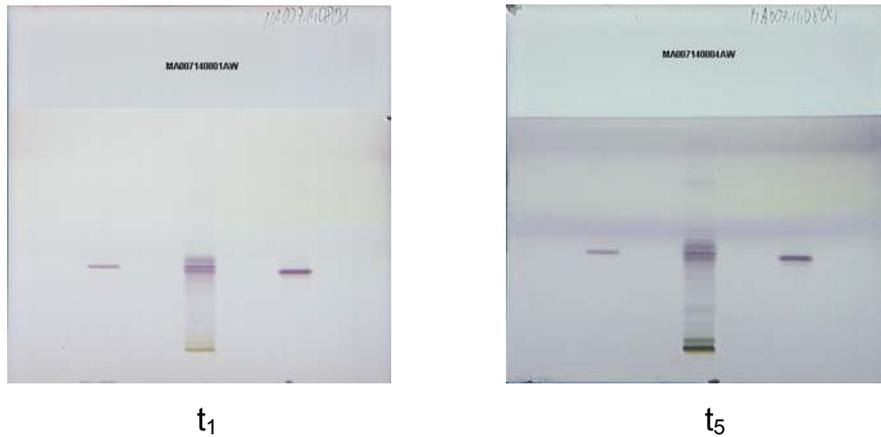


Abbildung 5-14: Vergleich der Chromatogramme nach Derivatisierung auf dem Plattenheizer, Referenzlösung Actein (Bahn 1), authentische Droge (MA007-066) (Bahn 2), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 3).

Die vorgeschriebene Zeit nach der Derivatisierung muss exakt eingehalten werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Zeit zwischen Derivatisierung und Dokumentation

Es wurde überprüft, ob Wartezeiten zwischen der Derivatisierung und der Dokumentation das chromatographische Ergebnis verändern. Eine Platte wurde direkt nach der Derivatisierung dokumentiert, 3 Stunden unter ambienten Bedingungen gelagert und noch einmal dokumentiert. Der visuelle Vergleich der Platten ergab, dass sich die Farbintensität der Zonen verringert hatte (Abbildung 5-15).

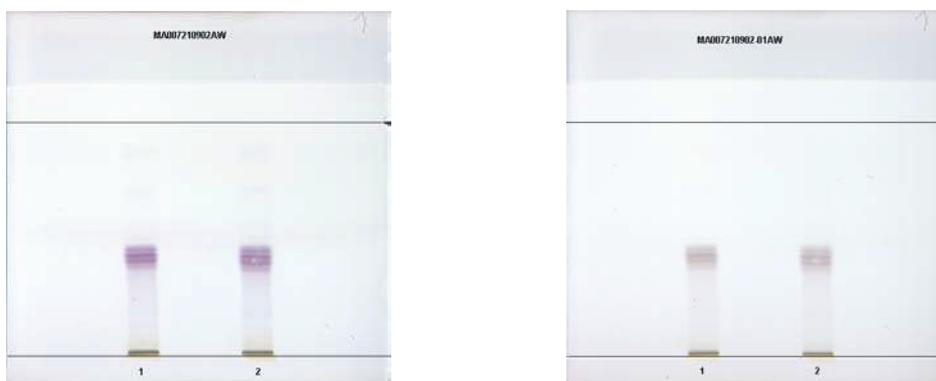


Abbildung 5-15: Vergleich der Chromatogramme nach unterschiedlich langen Wartezeiten zwischen der Derivatisierung und der Dokumentation; Untersuchungssubstanz authentische Droge (MA007-066).

Die Zeit zwischen der Derivatisierung und der Dokumentation ist genau festzulegen, um dünn-schichtchromatographische Ergebnisse mit vergleichbarer Intensität der Zonen im Chromatogramm zu erzielen.

5.1.2.3 Reproduzierbarkeit

Die R_f -Werte von 10 Chromatogrammen wurden über einen Zeitraum von 5 Monaten ausgewertet. In Tabelle 2 sind die Daten zusammengestellt. Die Standardabweichung des R_f -Wertes von Actein war 0,0057, der Variationskoeffizient 1,35 %. Die Standardabweichung des R_f -Wertes von 27-Deoxyactein war 0,0006, der Variationskoeffizient war 1,52 %.

Die Änderung der R_f -Werte war gering (Tabelle 5-2). Das Verfahren ist reproduzierbar.

Tabelle 5-2: Daten zur Reproduzierbarkeit des Verfahrens zur dünn-schichtchromatographischen Bestimmung der Triterpenglykoside in Traubensilberkerzenwurzelstock

Platte	Datum	Temperatur [°C]	Luftfeuchtigkeit [% relative Feuchte]	R_f - Wert Actein	R_f - Wert 27-Deoxyactein
1	13.04.01	25	50	0,43	0,4
2	01.05.01	24	50	0,42	0,4
3	18.05.01	25	50	0,43	0,4
4	23.05.01	25	50	0,42	0,39
5	01.06.01	26	49	0,42	0,38
6	10.06.01	24	50	0,42	0,39
7	02.07.01	25	50	0,41	0,38
8	29.07.01	24	51	0,42	0,38
9	20.08.01	26	48	0,42	0,37
10	15.09.01	25	50	0,41	0,37

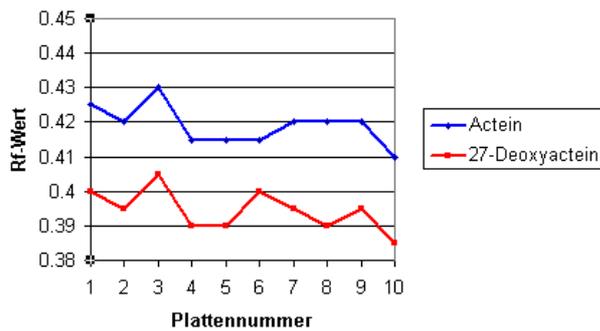


Abbildung 5-16: R_f - Werte der Substanzen Actein und 27-Deoxyactein von 10 Chromatogrammen über einen Zeitraum von 5 Monaten.

5.2 Stabilitätsuntersuchungen

Proben von drei Chargen (MA007-127, MA007-128 und MA007-129) eines Fertigarzneimittels wurden unter den Klimabedingungen 25°C/60 % r. F., 30°C/60 % r. F. und 40°C/75 % r. F. eingelagert und nach 3, 6, 9, 12 und 18 Monaten aus den Klimaschränken entnommen. Anschließend wurden die Proben in einem Tiefkühlschrank gelagert und dann gemäß Verfahren VI analysiert.

Für eine übersichtliche Darstellung der Stabilität wurden die Bahnen jeder einzelnen Charge ausgeschnitten und nebeneinander ausgewertet.

5.2.1 Stabilität über einen Zeitraum von 18 Monaten unter den Klimabedingungen 25°C/60 % relative Feuchte

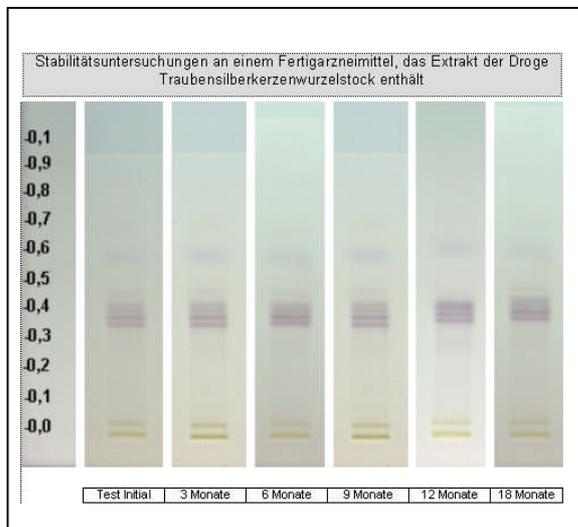


Abbildung 5-17: Stabilität der Probe MA007-127, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 18 Monaten.

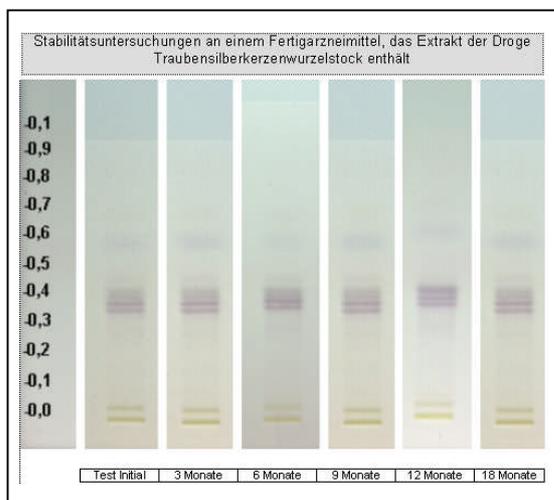


Abbildung 5-18: Stabilität der Probe MA007-128, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 18 Monaten.

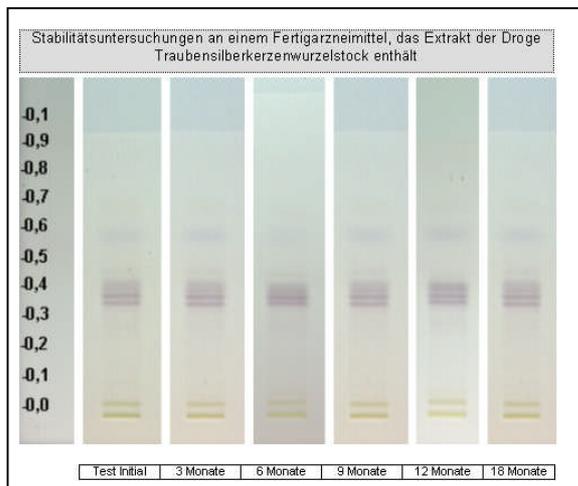


Abbildung 5-19: Stabilität der Probe MA007-129, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 18 Monaten.

5.2.2 Stabilität über einen Zeitraum von 12 Monaten unter den Klimabedingungen 30°C/60 % relative Feuchte

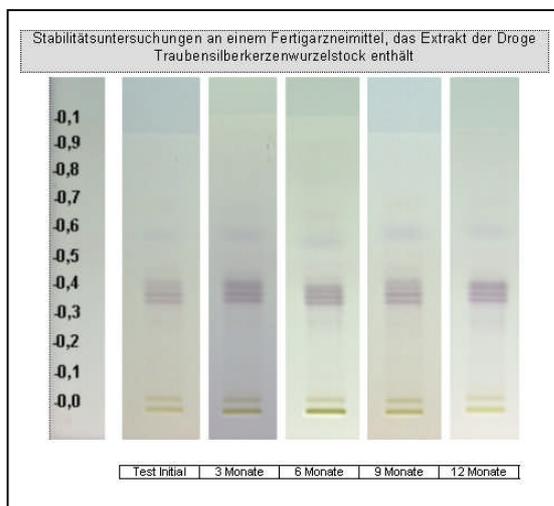


Abbildung 5-20: Stabilität der Probe MA007-127, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.

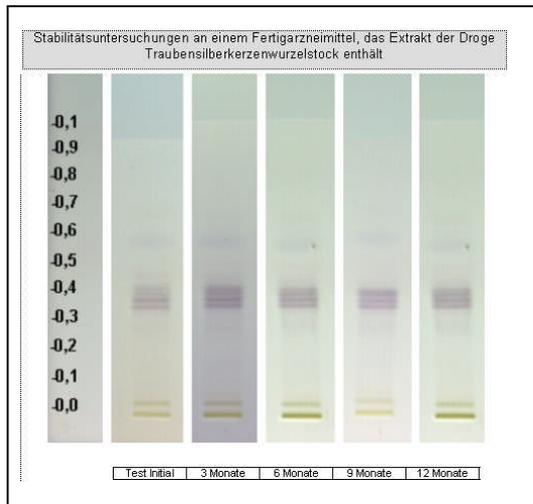


Abbildung 5-21: Stabilität der Probe MA007-128, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.

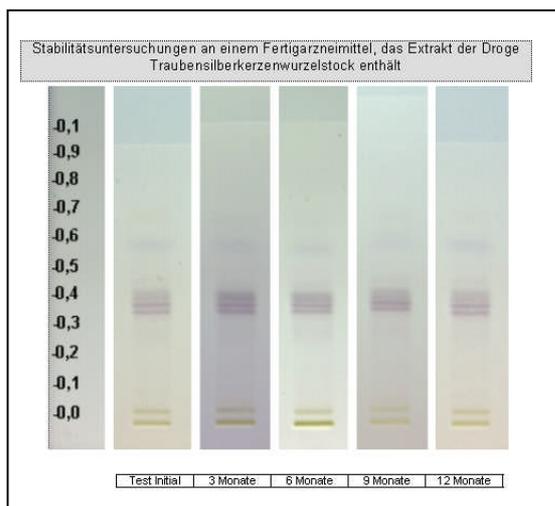


Abbildung 5-22: Stabilität der Probe MA007-129, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.

5.2.3 Stabilität über einen Zeitraum von 6 Monaten unter den Klimabedingungen 40°C/75 % relative Feuchte

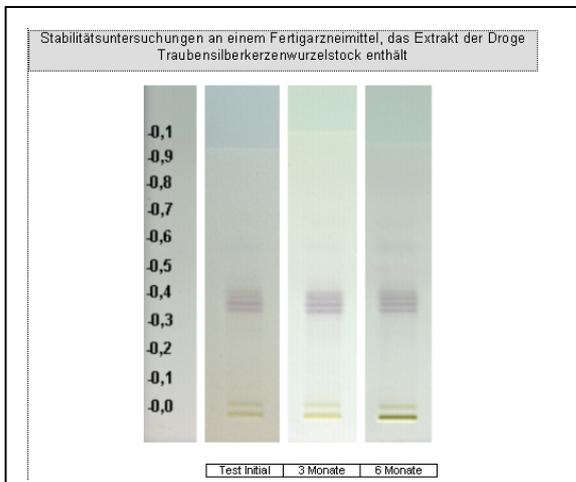


Abbildung 5-23: Stabilität der Probe MA007-127, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten.

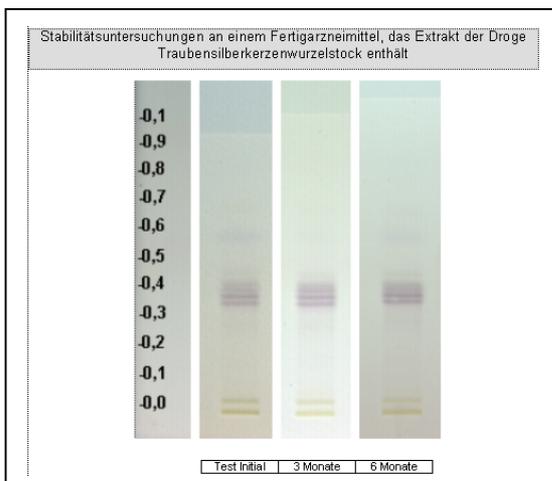


Abbildung 5-24: Stabilität der Probe MA007-128, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten.

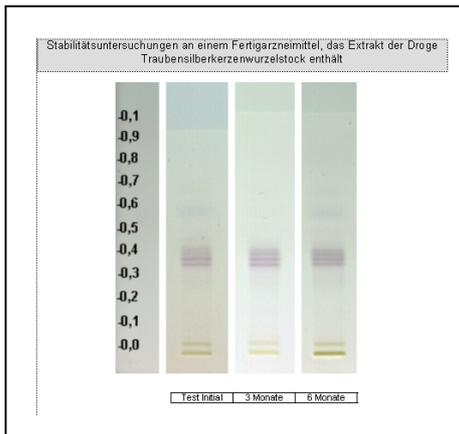


Abbildung 5-25: Stabilität der Probe MA007-129, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten.

Die Stabilität des Fertigarzneimittels war über einen Zeitraum von 18 Monaten unter den Klimabedingungen 25°C und 60 % relative Feuchte gewährleistet. Die Fingerprints jeder der drei untersuchten Chargen waren über diesen Zeitraum mit dem Startchromatogramm in Bezug auf Anzahl, Lage, Farbe, Form und Intensität der Zonen vergleichbar.

Im Weißlicht waren die Zonen der Inhaltsstoffe Actein und 27-Deoxyactein deutlich zu erkennen. Beide Zonen waren rosa gefärbt und lagen im unteren R_f -Bereich bei 0,3 - 0,4. Im unteren R_f -Bereich war außerdem eine gelb-grüne Zone zu erkennen.

Die Stabilität des Fertigarzneimittels war ebenfalls erwiesen durch Vergleich der einzelnen Fingerprints mit dem Startchromatogramm bezüglich Anzahl, Lage, Farbe, Form und Intensität der Zonen nach Einlagerung bei 30°C und 60 % relative Feuchte über einen Zeitraum von 12 Monaten und nach Einlagerung bei 40°C und 75 % relative Feuchte über einen Zeitraum von 6 Monaten (accelerated testing).

Leichte Verfärbungen des Plattenhintergrunds entstanden bei der Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz. Im Rahmen der Validierung wurde belegt, dass bei der Derivatisierung mit Anisaldehyd manchmal diese Verfärbungen des Plattenhintergrundes nicht zu vermeiden sind.

5.3 Hydroxyzimtsäurederivate in Traubensilberkerzenwurzelstock

Die Entwicklung und Optimierung des Verfahrens zum Nachweis der Hydroxyzimtsäurederivate erfolgte parallel zu der Methodenentwicklung und –optimierung des Verfahrens zur Analyse der Triterpenglykoside. Beide Verfahren sind weitgehend gleich; lediglich die Probenvorbereitung (mit Ethanol 50 % statt mit Methanol), die Derivatisierung (Naturstoffreagenz I statt Anisaldehyd-Reagenz) und die Dokumentation (unter UV-Licht bei $\lambda=366$ nm statt im Weißlicht) differieren. Als Referenzsubstanzen wurden Kaffeesäure und Isoferulasäure verwendet.

5.3.1 Nachweis der Isoferulasäure

Der Nachweis wurde dünnschichtchromatographisch geführt. Proben der authentischen Droge (MA007-066), eines isopropanolischen Extrakts (MA007-131) und des entsprechenden Fertigarzneimittels (MA007-126) wurden analysiert. Als Vergleichsubstanzen wurden Kaffeesäure, Fukolsäure, Formononetin, Isoferulasäure, Ferulasäure, Cimicifugasäure A, Cimicifugasäure B, Cimicifugasäure E und Cimicifugasäure F verwendet. Die Chromatographie erfolgte gemäß Verfahren VII.

Die Fingerprints der Droge, des Extrakts und des Fertigarzneimittels zeigten im mittleren R_f -Bereich deutlich zwei blau fluoreszierende Zonen. Die untere der beiden Zonen stimmte in Bezug auf Lage und Intensität der Fluoreszenz mit der Zone der Kaffeesäure überein. Die obere war in Bezug auf die Position mit den Zonen des Formononetin und der Isoferulasäure vergleichbar (Tabelle 5-3). In der Intensität der Fluoreszenz war diese Zone jedoch nur vergleichbar mit der Zone der Isoferulasäure. Die Zone des Formononetin zeigte nur sehr schwache Fluoreszenz (Abbildung 5-26). Der Vergleich der UV-Absorptionsspektren (Abbildung 5-27) ergab eindeutig, dass in der Droge, im Extrakt und in dem Fertigarzneimittel kein Formononetin vorhanden war.



Abbildung 5-26: Authentische Droge MA007-066 (Bahn 1), Kaffeesäure (Bahn 2), Cimicifugasäure E, (Bahn 3), Cimicifugasäure B (Bahn 4), Cimicifugasäure A (Bahn 5), Fukolsäure (Bahn 6), isopropanolischer Extrakt MA007-131 (Bahn 7), Formononetin (Bahn 8), Isoferulasäure (Bahn 9), Ferulasäure (Bahn 10), Cimicifugasäure F (Bahn 11), Fertigarzneimittel MA007-126 (Bahn 12).

Tabelle 5-3: R_f -Werte der Referenzsubstanzen Cimicifugasäure F, Cimicifugasäure E, Cimicifugasäure B, Cimicifugasäure A, Fukolsäure, Formononetin, Isoferulasäure, Ferulasäure, Kaffeesäure.

Analysensubstanz	R_f -Werte
Cimicifugasäure F	0,26
Cimicifugasäure E	0,28
Cimicifugasäure B	0,17
Cimicifugasäure A	0,19
Fukolsäure	0,10
Formononetin	0,52
Isoferulasäure	0,52
Ferulasäure	0,53
Kaffeesäure	0,47

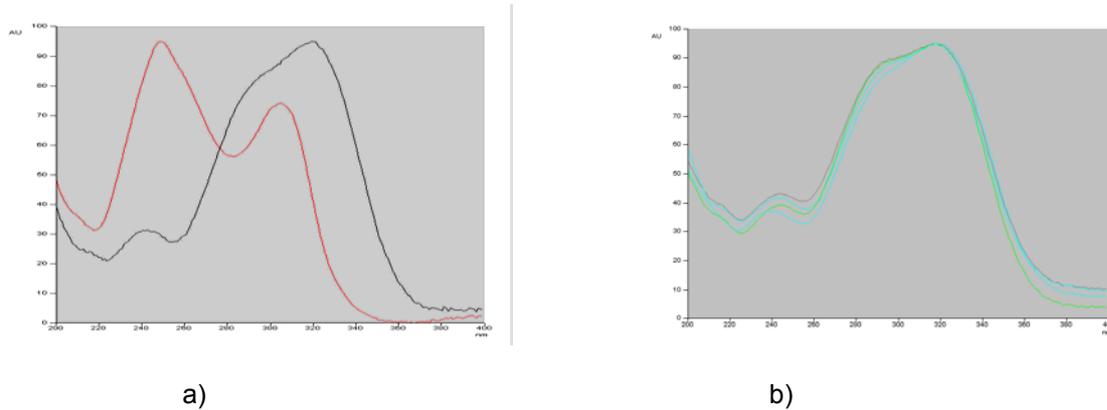


Abbildung 5-27: a) UV-Absorptionsspektren von Isoferulasäure (schwarze Kurve) und Formononetin (rote Kurve), b) UV-Spektren von Isoferulasäure (schwarze Kurve), sowie der auf gleicher Höhe liegenden Zonen in den Fingerprints der Droge, des Extrakts und des Fertigarzneimittels (grüne und blaue Kurven).

Die Droge *Cimicifugae rhizoma* und die daraus hergestellten Zubereitungen enthalten nicht, wie in der Literatur beschrieben, Formononetin.

Das neue Verfahren zum dünn-schichtchromatographischen Nachweis der Hydroxyzimtsäurederivate in der Droge "Traubensilberkerzenwurzelstock" und daraus hergestellten Zubereitungen ist im Anhang unter 10.4 aufgeführt.

5.3.2 Validierung

Das Verfahren VII wurde wie unter 2.17 beschrieben validiert.

5.3.2.1 Selektivität

Die Selektivität des Verfahrens zur Identitätsprüfung der Droge wurde belegt durch vergleichende Fingerprintanalytik der authentischen Droge (MA007-066) mit Drogen anderer Spezies (MA007-065, MA007-067, MA007-068, MA007-113) (Abbildung 5-28).

Die Chromatogramme der Referenzlösungen Kaffeesäure und Isoferulasäure zeigten jeweils im mittleren R_f -Bereich eine blau fluoreszierende Zone. In den Chromatogrammen des Drogenmaterials auf den Bahnen 7 bis 10 und der als *Cimicifuga racemosa* deklarierten Droge auf Bahn 2 waren Zonen zu sehen, die denen der Referenzsubstanzen hinsichtlich Lage und Fluoreszenz entsprachen. Im unteren R_f -Bereich der Droge auf Bahn 7 waren weitere blau fluoreszierende Zonen zu erkennen. Diese Zonen waren auch –teilweise sehr schwach- in den Fingerprints der Drogen auf den Bahnen 2 und 8 bis 10 zu sehen. Da das Inhaltsstoffspektrum von Pflanzenmaterial variieren kann, sollte die Identifizierung anhand der charakteristischen Zonen von Isoferulasäure und Kaffeesäure erfolgen.

In dem Fingerprint der Droge auf Bahn 1 waren im mittleren R_f -Bereich keine Zonen zu erkennen. Im Chromatogramm der Droge auf Bahn 3 waren zwei blau fluoreszierende Zonen im mittleren R_f -Bereich zu erkennen. Im unteren R_f -Bereich fehlten jedoch weitere in gleicher Farbe fluoreszierende Zonen. In den Fingerprints der Drogen auf den Bahnen 3 und 4 waren die Zonen der Kaffeesäure und der Isoferulasäure nur sehr schwach zu erkennen.

Es konnte somit belegt werden, dass die Methode geeignet ist, die Droge Traubensilberkerzenwurzelstock zu identifizieren.

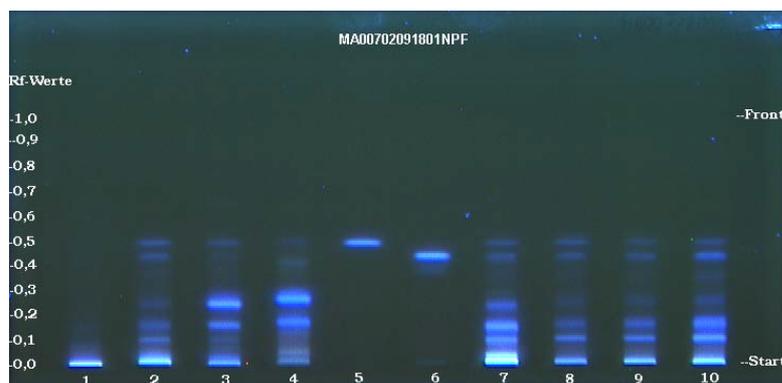


Abbildung 5-28: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock anhand der Hydroxymzimtsäurederivate; MA007-065 (Bahn 1), MA007-067 (Bahn 2), MA007-068 (Bahn 3), MA007-113 (Bahn 4), Referenzlösung Isoferulasäure (Bahn 5), Referenzlösung Kaffeesäure (Bahn 6), MA007-066 (Bahn 7), MA007-123 (Bahn 8), MA007-124 (Bahn 9), MA007-125 (Bahn 10).

Die Fingerprints des Extraktes (MA007-120) und der Ausgangsdroge (MA007-117) wurden mittels vergleichender Fingerprintanalytik untersucht. Neben dem nativen Extrakt (MA007-120) wurden auch zwei Versuchsextrakte (MA007-118, MA007-119), die aus derselben Droge hergestellt wurden, in die Prüfung einbezogen (Abbildung 5-29). Isoferulasäure lag für diese Analyse nicht vor.

Im mittleren R_f -Bereich des Chromatogramms war die blau fluoreszierende Zone der Referenzsubstanz Kaffeesäure ($R_f = 0,47$) zu erkennen. In den Chromatogrammen der Droge (Bahn 1) und der Extrakte (Bahn 2 bis 4) waren im mittleren R_f -Bereich zwei fluoreszierende Zonen zu erkennen. Die untere entsprach der Zone der Kaffeesäure in Bezug auf Lage und Fluoreszenz. Im unteren R_f -Bereich waren in allen Fingerprints weitere blau fluoreszierende Zonen zu sehen.

Die Fingerprints von Droge und Extrakt stimmten überein. Auf den Bahnen 7 und 8 waren keine Zonen zu erkennen. Die Stellmittel störten die Chromatographie nicht.

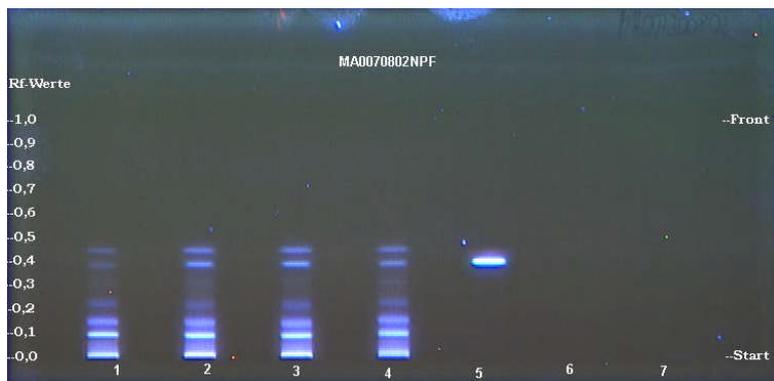


Abbildung 5-29: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung des Extrakts der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock anhand der Hydroxyzimtsäurederivate; MA007-117 (Bahn 1), MA007-118 (Bahn 2), MA007-119 (Bahn 3), MA007-120 (Bahn 4), Referenzlösung Kaffeesäure (Bahn 5), MA007-121 (Bahn 6), MA007-122 (Bahn 7).

Fingerprintanalytik des Fertigarzneimittels

Die Fingerprints des Fertigarzneimittels (MA007-126), des Extrakts (MA007-131) und der Hilfsstoffmischung (MA007-130) wurden miteinander verglichen (Abbildung 5-30). Im Chromatogramm waren auf den Bahnen 1 und 6 bzw. 2 und 7 im mittleren R_f -Bereich die blau fluoreszierenden Zonen der Isoferulasäure ($R_f = 0,52$) und der

Kaffeensäure ($R_f = 0,47$) zu erkennen. In den Fingerprints des Extrakts auf Bahn 3 und des Fertigarzneimittels auf Bahn 4 waren die Zonen der Referenzsubstanzen deutlich zu sehen; sie waren vergleichbar in Bezug auf Lage und Fluoreszenz. Die Fingerprints des Extrakts und des Fertigarzneimittels waren miteinander vergleichbar. Auf Bahn 5 waren keine Zonen zu erkennen. Die Hilfsstoffe störten die Chromatographie nicht.

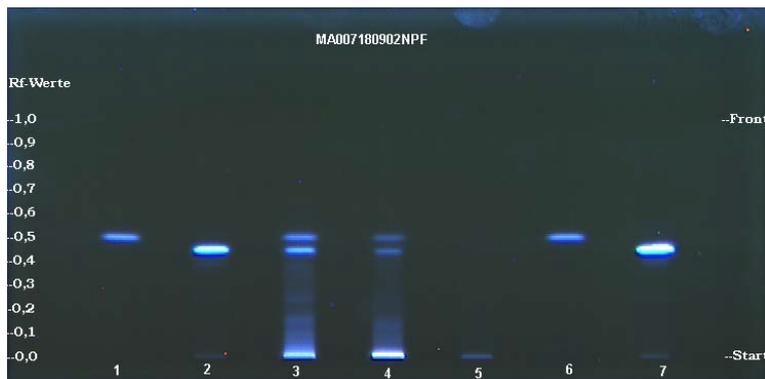


Abbildung 5-30: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung eines Fertigarzneimittels, das Extrakt der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock enthält; Referenzlösung Isoferulasäure(Bahn 1), Referenzlösung Kaffeensäure (Bahn 2), MA007-131 (Bahn 3), MA007-126 (Bahn 4), MA007-130 (Bahn 5), Referenzlösung Isoferulasäure(Bahn 6), Referenzlösung Kaffeensäure (Bahn 7).

Die Methode ist selektiv für die dünnschichtchromatographische Fingerprintanalyse der Hydroxycimtsäurederivate in der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock und daraus hergestelltem Extrakt und Fertigarzneimittel.

5.3.2.2 Robustheit und Reproduzierbarkeit

Die Prüfungen zum Nachweis der Robustheit und der Reproduzierbarkeit der Methode wurden analog den unter 5.1.2.2 und 5.1.2.3 erläuterten Prüfungen durchgeführt.

Robustheit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens VII konnten belegt werden.

6 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Arzneidroge “Brennnesselblätter“ und daraus hergestellten Zubereitungen

Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Methode des Monographievorschlages der Pharmeuropa 14.1 (Pharmeuropa 14.1 2002). Es wurden verschiedenen Chargen von *Urtica urens* (MA015-12, MA015-13), *Urticae folium* (MA015-05, MA015-06, MA015-07, MA015-08, MA015-09) und *Lamium album* (MA015-21) analysiert. Dabei zeigte sich, dass Scopoletin in den Fingerprints von *U. urens* nur sehr schwach oder nicht zu erkennen ist. Nach der Derivatisierung mit Vanillin-Phosphorsäurereagenz erschien in den Chromatogrammen der Untersuchungslösungen auf der Höhe des R_f -Werts von Scopoletin je eine violette Zone, die durch Ko-Migration die eindeutige Identifizierung des Scopoletins in Frage stellte (Abbildung 6-1). Vor der Derivatisierung waren unter UV-Licht bei $\lambda=366$ nm nahe den Startbanden weitere blaue Zonen zu erkennen. Diese könnten die Zonen der Substanzen Chlorogensäure und Kaffeoyläpfelsäure sein. Daher wurde versucht, die chromatographischen Bedingungen so zu optimieren, dass eindeutigere Aussagen über die Identität beider *Urtica*-Arten ermöglicht wurden.

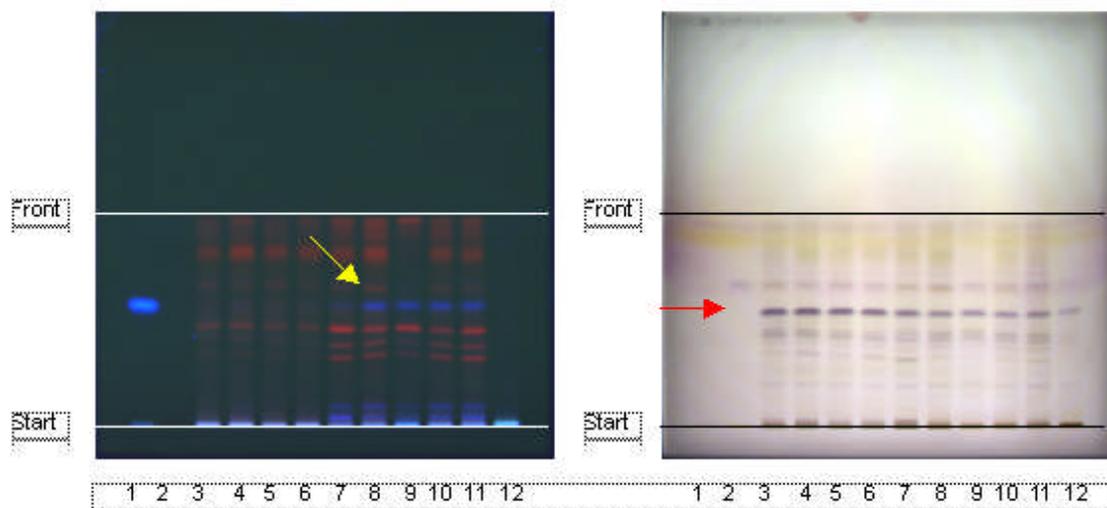


Abbildung 6-1: Dünnschichtchromatographie gemäß Monographievorschlag “Brennnesselblätter“ der Pharmeuropa 14.1. (Bahn 1: Scopoletin, Bahn 2: β -Sitosterol, Bahn 3-6: *Urtica urens* unterschiedliche Chargen, Bahn 7-11: *Urticae folium* unterschiedliche Chargen, Bahn 12: *Lamium album*).

6.1 Entwicklung und Optimierung

Für die Methodenentwicklung wurden die Referenzsubstanzen Chlorogensäure, Kaffeoyläpfelsäure, Scopoletin, Hyperosid und Rutosid verwendet.

Die Substanz Kaffeoyläpfelsäure wurde aus frischem Brennnesselkraut wie unter 2.19 beschrieben isoliert. Die Identifizierung der Substanz erfolgte spektrometrisch. Die Ergebnisse der NMR-Analysen sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst worden. Die Spektren wurden im Anhang unter 10.5 abgebildet. In Tabelle 6-2 sind die Ergebnisse der MS- Untersuchungen aufgeführt. Diese Spektren sowie auch das IR-Spektrum sind ebenfalls im Anhang unter 10.5 abgebildet. Mittels IR-Spektrometrie konnten die funktionellen Gruppen der Kaffeoyläpfelsäure erfasst werden.

Tabelle 6-1: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten der Kaffeoyläpfelsäure:

C	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	$J_{\text{H,H}}$ [Hz]
1	177,46	--	--
2	74,43	5,37	dd 4Hz und 9,5 Hz
3	40,65	2,89	M
4	177,65	--	--
1'	127,93	--	--
2'	116,75	7,11	dd 2,2 Hz
3'	149,44	--	--
4'	146,75	--	--
5'	115,24	6,83	d 8,2 Hz
6'	122,89	7,00	dd 8,1 Hz und 2,2 Hz
7'	131,10	7,61	d 16,1 Hz
8'	115,59	6,37	d 16,1 Hz
9'	169,02	--	--

Tabelle 6-2: FAB-MS Daten der Kaffeoyläpfelsäure:

(-) FAB-MS:

M/z	%	Zuordnung
133	14	$[M-H]^-$ Äpfelsäure
179	31	$[M-H]^-$ Kaffeesäure
295	100	$[M-H]^-$ Kaffeoyläpfelsäure
409	73	$[M-H]^-$ und TFA
591	28	2 $[M-H]^-$ Kaffeoyläpfelsäure

(+) FAB-MS:

M/z	%	Zuordnung
163	14	$[M-H_2O+H]^+$ Kaffeesäure
297	6	$[M+H]^+$

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde festgelegt, die Chromatographie in der gesättigten Doppeltrogkammer zu entwickeln. Die Probenauftragung erfolgte mit dem Gerät ATS4.

6.1.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung (Probe MA015-06) erfolgte zunächst mit den Lösungsmitteln Wasser, Ethanol 70 % und Isopropanol (Abbildung 6-2). Die Extraktion mit Ethanol ergab eine Probenlösung, in der die charakteristischen Substanzen Kaffeoyläpfelsäure und Scopoletin der Brennnesselblätter nachzuweisen waren.

6.1.2 Fließmittel

Die Zusammensetzung des Fließmittels FM 8 (Schomakers et al. 1995) wurde so geändert, dass die Zonen Scopoletin und Kaffeoyläpfelsäure als scharfe Zonen voneinander getrennt waren.

In Abbildung 6-3 ist der Fließmittelvergleich dargestellt. Das Fließmittel FM 11 der Methode des Monographievorschlags der Ph. Eur. (Pharmeuropa 14.1 2002) wurde nochmals mituntersucht. Die Chromatogrammentwicklung mit FM 9 ergab das beste

dünnschichtchromatographische Ergebnis. Die Zonen im Fingerprint waren voneinander getrennt zu erkennen. Kaffeoyläpfelsäure und Scopoletin waren deutlich zu erkennen.

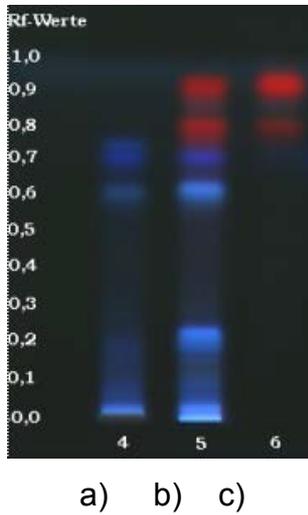


Abbildung 6-2: Fingerprintvergleich der Proben, die mit Wasser (a), Ethanol 70 % (b) und Isopropanol (c) extrahiert wurden.

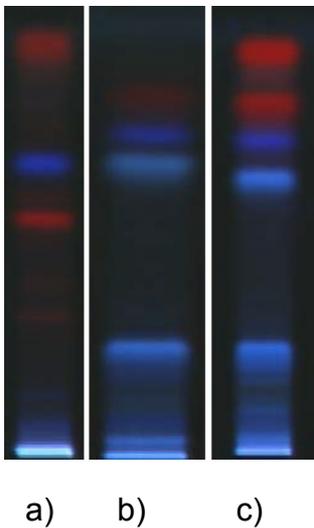
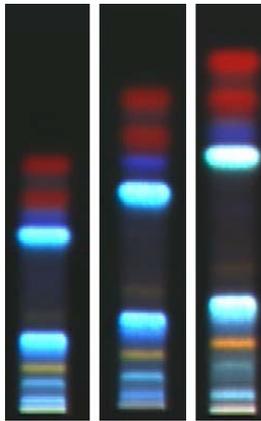


Abbildung 6-3: Fließmittelvergleich a) FM 11, b) FM 8, c) FM 9.

6.1.3 Trennstrecke

Die Optimierung der Trennstrecke ergab, dass bei der Entwicklung über eine Distanz von 6 cm die schärfsten Zonen im Chromatogramm zu erkennen und die Zonen deutlich voneinander getrennt waren (Abbildung 6-4).



5 cm 6 cm 7 cm

Abbildung 6-4: Fingerprintvergleich nach Entwicklung über differierende Trennstrecken.

Das neue Verfahren zum dünnschichtchromatographischen Nachweis der Inhaltsstoffe Scopoletin, Kaffeoyläpfelsäure, Chlorogensäure und Rutosid in Brennnesselblättern und daraus hergestellten Zubereitungen ist im Anhang unter 10.4 aufgeführt.

6.2 Validierung

6.2.1 Drogenausgangsmaterialien

Es wurden Drogen unterschiedlicher Herkunftsländer (Abbildung 6-5) geprüft (Proben: MA015-01 aus Bulgarien, MA015-02 aus Polen, MA015-03 aus Ungarn, MA015-04 aus Albanien, MA015-05 und MA015-06 aus Deutschland). Die Droge aus Bulgarien zeigte im Vergleich zu den Drogen aus den anderen Ländern ein abweichendes Inhaltsstoffmuster. Im unteren und mittleren R_f -Bereich waren nur sehr wenige Zonen zu sehen. Die charakteristischen Zonen von Chlorogensäure, Kaffeoyläpfelsäure und Scopoletin waren nur sehr schwach zu erkennen. Die Fingerprints der Drogen aus Albanien, Ungarn, Deutschland und Polen waren hinsichtlich Lage, Anzahl, Farbe und Fluoreszenz der Zonen von Chlorogensäure, Kaffeoyläpfelsäure, Rutosid und Scopoletin vergleichbar.

Auf Grund des abweichenden Inhaltsstoffmusters sollte das Drogenmaterial aus Bulgarien als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Extrakten nicht verwendet werden.

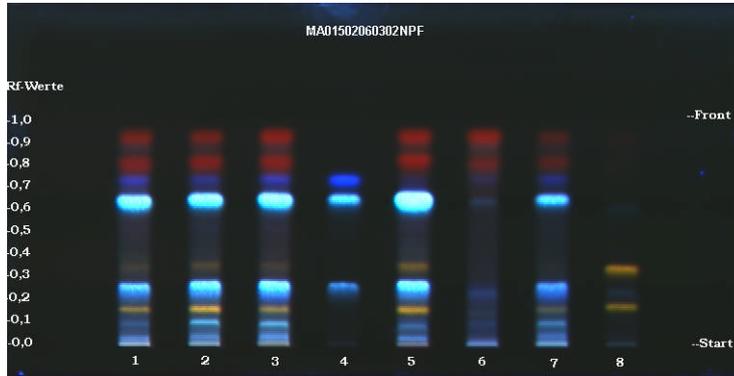


Abbildung 6-5: Drogenmaterial unterschiedlicher Herkunft; Albanien (Bahn 1); Ungarn (Bahn 2); Deutschland (Bahn 3 und 5), unterschiedliche Chargen; Bulgarien (Bahn 6); Polen (Bahn 7); Chlorogensäure, Kaffeoylepfelsäure, Scopoletin (aufsteigende R_f -Werte) (Bahn 4); Rutosid, Hyperosid (aufsteigende R_f -Werte) (Bahn 8).

6.2.2 Selektivität

Die Fingerprintanalytik ermöglichte, eine Verfälschung respektive Verwechslung der Droge *Urticae dioica* mit *Lamium album* eindeutig zu erkennen. Im unteren bis mittleren R_f -Bereich waren im Fingerprint von *Lamium album* stark blau fluoreszierende Zonen und eine dominante gelbe Zone zu sehen. In dem R_f -Bereich von Kaffeoylepfelsäure und Scopoletin waren im Fingerprint von *L. album* keine Zonen vorhanden (Abbildung 6-6).



Abbildung 6-6: Fingerprintvergleich *L. album* (MA015-21) (Bahn 1) und *U. dioica* (MA015-10, MA015-10a, MA015-10b, MA015-11) (Bahn 3-6), Bahn 2: Chlorogensäure, Kaffeoylepfelsäure, Scopoletin (aufsteigende R_f -Werte).

Fingerprintanalyse von Droge, Extrakt und Fertigarzneimittel

Es wurden zwei Drogen und der jeweils daraus hergestellte Extrakt bzw. das Fertigarzneimittel untersucht. Ein Extrakt war ethanolisch, der andere isopropanolisch (Abbildung 6-7).

Für die Analyse der Droge (MA015-09), des ethanolischen Extrakts (MA015-15) und des Fertigarzneimittels, das diesen Extrakt als aktive Substanz enthält (MA015-19) war das Verfahren selektiv. Die drei Fingerprints waren vergleichbar miteinander in Bezug auf die Anzahl, die Position, die Farbe und die Fluoreszenz der Zonen.

Für die Analyse der Droge (MA015-08), des isopropanolischen Extrakts (MA015-16) und des Fertigarzneimittels, das diesen Extrakt als aktive Substanz enthält (MA015-20) war das Verfahren nicht selektiv. In den Fingerprints des Extrakts und des Fertigarzneimittels fehlten fast alle Zonen, die in dem Fingerprint der Droge zu sehen waren. Für die dünnschichtchromatographische Analyse des isopropanolischen Extrakts müsste ein weiteres dünnschichtchromatographisches Verfahren entwickelt werden.

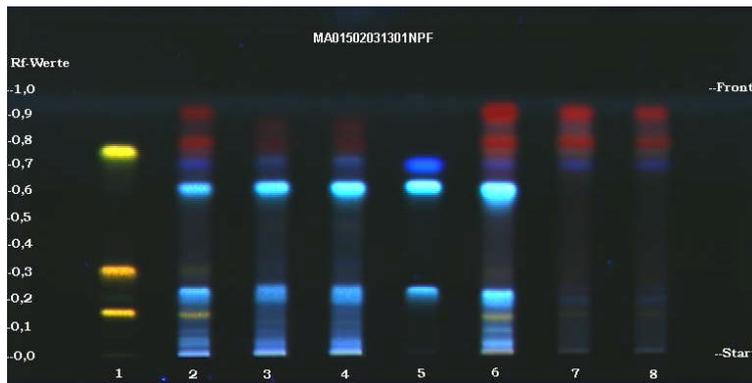


Abbildung 6-7: Selektivität eines ethanolischen und eine isopropanolischen Extrakts; Referenzlösungen Rutosid, Hyperosid, Quercetin (nach aufsteigenden R_f -Werten) (Bahn 1), Droge (MA015-09) (Bahn 2), Extrakt ethanolisch (MA015-15) (Bahn 3), Fertigarzneimittel (MA015-19) (Bahn 4), Referenzlösungen Chlorogensäure, Kaffeyläpfelsäure, Scopoletin (nach aufsteigenden R_f -Werten) (Bahn 5), Droge (MA015-8) (Bahn 6), Extrakt isopropanolisch (MA015-16) (Bahn 7), Fertigarzneimittel (MA015-20) (Bahn 8).

Das Verfahren ist selektiv für die Droge Brennnesselblätter und daraus hergestellte ethanolische Extrakte und Fertigarzneimittel.

6.2.3 Chargenkonformität der Droge

Vier unterschiedliche Chargen der Droge *Urticae folium* wurden verglichen. Die Fingerprints der Chargen waren vergleichbar in Bezug auf Anzahl, Lage, Farbe und Fluoreszenz der Zonen (Abbildung 6-8).

Nach der Derivatisierung mit Naturstoffreagenz erkannte man unter UV-Licht bei $\lambda=366$ nm die Referenzsubstanzen Scopoletin, Kaffeyläpfelsäure und Chlorogensäure als hellblau fluoreszierende Zonen. Hyperosid und Rutosid waren als gelbe Zonen im unteren bis mittleren R_f -Bereich zu sehen. Die Untersuchungslösungen zeigten Zonen, die mit denen von Scopoletin, Kaffeyläpfelsäure und Chlorogensäure hinsichtlich Lage, Farbe und Fluoreszenz vergleichbar waren. Im unteren R_f -Bereich waren weitere blau fluoreszierende Zonen zu sehen. Außerdem war im unteren R_f -Bereich eine gelbe Zone zu sehen, die in Lage und Farbe der Zone des Rutosids entsprach. Unterhalb der Zone des Hyperosids war in den

Fingerprints der Untersuchungslösungen eine schwachgelbe Zone zu erkennen. Im oberen R_f -Bereich waren rote Zonen (Chlorophyll) zu sehen.



Abbildung 6-8: Vergleich von vier Chargen *Urticae folium*. Bahn 1: Rutosid, Hyperosid (aufsteigende R_f -Werte), Bahn 2-5: Proben *Urticae folium* unterschiedlicher Chargen, Bahn 6: Chlorogensäure, Kaffeoylepfelsäure, Scopoletin (aufsteigende R_f -Werte).

6.2.4 Robustheitsprüfungen

6.2.4.1 Stabilität des Analyten

Die Stabilität der Probenlösung und der Kaffeoylepfelsäurelösung während der Chromatographie wurde mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie untersucht (Abbildung 6-9). Die Kaffeoylepfelsäure war im chromatographischen System stabil. Die Zonen der einzelnen Substanzen lagen auf der Diagonalen zwischen dem Auftragepunkt der Probenlösung und dem Schnittpunkt der Fließmittelfronten. Die Extraktlösung war nicht stabil. Auf der Höhe der Chlorogensäure war eine schwachblaue Zone neben der Geraden zu erkennen. Diese Zone stammte vermutlich von einem Umlagerungsprodukt, eventuell eine Isomerisierung der Chlorogensäure. Daraus resultierte jedoch keine zusätzliche Zone im Fingerprint. Es wurde lediglich deutlich, dass die Zone der Chlorogensäure etwas diffus war. Daher wurden die Chromatogrammbedingungen nicht geändert.

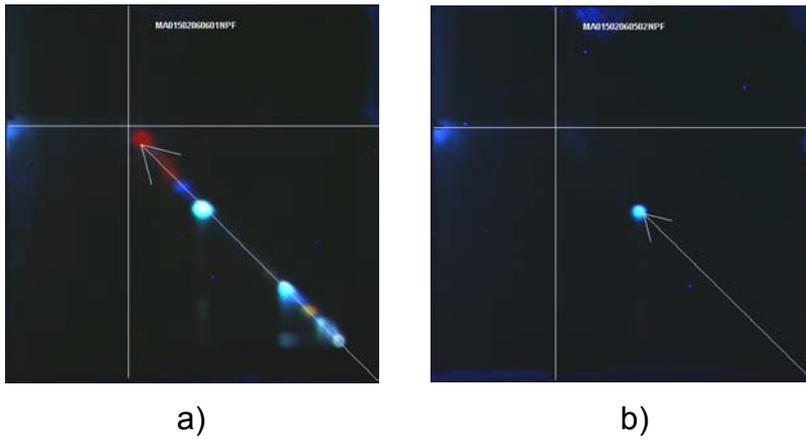


Abbildung 6-9: Stabilität während der Chromatographie a) Probenlösung der Droge (MA015-06) b) Kaffeoyläpfelsäure in Methanol.

6.2.4.2 Stabilität des Fließmittels

Die Fließmittelstabilität wurde über einen Zeitraum von 18 Stunden belegt. Die Auswertung erfolgte durch vergleichende Fingerprintanalytik (Abbildung 6-10). Die Fingerprints waren miteinander vergleichbar in Bezug auf Anzahl, Lage, Farbe und Fluoreszenz der Zonen.

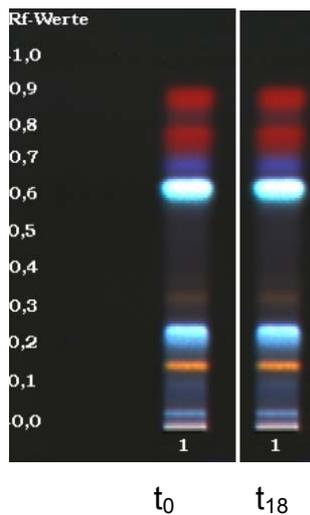


Abbildung 6-10: Fließmittelstabilität über 18 Stunden (MA015-06).

6.2.4.3 Stabilität der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz veränderte sich nach der Derivatisierung in Abhängigkeit von der Zeit. Es zeigte sich, dass sich die Fluoreszenz schon innerhalb kurzer Zeit verändert (Abbildung 6-11). Die Zone im unteren R_f -Bereich ist zunächst gelb und schon nach 10 min ist die Farbe eher mit orange-rot zu beschreiben.

Die Farben bzw. die Intensitäten der Zonen im Fingerprint ändern sich nicht gravierend, aber schon diese geringen Veränderungen können Probleme geben beim Nachweis der Stabilität über einen längeren Zeitraum.

Für das Verfahren IX wurde festgelegt, dass die Dokumentation direkt nach der Derivatisierung erfolgt.

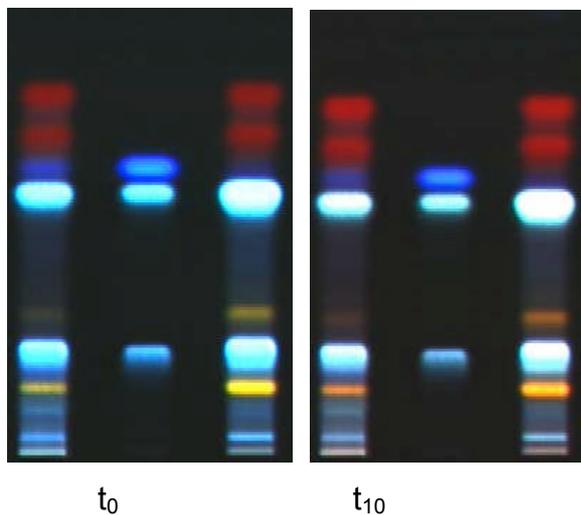


Abbildung 6-11: Veränderung der Fluoreszenz innerhalb von 10 Minuten nach der Derivatisierung (MA015-06, MA015-07).

6.3 Differenzierung der offizinellen Arten *Urtica dioica* und *Urtica urens*

Mit Hilfe der validierten Methode wurden die beiden offizinellen Arten *U. dioica* und *U. urens* untersucht. Durch vergleichende Fingerprintanalytik war eine eindeutige Differenzierung möglich. In dem Fingerprint von *U. urens* fehlten im oberen R_f -Bereich die Zonen von Scopoletin und Kaffeoyläpfelsäure. Im unteren R_f -Bereich fehlten eine gelbe und mehrere blaue Zonen (Abbildung 6-12). Der Analogkurvenvergleich bestätigte das Fehlen der Zonen im oberen und unteren R_f -Bereich des Fingerprints von *U. urens* (Abbildung 6-13).

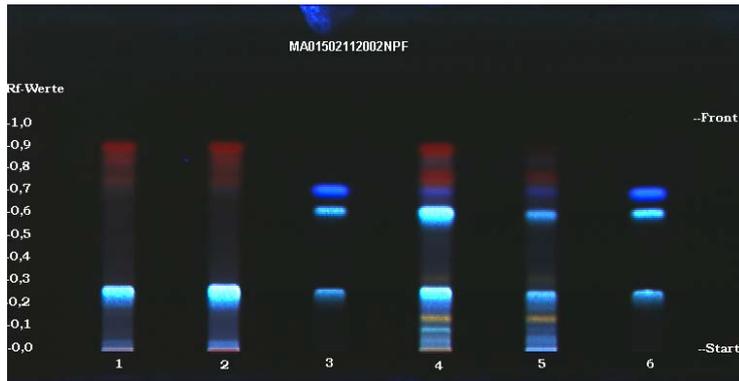


Abbildung 6-12: Fingerprintvergleich *U. urens* (Bahn 1 und 2, MA015-12, MA015-13) und *U. dioica* (Bahn 4 und 5, MA015-10, MA015-11), Bahn 3 und 6: Chlorogensäure, Kaffeoylepfelsäure, Scopoletin (aufsteigende R_f -Werte).

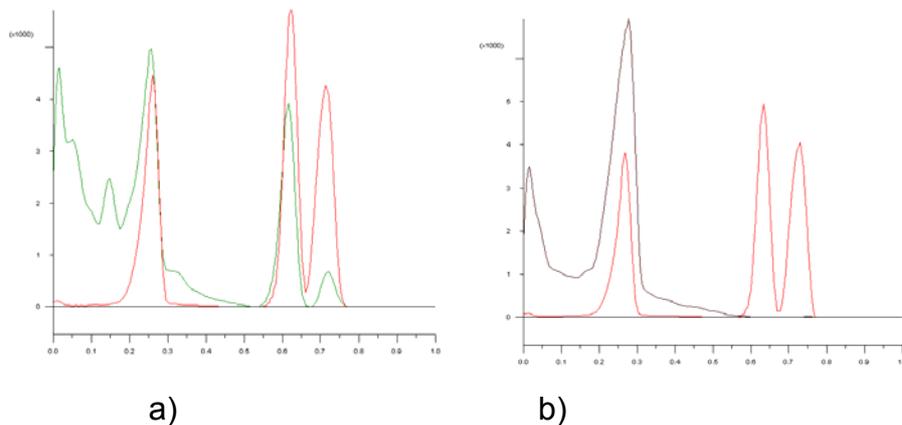


Abbildung 6-13: Analogkurvenvergleich der Chromatogramme von *U. dioica* (grüne Kurve in Abbildung a) und *U. urens* (braune Kurve in Abbildung b), mit den Referenzsubstanzen, Chlorogensäure, Kaffeoylepfelsäure und Scopoletin (jeweils rote Kurve).

Aufgrund des uneinheitlichen Inhaltsstoffmusters der beiden officinellen *Urtica* – Arten ist es in Frage zu stellen, ob die Qualität der Droge sichergestellt werden kann, wenn beide Arten in dem Monographievorschlag der Pharmeuropa 15.3 (2003) zugelassen sind. Andererseits wird heute *Urtica dioica* kultiviert und daher als Droгенаusgangsmaterial fast ausschließlich verwendet. Da *Urtica urens* traditionell arzneilich gar nicht verwendet wird, gab es auch bislang noch keine Versuche, diese Pflanze anzubauen.

7 Diskussion

Dünnschichtchromatographie ist ein analytisches Verfahren, das schon seit Jahren im Rahmen der Phytoanalytik angewendet wird. Bereits in den sechziger Jahren des vorigen Jahrhunderts publizierten Kirchner et al. (Kirchner et al. 1951) und Stahl (Stahl 1962) dünnschichtchromatographische Methoden zur Analyse von Phytopharmaka. Sie trugen damit entscheidend zu einer wachsenden Akzeptanz des Verfahrens Dünnschichtchromatographie bei. Für die Identitätsprüfung von arzneilich verwendeten Drogen wurden in der Folge sehr viele Methoden entwickelt, die teilweise noch heute Bestandteil der Monographien einzelner Arzneibücher sind. Diese Methoden sind, bis auf wenige Ausnahmen, heute jedoch nicht mehr auf dem modernsten Stand von Wissenschaft und Technik. Eine kritische Betrachtung der Arzneibuchmethoden zeigte, dass die moderne HPTLC in den dünnschichtchromatographischen Methoden weitgehend ignoriert wurden (Reich et al. 2003b).

Da in den letzten Jahren die Anforderungen an die Qualität von Phytopharmaka immer größer wurden, wuchs somit auch der Bedarf an analytischen Verfahren zur Qualitätsanalytik dieser komplexen Arzneimittel. Verfahren waren notwendig, die es ermöglichten, Extrakte in ihrer Gesamtheit zu analysieren.

Dünnschichtchromatographie ist ein Verfahren, dass diesen Anforderungen gerecht werden kann. Durch die Anwendung von Fingerprintanalytik ist es möglich, den gesamten Extrakt in Gegenwart von Matrixbestandteilen zu analysieren und zu visualisieren.

Die Dünnschichtchromatographie wird häufig als eine veraltete Methode angesehen, die gerne durch die moderne Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) ersetzt wird. Dies ist jedoch heute unberechtigt, da für das Verfahren Dünnschichtchromatographie modernste Technik zur Verfügung steht. Zudem ist das wissenschaftliche Interesse an dieser Methode groß. Die moderne Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) ist eine Methode, die sich durch hohe Flexibilität auszeichnet. Die Anwendung der HPTLC ist im Gegensatz zur HPLC weniger zeit- und kostenintensiv.

Die Anzahl der Publikationen, die sich mit neuen dünnschichtchromatographischen Methoden, deren Optimierung und Validierung beschäftigen ist vielfältig (z. B. Galand

et al. 2002, Szepesi und Nyiredy 1992, Carr und Wahlich 1990, Rampazzo 1990). In den Leitlinien zur Qualitätsanalytik von Phytopharmaka ist Dünnschichtchromatographie teilweise explizit erwähnt (1.1). Für die Entwicklung moderner dünnschichtchromatographischer Methoden ist es notwendig, eine standardisierte Methodik anzuwenden. In der vorliegenden Dissertation und in dem Buchkapitel von Reich und Blatter werden die einzelnen Parameter der standardisierten Dünnschichtchromatographie detailliert beschrieben (Reich und Blatter 2003a).

7.1 Methodenentwicklung und -optimierung

Am Anfang jeder Methodenentwicklung und -optimierung steht die Festlegung des analytischen Ziels: soll die Methode angewendet werden, um einzelne Substanzen in einem Extrakt zu identifizieren, soll ein charakteristischer Fingerprint entwickelt werden, um Verunreinigungen und Verfälschungen zu erkennen, soll die Methode für Stabilitätsuntersuchungen, in der Routineanalytik oder in der Forschung (zum Beispiel Isolierung von Substanzen) angewendet werden. Die Einsatzmöglichkeiten der Dünnschichtchromatographie in der Phytoanalytik sind groß. Die Flexibilität des Verfahrens, die Möglichkeit viele Proben parallel auf einer Platte zu analysieren, die geringen Kosten und die Variabilität der Detektion machen die Dünnschichtchromatographie zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der Forschung und Analytik der Phytopharmaka (Nyiredy 2001, Szepesi und Nyiredy 1992).

Für einige Arzneidrogen (zum Beispiel Boswelia) sind in der Literatur kaum dünnschichtchromatographische Methoden zu finden. Bei der Analyse bekannter Drogen ist es häufig so, dass die offizinellen Methoden oder andere etablierte dünnschichtchromatographische Methoden nicht geeignet sind, spezielle analytische Probleme zu lösen. In diesen Fällen ist es notwendig eine neue HPTLC-Methode zu entwickeln oder eine bestehende zu optimieren und an standardisierte Bedingungen anzugleichen.

Der entscheidende Schritt der Methodenentwicklung ist die Auswahl und die Optimierung der mobilen Phase. Bei der Wahl der Lösungsmittel sind Fließmittelstärke und -selektivität zu berücksichtigen.

Die meisten Optimierungsschemata der mobilen Phase basieren immer noch auf der Einteilung der Lösungsmittel in acht Selektivitätsklassen nach Snyder. Für die

Methodenentwicklung in der DC haben sich das "Prisma-Modell" und das "Vier-Lösungsmittel-Modell" etabliert (Nyiredy et al. 1985, Nyiredy et al. 1988, Geiss 1987). Das von Nyiredy entwickelte Prisma-Modell kann sowohl für die DC als auch für die HPLC angewendet werden (Nyiredy 2002).

Das "CAMAG - Optimierungsschema" basiert auf einem strukturierten "trial and error" Verfahren (1.3.3). Das Schema wurde unter Berücksichtigung der Parameter Fließmittelstärke und -selektivität konzipiert. Berechnungen dieser Parameter werden jedoch nicht durchgeführt. Die Selektivität und die Stärke der mobilen Phase werden so gewählt, dass die Trennung kritischer Substanzen in dem R_f -Bereich von 0,2 – 0,5 optimiert wird. Für Fingerprintchromatogramme von Phytopharmaka gilt entsprechendes für einen R_f -Bereich von 0,1 – 0,8.

Mit Hilfe des Optimierungsschemas ist es meistens möglich mehrere Lösungsansätze für analytische Probleme zu finden. Es sollte jedoch immer das analytische Ziel berücksichtigt werden und der praktische Aspekt, dass die Methodenentwicklung nicht zu zeitaufwendig sein sollte. Die chromatographische Trennung sollte so gut wie nötig sein, aber nicht so gut wie möglich (Reich und Blatter 2003a).

Für die Droge Traubensilberkerzenwurzelstock wurde in der vorliegenden Arbeit beispielhaft eine Methode zur dünnenschichtchromatographischen Bestimmung der Triterpenglykoside Actein und 27-Deoxyactein entwickelt. Die Fließmitteloptimierung im Rahmen der Entwicklung wurde gemäß dem "CAMAG - Optimierungsschema" (2.7) durchgeführt.

Gemäß diesem Optimierungsschema wurden Lösungsmittel aller Selektivitätsklassen verwendet. Es war jedoch nicht zwingend notwendig, sich an die vorgegebenen Lösungsmittel zu halten. Es sollte nur gewährleistet sein, dass alle Selektivitätsklassen vertreten waren. Bei der Anwendung des Schemas auf die Trennung der Substanzen Actein und 27-Deoxyactein wurde Ethylacetat gegen Ethylformiat ausgetauscht. An diesem Beispiel konnte exemplarisch gezeigt werden, dass dieses Optimierungsschema bei strukturierter Vorgehensweise wenig zeitaufwendig und unkompliziert ist. Die Platten wurden direkt nach der Derivatisierung visuell ausgewertet, so konnte zügig gearbeitet werden und die Fließmitteloptimierung war innerhalb eines Tages abgeschlossen.

Informationen über die chemische Zusammensetzung einer Probe sind entscheidend für die Auswahl der stationären Phase und die Probenaufarbeitung (Poole und Dias 2000). In der Phytoanalytik werden die meisten dünnschichtchromatographischen Analysen auf Kieselgelplatten durchgeführt, da auf diesen Platten fast alle Substanzen, die in pflanzlichen Extrakten vorkommen, detektierbar sind (Reich und Blatter 2003a). Ziel der Fingerprintanalytik ist es, so viele unterschiedliche Substanzen wie möglich zu trennen und zu analysieren, um ein ganzheitliches Profil des Extrakts zu erhalten. Für die Analyse spezieller Substanzgruppen wie zum Beispiel Zucker, Aminosäuren oder Steroide können Platten mit modifizierten Kieselgelschichten verwendet werden (Kraus et al. 1995).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Drogen und Extrakte konnten alle auf HPTLC Kieselgelplatten analysiert werden. Versuche Trennprobleme auf Platten mit Umkehrphasen zu lösen, ergaben keine Vorteile für die chromatographische Trennung.

Im Rahmen der Probenaufarbeitung ist es oft ausreichend, eine einfache Extraktion mit einem Lösungsmittel wie Methanol oder Ethanol durchzuführen. Generell eignen sich alle Lösungsmittel, deren eluierende Wirkung in der betreffenden stationären Phase gering ist. Die Polarität des Lösungsmittels beeinflusst die Größe der Auftragsfläche am Start und kann zu Veränderungen des Kieselgels führen. Deshalb sollten Lösungsmittel verwendet werden, die relativ rasch von der Schicht abdampfen wie z.B. Methanol. In der vorliegenden Arbeit wurden Bärentraubenblätter mit einem Methanol-Wasser Gemisch extrahiert. Diese Probenvorbereitung erwies sich als geeignet, um eine dünnschichtchromatographische Analyse der Droge und der daraus hergestellten Zubereitungen anhand der Substanzen Arbutin, Gallussäure und Hydrochinon durchzuführen. Durch die strichförmige Auftragung der Proben, konnte die Diffusion der Zonen, trotz des polaren Lösungsmittels, so gering gehalten werden, dass sie die chromatographische Trennung nicht negativ beeinflusste.

Für die Analyse der Brennnesselblätter erwies sich ebenfalls eine einfache Extraktion mit Ethanol 70 % als Vorbereitung für die dünnschichtchromatographische Analyse als ausreichend. Die aufwendigere Probenvorbereitung durch Erhitzen der Droge unter Rückfluss, die gemäß dem Monographievorschlag der Pharmeuropa 14.1

(Pharmeuropa 2002) für die Droge Brennnesselblätter vorgeschrieben wird, zeigte keine Vorteile im Bezug auf die Analyse einzelner Substanzen oder die Erstellung eines charakteristischen Fingerprints der Droge und konnte somit durch eine Extraktion bei Raumtemperatur ersetzt werden.

Anhand der Analyse der Procyanidine in Weißdornblättern mit Blüten konnte in der vorliegenden Arbeit exemplarisch gezeigt werden, dass es durchaus auch Proben gibt, bei denen eine aufwendigere Probenaufarbeitung sinnvoll ist, um einzelne Substanzen genauer analysieren zu können. Die Aufarbeitung durch Festphasenextraktion ermöglichte die Trennung der Flavonoide, der oligomeren- und der polymeren Procyanidine. Durch Elution der einzelnen Fraktionen mit unterschiedlich polaren Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen, konnten die Substanzgruppen voneinander getrennt werden und anschließend einzeln analysiert werden. Die Aufarbeitung der Droge Weißdornblätter mit Blüten durch Festphasenextraktion wurde auch für die Analyse der Procyanidine mittels HPLC-MS angewendet (Rohr 1999). Untersuchungen von Wittig ergaben, dass die einfache Extraktion der Procyanidine mit einem Methanol-Wasser Gemisch (70:30) nicht ausreichend selektiv ist, die oligomeren- und die polymeren Procyanidine mittels HPLC-UV zu trennen (Wittig 2001).

Während der gesamten Methodenentwicklung ist die Detektion ein sehr wichtiger Schritt, besonders bei der Analyse von Extrakten mit unbekannter Zusammensetzung. Um sicherzustellen, dass alle Zonen auf einer Platte erfasst werden, erfolgt die Detektion einer qualitativen Analyse visuell im UV-Licht. Substanzen, die bei $\lambda=254$ nm das Licht absorbieren, erscheinen als dunkle Zonen auf Platten mit einem Fluoreszenzindikator. Bei der Auswertung im UV-Licht bei $\lambda=366$ nm werden alle Substanzen erfasst, die bei dieser Wellenlänge fluoreszieren. Die densitometrische Auswertung eines Chromatogramms bei Wellenlängen in dem Bereich von 190-800 nm ermöglicht die Detektion aller Substanzen, die innerhalb dieses Bereiches Licht absorbieren.

Durch densitometrische Auswertung der Absorptionskurven aller Substanzen einer Droge bzw. eines Extrakts ist es auch möglich, Inhaltsstoffe zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde dies exemplarisch anhand der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock und einem daraus hergestellten Extrakt durch-

geführt. In dem Fingerprint der Droge konnte unter UV-Licht bei $\lambda=366$ nm eine blau fluoreszierende Zone detektiert werden, die in ihrer Lage mit Formononetin und mit Isoferulasäure übereinstimmte. Die beiden Zonen unterschieden sich aber in der Intensität der Fluoreszenz. Isoferulasäure zeigte eine stärkere Fluoreszenz als Formononetin. Durch die densitometrische Auswertung der Chromatogramme und die damit verbundene Aufnahme von UV-Spektren war es möglich, die Substanz Isoferulasäure in den Proben der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock und daraus hergestelltem Extrakt zu identifizieren. Formononetin konnte nicht in den Proben gefunden werden. Kenelly et al. untersuchten 13 verschiedenen Populationen von *Cimicifuga racemosa* sowohl dünnschichtchromatographisch als auch mittels HPLC und konnten ebenfalls kein Formononetin detektieren (Kenelly et al. 2002). Dieses Ergebnis deckt sich mit weiteren HPLC-Untersuchungen, bei denen kein Formononetin im Inhaltsstoffspektrum von Traubensilberkerzenwurzelstock gefunden wurde (Hagels et al. 2000). 1985 hatten Jarry und Mitarbeiter Formononetin aus einem methanolischen Extrakt der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock isoliert und in weiteren Studien über die Bindung von Formononetin an Östrogen-Rezeptoren *in vitro* berichtet (Jarry und Harnischfeger 1985 a, Jarry et al. 1985 b). Die Ergebnisse publizierter pharmakologischer *in vitro* Studien über die Bindung von Formononetin an Östrogen-Rezeptoren sind widersprüchlich (Jarry und Harnischfeger 1985a, Dücker et al. 1991, Nesselhut et al. 1993, Harnischfeger und Cilien 1996, Kruse et al. 1999, Liu et al. 2001a, Liu et al. 2001b).

Im Rahmen der Methodenentwicklung werden während der Optimierung der mobilen Phase meistens universelle, wenig selektive Derivatisierungsreagenzien für die Visualisierung verwendet. Reagenzien wie zum Beispiel Schwefelsäure in Methanol oder Anisaldehyd sind unspezifisch und eignen sich daher, die Zonen der meisten Substanzen anzufärben. Solche wenig selektiven Reagenzien sind für die Detektion unbekannter Substanzen geeignet, während für die Detektion bekannter Substanzen oder funktioneller Gruppen selektivere Derivatisierungsreagenzien zur Verfügung stehen (Jork et al. 1990, Jork et al. 1992). Für die Derivatisierung der Procyanidine zum Beispiel wurden zwei Farbreaktionen, die für die photometrische Bestimmung

der Procyanidine angewendet werden, für die Dünnschichtchromatographie übernommen.

Die Derivatisierung mit Vanillin-Phosphorsäurereagenz führte zu rot gefärbten Zonen im Chromatogramm (Wagner und Bladt 1996, Hölzl und Strauch 1977) und die Derivatisierung mit DMAZA-Reagenz zu blau gefärbten Zonen (Leipolz 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Derivatisierung der Procyanidine mit DMAZA-Reagenz durchgeführt, da diese Reaktion spezifischer für die Procyanidine ist, als die Farbreaktion mit Vanillin-Phosphorsäurereagenz. DMAZA zeigt eine höhere Affinität zu Flavan-3-olen als zu anderen Phenolen und ist selektiver und sensitiver für Procyanidine, als die Farbreaktion mit Vanillin (Wittig 2001). DMAZA bildet mit Procyanidinen blaue Reaktionsprodukte, wobei auch die Monomeren Epicatechin und Catechin erfasst werden. Bei dieser Reaktion bildet jedes Procyanidin, unabhängig vom Polymerisierungsgrad, nur ein Kondensationsprodukt (Mc Mourrough 1978). Diese für Procyanidine spezifische Derivatisierungsreaktion wird auch zur quantitativen Bestimmung mittels HPLC-UV der Procyanidine in Weißdorn und daraus hergestellten Zubereitungen verwendet (Wittig et al. 2002).

7.2 Validierung

Die Möglichkeit genaue und reproduzierbare analytische Verfahren zu etablieren ist von zentraler Bedeutung für die pharmazeutische Industrie. Vor allem in der Entwicklung, Prüfung und Herstellung von Arzneimitteln ist es wichtig Verfahren einzusetzen, die validiert sind. Im Rahmen der Validierung wird nachgewiesen, ob ein Verfahren für seine Aufgabe geeignet ist. Bei der Validierung eines Verfahrens werden im wesentlichen die systematischen und zufälligen Fehler überprüft.

Die Anforderungen zur Validierung analytischer Verfahren für die pharmazeutische Qualitätskontrolle sind in den ICH-Richtlinien Q2A und Q2B vorgegeben. Wie unter 1.1.1 diskutiert, wird in diesen Richtlinien für die Validierung qualitativer Verfahren nur der Nachweis der Selektivität gefordert, während für die Validierung quantitativer Verfahren zusätzlich die Validierungsparameter Richtigkeit, Präzision und Linearität gefordert werden. Weiterhin wird die Festlegung der Detektions-, der Bestimmungsgrenze und des Arbeitsbereichs gefordert.

Die Besonderheiten der Qualitätsanalytik pflanzlicher Arzneimittel werden in den Leitlinien CPMP/QWP/2820/00 und CPMP/QWP/2819/00 angesprochen. In der Richtlinie zur Qualität von Phytopharmaka wird die Validierung von Methoden, die nicht in Arzneibüchern stehen, in Verbindung mit den ICH-Richtlinien Q2A und Q2B gefordert. In Deutschland gelten für Phytopharmaka und ihre pflanzlichen Ausgangsstoffe die Bestimmungen des Arzneimittelgesetzes (AMG). Die Anforderungen an Phytopharmaka betreffend Wirksamkeit, Unbedenklichkeit und pharmazeutischer Qualität entsprechen dabei denen der Arzneimittel mit chemisch definierten Inhaltsstoffen. Die pharmazeutische Qualität schließt unter anderem die Chargenkonformität des Gehaltes und des Inhaltsstoffmusters ein. Für Arzneidroge und die daraus hergestellten Zubereitungen geben § 26 AMG bzw. die Arzneimittelprüfrichtlinien den zulassungsrechtlichen Rahmen für Art und Umfang der durchzuführenden Prüfungen an. Für die Analysen von Drogen und Extrakten können auch Arzneibuchmonographien herangezogen werden. Die weitgehend allgemein gehaltenen Richtlinien fordern unter anderem eine Gehaltskonformität für das Fertigarzneimittel sowie valide analytische Verfahren, die dem "aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik" entsprechen.

Bestehende Validierungskonzepte für HPLC-Verfahren können als Basis für die Validierung dünnschichtchromatographischer Verfahren dienen (Szepesi et al. 1989, Wilson 1990, Wahlich und Carr 1990, Edwardson et al. 1990). Bei der Übertragung dieser Konzepte auf die Dünnschichtchromatographie ist jedoch zu berücksichtigen, dass einige Validierungsparameter aufgrund der Besonderheiten der Planarchromatographie differieren (Ferenczi-Fodor et al. 1993). Für die Validierung quantitativer dünnschichtchromatographischer Verfahren entwickelten Ferenczi-Fodor et al. und Szepesi Konzepte, in denen detailliert auf die Besonderheiten der DC eingegangen wird (Ferenczi-Fodor et al. 1993, Szepesi 1993a). Im Unterschied zur HPLC ist die DC ein offenes System, das sehr viel empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen ist. Die Validierung der DC ist daher in fünf einzelne Schritte einzuteilen, wobei jeder Schritt separat validiert wird: 1. Probenvorbereitung, 2. Auftragen der Probe auf die Platte, 3: dünnschichtchromatographische Trennung, 4: Detektion (Derivatisierung), 5: Quantifizierung (Szepesi 1993a). Ferenczi-Fodor und Mitarbeiter bezeichnen die Schritte 1-4 als Vor-Validierung (Ferenczi-Fodor et al. 2001). Diese

Teilschritte des Validierungsprozesses sind entscheidend, da hier die Voraussetzungen für die Quantifizierung überprüft werden.

Während des gesamten dünn-schichtchromatographischen Prozesses können viele Fehler auftreten, die auf eine ungenügende Stabilität des Analyten zurückzuführen sind. So beschreibt Szepesi fünf Versuche zur Evaluierung der Probenstabilität: die Stabilität während der Lagerung, in der Probenlösung, nach der Auftragung auf die Platte, während der Chromatographie und nach der Entwicklung auf der Platte (Szepesi 1993a). Die Evaluierung dieser Parameter erfolgt durch Chromatographie der Proben nach Lagerung über festgelegte Zeiträume und durch zweidimensionale DC. Die Validierung des Quantifizierungsprozesses erfolgt analog der HPLC. Die Parameter Selektivität, Präzision, Richtigkeit, Wiederholbarkeit und Detektierbarkeit werden überprüft (Szepesi 1993a, Ferenczi-Fodor et al. 1993, Ferenczi-Fodor et al. 2001).

Ein weiterer sehr wichtiger Punkt bei der Validierung analytischer Verfahren ist die Prüfung der Robustheit. Bei der Entwicklung und Validierung einer Methode ist es für den Analytiker wichtig, sich darüber bewusst zu sein, gegenüber welchen Veränderungen die Methode sensitiv ist. Dies gilt sowohl für die HPLC als auch für die DC, wobei die DC als offenes System anfälliger ist gegenüber Störungen von außen. Die von Szepesi erarbeiteten Parameter zur Robustheitsprüfung werden bei der Diskussion der Robustheitsprüfungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, aufgegriffen und diskutiert.

Für die Validierung von Arzneimitteln, die chemisch definierte Wirkstoffe enthalten, sind diese Konzepte ohne Probleme anwendbar (Saelzer et al. 2001, Renger 1995).

Bei der Übertragung der Konzepte auf die Validierung von Phytopharmaka, ist es notwendig, die Besonderheiten dieser Arzneimittel zu berücksichtigen.

Phytopharmaka enthalten Extrakte als Wirkstoffe und sind somit Vielstoffgemische, in denen meistens nicht alle Substanzen bekannt sind. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung sind zur Charakterisierung solcher Extrakte leistungsfähige chromatographische Verfahren notwendig. Dünnschichtchromatographische Verfahren haben den großen Vorteil, dass eine Charakterisierung über visuelle Fingerprints erfolgen kann, die gegenüber hochdruckflüssigkeits- oder gaschromatographischen Fingerprints aussagekräftiger sind. Die Spezifität kann durch die

vielfältig zur Verfügung stehenden Detektionsverfahren noch gesteigert werden, wobei auch Substanzen ohne Chromophore erfasst werden können.

Da es keine Validierungskonzepte für die Dünnschichtchromatographie in der Phytoanalytik gibt, wurde in der vorliegenden Arbeit ein solches Konzept für die qualitative DC erarbeitet. Die bestehenden Validierungskonzepte für die HPLC und die quantitative DC wurden als Basis angesehen und unter Berücksichtigung der speziellen Problematik der Phytoanalytik und der Besonderheiten der DC auf die qualitative DC übertragen. Für die Validierung qualitativer Verfahren sind die Parameter Selektivität, Robustheit und Reproduzierbarkeit relevant.

Selektivität

Dünnschichtchromatographie wird häufig für die Identifizierung von Drogen, Extrakten und Phytopharmaka angewendet. Nach einer geeigneten Probenaufarbeitung werden die Proben, Standards und Referenzsubstanzen parallel auf einer Platte chromatographiert und derivatisiert. Matrixeffekte müssen – soweit möglich – eliminiert werden, um scharfe Zonen im Chromatogramm zu erhalten und eindeutige R_f -Werte festzulegen. Selektivität ist definiert als “die Fähigkeit einer analytischen Methode einen Analyten in Gegenwart anderer Komponenten, die in der Matrix vorhanden sein können, zu detektieren“ (ICH Q2A 1995). Bezogen auf Identitäts- und Reinheitsuntersuchungen bedeutet diese Definition, dass selektive analytische Verfahren geeignet sein müssen die Identität eines Analyten eindeutig nachzuweisen und Verunreinigungen respektive Verfälschungen zu erkennen.

Fingerprintanalytik ist in den Richtlinien zur Qualitätsanalytik von Phytopharmaka eindeutig erwähnt. Unter (1.1) wurde ausführlich darauf eingegangen, in welchen Leitlinien speziell Fingerprintanalytik und Dünnschichtchromatographie erwähnt sind. Idealerweise sind die Bandenmuster der Fingerprints so selektiv, dass Verunreinigungen erkannt werden können bzw. die Chromatographie nicht stören. Bei der Untersuchung von komplex zusammengesetztem pflanzlichen Material treten aber mehrere Schwierigkeiten auf. Zu nennen sind zum Beispiel geringe Schwankungen der R_f -Werte trotz stabiler chromatographischer Bedingungen oder die Tatsache, dass sich Substanzen häufig trotz weitgehend optimierter Analysenbedingungen

nicht völlig trennen lassen. Dies führt zu Überlagerungen einzelner Zonen, die von Trennung zu Trennung unterschiedlich sein können, weshalb das Aussehen von Fingerprintchromatogrammen differieren kann. Manchmal erschweren auch Schwankungen der Inhaltsstoffmuster die eindeutige Festlegung solcher Fingerprintchromatogramme. Diese Variabilität ist unter anderem durch verschiedene Erntezeitpunkte und Reifestadien sowie durch geographische und genetische Faktoren (Vorkommen von Rassen und Chemotypen) bedingt. Solche Schwankungen im Inhaltsstoffmuster der untersuchten Pflanzen bzw. Drogen sollten soweit möglich und sinnvoll, dokumentiert und begrenzt werden. Sie lassen sich oft nicht vermeiden und sind in einem gewissen Rahmen akzeptabel. Die skizzierten Schwierigkeiten in der Phytoanalytik betreffen nicht alleine die Dünnschichtchromatographie, sondern gleichermaßen die HPLC und andere chromatographische Verfahren, die in der Qualitätsanalytik von Phytopharmaka eingesetzt werden.

Für den Nachweis der Selektivität von Methoden zur Identitätsprüfung von Drogen, Extrakten und Phytopharmaka ist es optimal, wenn authentisches Referenzmaterial vorliegt. Sofern dieses authentische Material nicht vorliegt, können die Pflanzen in der Natur gesammelt werden und bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden für den Selektivitätsnachweis einer Methode zur Bestimmung der Droge *Urticae folium* an unterschiedlichen Standorten Brennnesseln gesammelt und als *Urtica urens* und *Urtica dioica* bestimmt. Die Fingerprints beider Arten zeigten uneinheitliche Bandenmuster bei der Auswertung der fluoreszierenden Substanzen im UV-Licht bei $\lambda=366$ nm. Für die Festlegung des authentischen Pflanzen- bzw. Drogenmaterials ist es wichtig, die Inhaltsstoffmuster mehrerer Pflanzen, die an unterschiedlichen Standorten gesammelt wurden, zu vergleichen, um Schwankungen innerhalb des Inhaltsstoffmusters zu erkennen und zu begrenzen. Untersuchungen zu der genannten Variabilität im Inhaltsstoffspektrum verschiedener Arten führten Veit et al. anhand von *Equisetum arvense* und *Equisetum palustre* durch (Veit et al. 1989). Verfälschungen von *E. arvense* mit *E. palustre* sollten aufgrund der toxikologischen Bewertung von *E. palustre* vermieden werden. Veit entwickelte eine HPLC-Methode zur Identitäts- und der Reinheitsprüfung verschiedener Equisetum-Arten. Mit dieser Methode konnten sowohl Unterschiede im Bandenmuster zweier chemischer Rassen von *E. arvense* mit distinkten geographischen Arealen detektiert

werden als auch die Inhaltsstoffspektren von *E. palustre* von *E. arvense* differenziert werden. Die Unterscheidung beider Arten war ebenfalls dünn-schichtchromatographisch möglich. Nagell entwickelte eine Methode die es ermöglichte, die beiden Arten *E. arvense* und *E. palustre* anhand von gelb-grün fluoreszierenden Zonen im unteren R_f -Bereich der Fingerprints zu unterscheiden (Nagell 1987).

Untersuchungen verschiedener Arten des Weißdorns belegten, dass sich das Flavonoidmuster dieser Arten erheblich voneinander unterscheiden kann (Abbildung 7-1). Dieses Beispiel zeigte aber auch deutlich die Variabilität der Inhaltsstoffspektren, die innerhalb einer Art auftreten können (Bandenmuster von *Crataegus laevigata* auf den Bahnen 2,8 und 9).

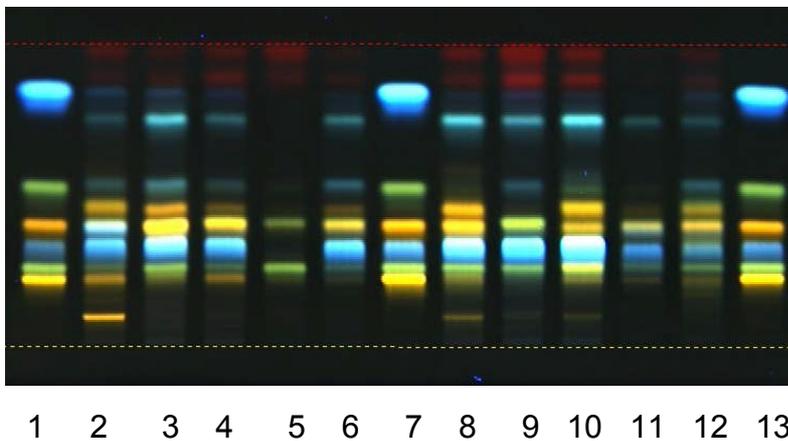


Abbildung 7-1: Dünnschichtchromatographie verschiedener *Crataegus* species, Standards nach aufsteigenden R_f -Werten Rutin, Vitexin-2"-O-rhamnosid, Chlorogensäure, Hyperosid, Vitexin, Kaffeesäure (Bahnen 1, 7, 13), *Crataegus laevigata* (Bahnen 2,8,9), *Crataegus monogyna* (die Probe auf Bahn 5 wurde fermentiert) (Bahnen 3-6), *Crataegus macrocarpa* (Bahn 10), *Crataegus azarolus* ssp. *azarolus* (Bahn 11), *Crataegus pentagyna* (Bahn 12), (CAMAG Labor Muttenz, Schweiz).

Für die Selektivitätsprüfungen dünn-schichtchromatographischer Verfahren ist es sinnvoll, Proben unterschiedlicher Arten und Chargen zu untersuchen und die Fingerprints mit denen bekannter Verfälschungen zu vergleichen. So wurden in der vorliegenden Arbeit exemplarisch solche Selektivitätsuntersuchungen für die entwickelten Methoden durchgeführt. Die Selektivität einer Methode zur Identifizierung der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock konnte durch Chromatographie des authentischen Drogenmaterials parallel auf einer Platte mit bekannten Verfälsch-

ungen und Verunreinigungen der Droge belegt werden. Der Vergleich der Drogen unterschiedlicher Chargen und Herkünfte zeigte, dass das Inhaltsstoffmuster differieren kann. Die Selektivität einer Methode zur Identifizierung der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock anhand der Hydroxycimtsäurederivate konnte ebenfalls durch vergleichende Fingerprintanalytik der authentischen Droge mit den Verfälschungen belegt werden.

Für die Methode zur Identifizierung der Droge Brennnesselblätter anhand der Substanzen Scopoletin, Kaffeoyläpfelsäure und Chlorogensäure konnte in der vorliegenden Arbeit durch Fingerprintvergleich gezeigt werden, dass die Bandenmuster der Drogen unterschiedlicher Herkunftsländer differieren.

Über die Durchführung von Selektivitätsprüfungen durch HPTLC in der Phytoanalytik gibt es wenig Publikationen. In jüngster Zeit wurde eine Arbeit über die Identifizierung verschiedener Echinacea-Arten mittels HPTLC publiziert (Reich et al. 2002). Reich und Mitarbeiter untersuchten im Rahmen der Selektivitätsprüfungen der Methoden zum Nachweis der Alkylamide, der Fructofuranoside und der Phenylpropanoide die Arten *E. purpureae*, *E. pallidae*, *E. angustifoliae*, *E. tennesseeensis*, *E. artrorubentis* und bekannte Verfälschungen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die einzelnen Arten stark in ihren Inhaltsstoffmustern variieren und die bekannten Verfälschungen *Parthenii integrifolii*, *Lespedezae herba* und *Chrysanthemii parthenii herba* eindeutig anhand der Fingerprints der Echinacea-Arten zu differenzieren sind. Exemplarisch wurden in Abbildung 7-2 und Abbildung 7-3 die Chromatogramme der Phenylpropanoide dargestellt.

Selektivitätsprüfungen von Methoden, die der Identifizierung von Extrakten und daraus hergestellten Fertigarzneimitteln dienen, wurden bislang nicht publiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden solche Selektivitätsnachweise durchgeführt, indem authentisches Extrakt- oder Drogenmaterial und Stell- bzw. Hilfsmittel parallel mit den Proben auf einer Platte chromatographiert wurden. Diese Vorgehensweise ermöglichte die direkte Beurteilung von Störungen der Chromatographie durch Matrixbestandteile.

In den Monographien der American Herbal Pharmacopeia (AHP) werden die dünnschichtchromatographischen Identitäts- und Reinheitsprüfungen von Drogen, Extrakten und daraus hergestellten Fertigarzneimitteln anhand von Chromato-

grammen des authentische Materials und bekannten Verfälschungen und Verunreinigungen beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden zum dünnschichtchromatographischen Nachweis der Triterpenglykoside und der Hydroxycimtsäurederivate in Traubensilberkerzenwurzelstock und daraus hergestellten Zubereitungen wurden in der Monographie "Black Cohosh Rhizome" der American Herbal Pharmacopeia publiziert (AHP 2002).

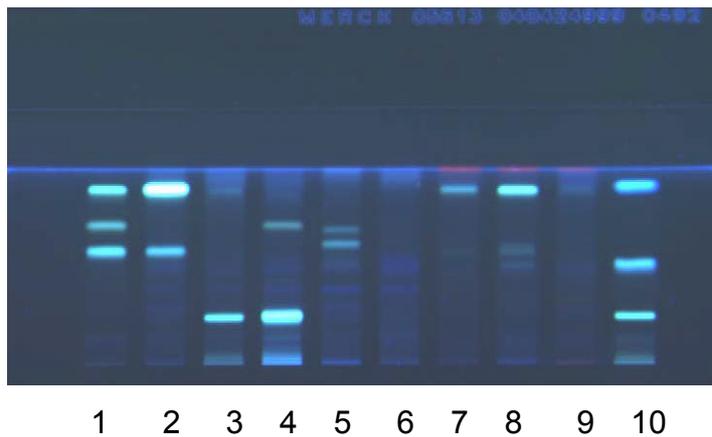


Abbildung 7-2: Chromatogramm der Phenylpropanoide unterschiedlicher Echinacea-Arten; Bahn 1: Referenzlösungen Caftarensäure, Cynarin, Cichoriensäure (in aufsteigender Reihenfolge), Bahn 2: *Echinaceae purpureae Radix*, Bahn 3: *Echinaceae pallidae Radix*, Bahn 4: *Echinaceae angustifoliae Radix*, Bahn 5: *Echinaceae tennesseensis Radix*, Bahn 6: *Echinaceae artrorubentis Radix*, Bahn 7: *Echinaceae purpureae Herba*, Bahn 8: *Echinaceae pallidae Herba*, Bahn 9: *Echinaceae angustifoliae Herba*, Bahn 10: Referenzlösungen Echinacosid, Chlorogensäure, Kaffeesäure (in aufsteigender Reihenfolge) (Reich et al. 2002).

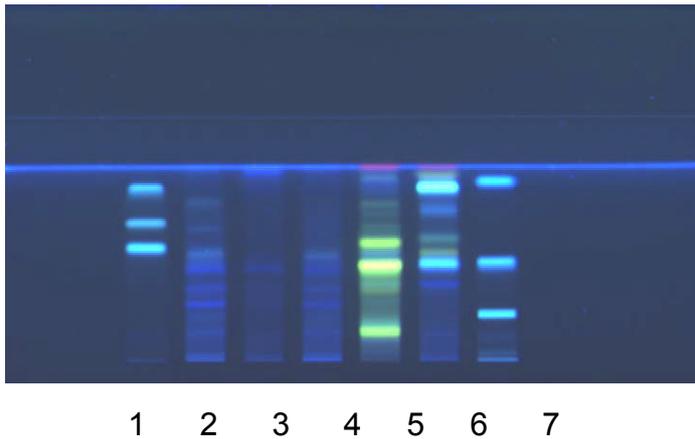


Abbildung 7-3: Chromatogramm der Phenylpropanoide bekannter Verfälschungen von Echinacea; Bahn 1: Referenzlösungen Caftarinsäure, Cynarin, Cichoriensäure (in aufsteigender Reihenfolge), Bahn 2: *Parthenii integrifolii*, Radix *, Bahn 3: *Parthenii integrifolii* Radix *, Bahn 4: *Parthenii integrifolii* Radix *, Bahn 5: *Lespedezae Herba*, Bahn 6: *Chrysanthemii parthenii Herba*, Bahn 7: Echinacosid, Chlorogensäure, Kaffeesäure (in aufsteigender Reihenfolge) (Reich et al. 2002).

* verschiedene Chargen

Robustheit und Reproduzierbarkeit

Mit die wichtigsten Prüfungen im Rahmen einer Validierung sind die Robustheitsuntersuchungen. Die Robustheit ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit einzelner Ergebnisse, wenn die Methode wiederholt angewendet wird zur Analyse der selben Proben unter veränderten experimentellen Bedingungen (Szepesi 1993b). Diese generelle Aussage ist allgemein gültig für alle analytischen Verfahren. Obwohl Robustheitsuntersuchungen ein wichtiger Bestandteil jeder Validierung sind, wurden bislang nur wenige Daten publiziert, wie diese Prüfungen durchzuführen und zu evaluieren sind. Szepesi erarbeitete Robustheitsuntersuchungen für HPLC-Methoden und leitete aus diesen Daten ein Konzept für die Robustheitsuntersuchungen in der quantitativen DC ab (Szepesi 1990, Szepesi 1992, Szepesi 1993b). Er berücksichtigte dabei, dass die DC im Unterschied zur HPLC als offenes System anfälliger ist gegenüber Störungen von außen. Deshalb teilte er die Robustheitsuntersuchungen in zwei Kategorien auf: Prüfungen, die den Einfluss äußerer Faktoren auf die Chromatographie untersuchen und solche, die Veränderungen der experimentellen Bedingungen erfassen (Szepesi 1993b). Geiss beschreibt in seinem Buch "Fundamentals of Thin Layer Chromatographie" eine Änderung der

R_f -Werte im Chromatogramm durch Variabilitäten der folgenden Parameter: Stationäre Phase, Fließmittel, Kammertyp und Kammersättigung, Trennstrecke, Temperatur und Luftfeuchtigkeit (Geiss 1987). Er geht zwar nicht auf Robustheitsuntersuchungen ein, diese wären jedoch die logische Konsequenz seiner Ausführungen, um Veränderungen im Chromatogramm bewerten zu können. Generell sollten Robustheitsuntersuchungen in die im Folgenden aufgezählten Parameter mit sämtlichen möglichen Variablen abdecken:

- Die Probenvorbereitung
- Die Probenauftragung
- Die Konformität unterschiedlicher Chargen von HPTLC - Platten
- Die Bedingungen für die chromatographische Trennung
- Die Detektionstechnik
- Den Prozess der Quantifizierung
- Die Reproduzierbarkeit

Szepesi erarbeitete detaillierte Prüfungen für nahezu alle Änderungen, die innerhalb dieser 7 Parameter auftreten können (Szepesi 1993b). Bei der Planung solcher Untersuchungen ist es jedoch sinnvoll, abzuwägen welche Prüfungen durchgeführt werden müssen und welche vernachlässigt werden können, um die notwendigen Prüfungen zu optimieren. Vor Beginn des experimentellen Teils der Robustheitsprüfung sollte die Evaluierung der Prüfungen festgelegt und Akzeptanzkriterien erstellt werden.

Nach diesem Prinzip wurden auch in der vorliegenden Arbeit Robustheitsuntersuchungen der qualitativen DC durchgeführt. Robustheitsuntersuchungen qualitativer und quantitativer Methoden unterscheiden sich nicht wesentlich, lediglich der Überprüfung des Quantifizierungsvorganges entfällt.

Die Stabilität des Analyten wurde vor und während der Chromatographie nachgewiesen. Diese Prüfungen sind wichtig, um zu belegen, dass keine Zonen von Abbau- oder Umlagerungsprodukten des Untersuchungsmaterials im Fingerprint vorkommen, die die Detektion der Chromatographie stören (Szepesi 1993a).

Im Rahmen der Entwicklung der Methode zur Identitätsprüfung der Droge Brennesselblätter wurde für die isolierte Kaffeoyläpfelsäure eine Instabilität während der Chromatographie festgestellt. Neben der Chlorogensäure war eine

zusätzliche hellblau fluoreszierende Zone (wahrscheinlich ein Isomerisierungsprodukt der Chlorogensäure) in dem zweidimensionalen Chromatogramm zu erkennen. In dem Fingerprint der Droge war durch diese Instabilität aber keine zusätzliche Zone zu sehen, so dass das Fließmittel im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung nicht verändert wurde.

Anhand der Methode zur Identifizierung der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock konnte in der vorliegenden Arbeit exemplarisch dargestellt werden, dass mit steigender Temperatur und damit einhergehender abnehmender Luftfeuchtigkeit die R_f -Werte im Chromatogramm sinken. Um realistische Werte zu erhalten, wurden die Proben an einem Sommertag in einem nicht klimatisierten Labor untersucht. Die Temperatur stieg an diesem Tag von 27 °C auf 32 °C, die Luftfeuchtigkeit sank von 52 % relative Feuchte auf 46 % relative Feuchte. Methoden, die nicht ausreichend robust sind gegenüber diesen Änderungen, sollten in klimatisierten Labors oder in temperaturkontrollierten Kammern durchgeführt werden. Untersuchungen, die im Rahmen der Validierung der Methode zur Identitätsprüfung verschiedener Echinacea - Arten durchgeführt wurden (Reich et al. 2002), ergaben andere Ergebnisse. Mit steigender Temperatur und steigender Feuchtigkeit stiegen auch die R_f -Werte der Zonen im Chromatogramm. In diesen Versuchen wurden die Bedingungen der Chromatogrammentwicklung so festgelegt, dass mit steigender Temperatur auch die Feuchtigkeit erhöht wurde (23°C / 49 % r. F., 31°C / 72 % r. F.).

Der Einfluss der Bedingungen der Chromatogrammentwicklung (Kammertyp, Kammersättigung, Trennstrecke) wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Beispiele Bärentraubenblätter und Traubensilberkerzenwurzelstock untersucht.

Die Chromatogrammentwicklung wurde in der gesättigten Doppeltrogkammer und in der gesättigten Horizontal-Entwicklungskammer durchgeführt. Die Fingerprints der Droge Bärentraubenblätter waren nach beiden Entwicklungen vergleichbar in Bezug auf Lage, Farbe und Intensität der Zonen. Die Fingerprints der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock waren nicht miteinander vergleichbar. Nach der Entwicklung in der Horizontal-Entwicklungskammer waren die R_f -Werte höher, als nach der Entwicklung in der Doppeltrogkammer. Die Sequenz der Zonen im Fingerprint war jedoch gleich.

Der Fingerprintvergleich der Chromatogramme einzelner Echinacea-Proben, die in der gesättigten Doppeltrögkammer und in der gesättigten Horizontal-Entwicklungskammer entwickelt wurden ergab differierende Bandenmuster hinsichtlich der Lage der Zonen. Die Änderung der Entwicklungsstrecke dagegen hatte keinen Einfluss auf die Fingerprints unterschiedlicher Echinacea - Arten (Reich et al. 2002). Diese Ergebnisse belegen, dass die Auswirkungen von Änderungen der Parameter der Chromatogrammentwicklung auf die R_f -Werte und den Fingerprint nicht allge-mein festzulegen sind. Daher sollten die Parameter der Chromatogrammentwicklung im Rahmen jeder Methodvalidierung überprüft werden.

Der Nachweis der Fließmittelstabilität ist für die DC wichtig, da die mobile Phase im Gegensatz zur HPLC, häufig sehr viel komplexer zusammengesetzt ist und mehr Interaktionen auftreten können. Bei HPLC-Untersuchungen ist die Stabilität der mobilen Phase unproblematischer, da die Mischung der Lösungsmittel meistens während der Chromatographie im geschlossenen System erfolgt. In Fließmitteln, die aus mehr als einem Lösungsmittel zusammengesetzt sind, können chemische und physikalische Reaktionen ablaufen. Umlagerungen, Umesterungen oder Zersetzungen führen zu Änderungen der Zusammensetzung des Fließmittels. Zum Beispiel in dem Fließmittel Ethylacetat/Ameisensäure/Essigsäure/Wasser können theoretisch Umesterungen von Ethylacetat zu Ethylformiat ablaufen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch belegt werden, dass dieses Fließmittel über einen Zeitraum von 24 Stunden stabil ist. Veränderungen im Fingerprint können aus einer Instabilität der mobilen Phase resultieren. Mit pharmazeutischem Sachverstand wird beurteilt, ob Instabilitäten auftreten können. Die Prüfung der Fließmittelstabilität erfolgt immer über einen festgelegten Zeitraum; alternativ wird die mobile Phase direkt vor der Entwicklung des Chromatogramms frisch hergestellt. Blatter konnte in Ihren Untersuchungen die Stabilität eines ähnlich zusammengesetzten Fließmittels ebenfalls über einen Zeitraum von 24 Stunden nachweisen (Blatter 2001).

Die Derivatisierung erfolgt bei der qualitativen DC meistens mit spezifischen oder unspezifischen Reagenzien, die die Zonen im Chromatogramm anfärben. Die Derivatisierung ermöglicht die visuelle Auswertung der Chromatogramme. Durch diese Art der Auswertung werden zusätzliche Informationen über die chemischen

Strukturen einzelner Substanzen erhalten. Im Gegensatz dazu erfolgt die Detektion bei der HPLC nur durch die Variation der Wellenlängen, die visuelle Auswertung ist aufgrund des unterschiedlichen Detektionssystems nicht möglich. Die Stabilität der Derivatisierungsreagenzien kann sich in Abhängigkeit von der Temperatur und Lagerzeit verändern, deshalb sollten entsprechende Stabilitätsstudien angestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden exemplarisch Robustheits- und Stabilitätsuntersuchungen der Derivatisierung mit den Reagenzien Anisaldehyd und Dimethylaminozimtaldehyd durchgeführt.

Die Derivatisierung mit Anisaldehyd ist problematisch, da die Färbung der Zonen im Chromatogramm und des Plattenhintergrunds nur schwer reproduzierbar ist (Schmid 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Derivatisierung mit Anisaldehyd reproduzierbar durchgeführt werden kann, wenn alle Parameter festgelegt werden: Zeit und Geschwindigkeit für das Tauchen der Platte, Zeiten für das Erhitzen der Platte nach der Derivatisierung und die für die Trocknung, Trocknungsbedingungen, Zeit zwischen der Derivatisierung und der Dokumentation. Wurden alle festgelegten Parameter exakt eingehalten, war es möglich, reproduzierbare Chromatogramme zu erstellen.

Die Derivatisierung mit Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) ist ebenfalls problematisch, da sich die Farbintensität der Zonen im Chromatogramm bei der Erwärmung der derivatisierten Platte sehr schnell ändert. Weiterhin färbt sich der Plattenhintergrund während des Erhitzens der derivatisierten Platte gelb (Wahli 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sich diese Färbungen der Zonen und des Plattenhintergrundes in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Säureanteil im Reagenz verändern. Durch Änderung der Zusammensetzung des Reagenzes und durch Festlegung der Temperatur für das Erhitzen der derivatisierten Platte auf 50 bis 60°C konnten reproduzierbare Chromatogramme generiert werden. Die Stabilität von DMAZA-Reagenz konnte über einen Zeitraum von 24 Stunden bei Lagerung im Kühlschrank nachgewiesen werden. In einigen Fällen ist es auch möglich, ein stabileres Reagenz zu verwenden. Schwefelsäurereagenz kann zum Beispiel in der Phytoanalytik angewendet werden. Dieses Reagenz ist stabiler als zum Beispiel Anisaldehyd oder DMAZA-Reagenz, aber nicht so selektiv. Die Wahl des Derivatisierungsreagenzes erfolgt unter

Berücksichtigung des analytischen Ziels der Methode. Es gibt keine allgemein gültigen Kriterien für die Auswahl und für die Robustheit.

Anhand der Methode zur Identifizierung der Brennesselblätter wurde in der vorliegenden Arbeit die Stabilität der Fluoreszenz nach der Derivatisierung mit Naturstoffreagenz und Macrogollösung untersucht. Es konnte belegt werden, dass sich die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit verändert. Die Dokumentation wurde daher direkt nach der Derivatisierung durchgeführt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen einer Arbeit, in der die Abhängigkeit der Fluoreszenz nach der Derivatisierung mit Naturstoffreagenz und Macrogol beschrieben wird (Billeter et al. 1990). Billeter und Mitarbeiter belegten außerdem mit ihrer Arbeit die Abhängigkeit der Intensität der Fluoreszenz von der Technik des Erhitzens der Platte.

Die Reproduzierbarkeit einer Methode kann innerhalb eines Labors durchgeführt werden oder in Ringversuchen in mehreren Labors. Szepesi schlägt in seinem Konzept die Durchführung einer Methode unter den selben experimentellen Bedingungen von drei Personen vor (Szepesi 1993b). In der vorliegenden Arbeit wurde die Reproduzierbarkeit der Methode zur Identifizierung der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock durch den Vergleich von 10 Chromatogrammen, die an 10 verschiedenen Tagen unter vergleichbaren Bedingungen erstellt wurden, überprüft. Durch Vergleich der R_f -Werte konnte die Reproduzierbarkeit belegt werden. In den Arbeiten von Blatter (Blatter 2001) und Schmid (Schmid 2000) wurde die Reproduzierbarkeit einzelner Methoden ebenfalls durch den Vergleich der R_f -Werte über einen festgelegten Zeitraum nachgewiesen.

Durch den visuellen Vergleich der Platten wurde auch die Reproduzierbarkeit der Dokumentation bewiesen. In der Arbeit von Schmid (Schmid 2000) wurde die Reproduzierbarkeit des Videodokumentationssystems eindeutig belegt.

Die Validierung qualitativer dünnschichtchromatographischer Verfahren wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, soll nicht als ein starres Konzept angesehen werden, sondern variabel sein. Die hier diskutierten Prüfungen der Selektivität, der Robustheit und der Reproduzierbarkeit wurden exemplarisch für die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden durchgeführt. In der Praxis soll mit

pharmazeutischem Sachverstand entschieden werden, welche Prüfungen durchzuführen sind. Im Rahmen der Validierung sollten so viele Prüfungen wie nötig durchgeführt werden, aber auch keine unnötigen. Um diesen Status des hier erarbeiteten Konzepts zu unterstreichen, wurde es nicht als "allgemein gültig dargestellt", sondern in Qualitätssicherungsdokumenten für die Dünnschichtchromatographie für eine virtuelle "Firma Muster" zusammengefasst (10.6). Diese Dokumente wurden für den gesamten Bereich der qualitativen Dünnschichtchromatographie verfasst und in der Art konzipiert, dass sie von jeder Firma in ein bestehendes Qualitätssicherungssystem implementiert werden können. Die Einteilung der Dokumente erfolgte in Anlehnung an bestehende Qualitätssicherungssysteme. Es wurde eine allgemeine Standardverfahrensanweisung (SOP, Standard operating procedure) "Dünnschichtchromatographie" erstellt und hierarchisch darunter angesiedelte Arbeitsanweisungen und Prüfanweisungen, die konkreter verfasst wurden. Diese Anordnung der Dokumente wurde in Anlehnung an geltende pharmarelevante Qualitätssicherungssystemen (cGMP, GLP, DIN EN etc.) gewählt. SOPs unterliegen einer sehr aufwendigen Dokumenten- und Kopienverwaltung, strikter Versionierung und Freigabe durch die Geschäftsführung und die Qualitätssicherung. Sie sind deshalb als Dokumente anzusehen, mit denen Verfahrensabläufe übergeordnet geregelt werden. Die Verwaltung, Versionierung, Freigabe und sonstige Handhabung aller hierarchisch tiefer angesiedelten Dokumente ist in weiten Bereichen frei gestaltbar. Es ist daher wenig sinnvoll in SOPs inhaltliche Angaben zu konkreten Arbeits- und Prüfvorgängen zu machen, diese sollten in (Master) Plänen, Arbeits- und/oder Prüfanweisungen geregelt werden. Diese Anweisungen können jederzeit den aktuellen Bedürfnissen und Veränderungen angepasst werden und durch die Laborleitung freigegeben werden.

7.3 Stabilitätsuntersuchungen

In der Stabilitätsanalytik von Arzneimitteln werden unterschiedliche Parameter überprüft. Neben visuellen, sensorischen und chemisch physikalischen Prüfungen, werden quantitative Bestimmungen einzelner Substanzen und qualitative bzw. semi-quantitative Bestimmungen des gesamten Inhaltsstoffmusters durchgeführt. Für die

quantitativen und qualitativen Bestimmungen werden meistens chromatographische Methoden eingesetzt, da sie es ermöglichen ein komplexes Komponentenspektrum zu analysieren und aufgrund hoher Sensitivität geringe Substanzmengen zu erfassen (Bakshi et al. 2002). Verschiedene chromatographische Techniken, die für die Stabilitätsanalytik verwendet werden sind die HPTLC, die Gaschromatographie (GC), die HPLC und teilweise auch die Kapillarelektrophorese (CE) (Bakshi et al. 2002). Viele Publikationen beschäftigen sich mit stabilitätsindizierenden Methoden. Sowohl für die HPLC als auch für die HPTLC gibt es eine Vielzahl von Methoden, die jedoch fast ausschließlich für Stabilitätsuntersuchungen von Arzneimitteln, die chemisch definierte Wirksubstanzen enthalten angewendet wurden (Patravale et al. 2000, Kulkarni und Amin 2000, Kotiyan und Vavia 2000, Patravale et al. 2001).

Analytische Verfahren, die in der Stabilitätsanalytik angewendet werden, sollten validiert und stabilitätsinduzierend sein. Nur die Anwendung selektiver, robuster und reproduzierbarer Verfahren ermöglicht den Fingerprintvergleich über einen längeren Zeitraum.

Die Durchführung von Stabilitätsuntersuchungen im Rahmen der Qualitätskontrolle in der pharmazeutischen Analytik wird unter anderen in der seit Dezember 2002 geltenden Richtlinie CPMP/QWP/122/02 vorgeschrieben. Für Phytopharmaka gilt diese Richtlinie in Verbindung mit den beiden Richtlinien CPMP/QWP/2819/00 und CPMP/QWP/2820/00. In der Qualitätsrichtlinie für Phytopharmaka (CPMP/QWP/2819/00) werden Stabilitätsstudien explizit gefordert.

Eine stabilitätsinduzierende Methode ist gemäß der "Draft Guidance for Industry – Analytical Procedures and Methods Validation (FDA und CDER 2000b) ein "validiertes analytisches Verfahren, das geeignet ist die Veränderungen der relevanten Eigenschaften eines Arzneimittels, die sich mit der Zeit ergeben, anzuzeigen. Mittels eines solchen Verfahrens ist es möglich die Wirksubstanzen zu erfassen, ohne dass Interferenzen mit Abbauprodukten, Verunreinigungen oder Hilfsstoffen auftreten".

In der Phytoanalytik sind leistungsfähige chromatographische Verfahren notwendig, um diese Anforderungen zu erfüllen. In einem pflanzlichen Arzneimittel wird generell der Extrakt in seiner Gesamtheit als die aktive Substanz angesehen. Dabei ist es sekundär, ob in dem Vielstoffgemisch Extrakt einzelne Substanzen mit therapeut-

ischer Wirksamkeit bekannt sind oder nicht. In solchen Fällen werden die arzneimittelrechtlich vorgegebenen Stabilitätsuntersuchungen mit Hilfe von charakteristischen Leitsubstanzen durchgeführt. Hierfür werden meistens HPLC-Methoden verwendet. Sind arzneilich wirksame Substanzen im Extrakt jedoch nicht bekannt, so kann mit Hilfe der HPLC immer nur ein Surrogat-Parameter erhalten werden. Mit Hilfe der DC-Analytik hingegen kann einerseits ein größeres Komponentenspektrum erfasst werden, da auch Substanzen ohne Chromophor in Frage kommen, andererseits wird durch die visuelle Auswertung der dünnschichtchromatographischen Fingerprints der Extrakt sehr viel besser beschrieben und kann mit Referenzchromatogrammen verglichen werden (Abbildung 7-4). Die Implementierung des dünnschichtchromatographischen Profils in einzelne Richtlinien wurde unter 1.1 erläutert.

Durch vergleichende Fingerprintanalytik kann gezeigt werden, dass neben den bekannten Wirksubstanzen auch die unbekannt stabil sind und das Mengenverhältnis der Substanzen untereinander stabil ist. Hierfür ist es sinnvoll Fingerprints, die über den zu betrachtenden Zeitraum erstellt wurden nebeneinander darzustellen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit für die Auswertung der Stabilitätsstudien zweier Phytopharmaka exemplarisch durchgeführt (3.4 und 5.2). Diese Art der Ergebnisdarstellung hat den Vorteil, dass alle Fingerprints miteinander visuell verglichen und Instabilitäten direkt erklärt werden können. Häufig sind leichte Veränderungen in einzelnen Fingerprints zu sehen, die aber keine Instabilitäten des Extraktes anzeigen, sondern einfach auf Robustheitsprobleme während der Durchführung der Chromatographie zurückzuführen sind. In solchen Fällen kommt es zum Tragen, wie sorgfältig im Rahmen der Validierung die Robustheit der Methode überprüft wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte dies anhand der Stabilitätsstudie eines Arzneimittels, das Bärentraubenblätterextrakt enthält, exemplarisch gezeigt werden. Der Vergleich einzelner Fingerprints, die über einen Zeitraum von 24 Monaten nach Lagerung gemäß der Richtlinie CPMP/QWP/556/96 generiert wurden zeigte, dass die Fingerprints miteinander vergleichbar waren in Bezug auf Lage, Farbe und Intensität der Zonen. Der Plattenhintergrund war ebenfalls in Bezug auf die Farbe vergleichbar. In einigen Fingerprints waren jedoch diffuse Zonen zu erkennen. Dies lag daran, dass bei der angewendeten Methode unter anderem mit

einem wässrigen Reagenz derivatisiert wurde. Im Rahmen der Validierung und Methodenentwicklung war belegt worden, dass mit diesem Reagenz das beste dünn-schichtchromatographische Ergebnis erzielt werden konnte und dass trotz optimierter Durchführung der Derivatisierung diese diffusen Zonen auftreten können. Die Evaluierung dünn-schichtchromatographischer Fingerprints kann neben der visuellen Auswertung auch durch densitometrischen Vergleich der Analogkurven erfolgen.

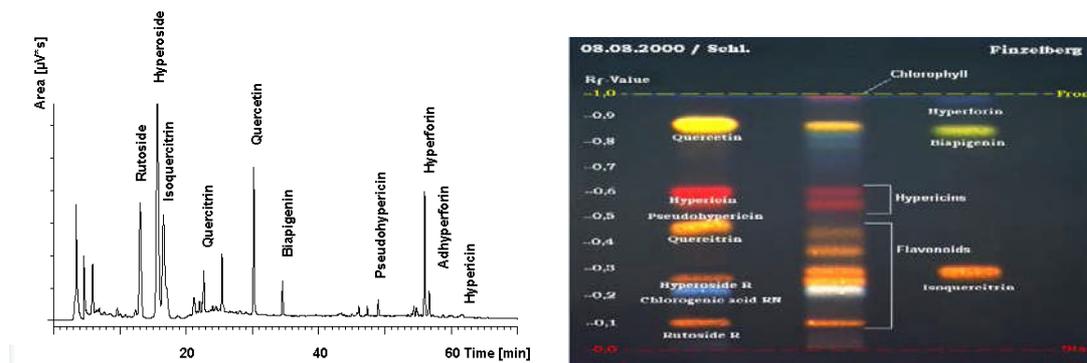


Abbildung 7-4: Fingerprintchromatogramme von Johanniskrautextrakt HPLC versus DC (Fa. Finzelberg GmbH & Co. KG).

Dünnschichtchromatographische Verfahren, die für Stabilitätsstudien eingesetzt werden, sollten so konzipiert sein, dass stabilitätsinduzierende Substanzen analysiert werden (Bakshi et al. 2002). Nur anhand von Substanzen, die Instabilitäten unter bestimmten Bedingungen wie Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsschwankungen oder Lichteinfluss zeigen, lässt sich die Stabilität von Extrakten bzw. Fertigarzneimitteln nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden für die qualitative Stabilitätsanalytik von Phytopharmaka entwickelt. Verfahren zum dünn-schichtchromatographischen Nachweis der Procyanidine in Weißdornblättern mit Blüten und daraus hergestellten Zubereitungen und zum Nachweis von Kaffeoyläpfelsäure in Brennnesselblättern und daraus hergestellten Zubereitungen wurden evaluiert. Beide Verfahren sind für Stabilitätsstudien geeignet, da sowohl die Substanzgruppe der Procyanidine als auch die Substanz Kaffeoyläpfelsäure stabilitätsinduzierend sind.

Procyanidine sind instabil gegenüber Licht- und Sauerstoffeinfluss. Da Procyanidine besonders in Lösung leicht oxidieren, komplexieren bzw. polymerisieren (Stafford und Lester 1980, Putman und Butler 1989, Rohr und Meier 1997, Leipolz 1999), ist eine Stabilitätskontrolle von flüssigen Arzneimitteln unabdingbar. Das Procyanidin - Spektrum einer solchen Zubereitung kann sich während der Lagerung durch die fortschreitende Polymerisierung der Procyanidine sehr verändern (Haslam et al. 1989). So zeigten Krawczyk et al., dass in Weißdornextrakten nach einem Jahr keine Dimere mehr nachzuweisen waren; der Anteil der oligomeren Procyanidine sank, während der Anteil der polymeren Procyanidine zunahm (Krawczyk et al. 1991).

Die in der vorliegenden Arbeit unter verschiedenen Lagerbedingungen durchgeführten Tests auf Stabilität der isolierten Kaffeoyläpfelsäure zeigten, dass Licht den Abbau der Kaffeoyläpfelsäure am stärksten begünstigte. Nach 90 Tagen war bei Tageslicht gelagerte, in methanolischer Lösung vorliegende Kaffeoyläpfelsäure fast vollständig zerfallen. Positiv auf die Stabilität wirkte sich die Lagerung unter Lichtausschluss und Kühlung aus. Als Feststoff gelagerte Kaffeoyläpfelsäure war bei einer Temperatur von -80°C über 5 Monate stabil.

7.4 Quantitative Dünnschichtchromatographie

Für die Evaluierung der quantitativen Dünnschichtchromatographie gibt es generell zwei unterschiedliche Ansätze. Die sogenannten "direkten Methoden", bei denen die getrennten Substanzen direkt in situ auf der Platte evaluiert werden und die sogenannten "indirekten Methoden", bei denen einzelne Zonen von der Platte eluiert werden und anschließend quantitativ vermessen werden (Szepesi und Nyiredy 1992). Die Bedeutung der direkten Auswertung auf der Platte hat in den letzten Jahren immer mehr zugenommen, während die indirekten Methoden heute seltener durchgeführt werden, da sie zeitaufwendig und nur schwer reproduzierbar sind. Die Lage und Größe der zu quantifizierenden Zonen variiert häufig und durch irreversible Absorption kann es zu Fehlern bei der Quantifizierung kommen.

Die direkten Methoden lassen sich in zwei Hauptgruppen aufteilen: die visuelle Auswertung, bei der die Auswertung durch visuellen Vergleich der Intensitäten

einzelner Zonen erfolgt und die densitometrische quantitative Auswertung, bei der die Quantifizierung direkt in situ auf der Platte durch Absorptionsmessung erfolgt.

Die semi-quantitative Auswertung wird in vielen Monographien des europäischen Arzneibuches im Rahmen der Reinheitsprüfungen beschrieben (zum Beispiel Holunderblüten, Faulbaumrinde, Rhabarberwurzel, dreilappiger Salbei). Die visuelle Auswertung erfolgt durch den Vergleich der Intensitäten einzelner Zonen.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einer vergleichenden Studie acht Fertigarzneimittel des deutschen Marktes dünnschichtchromatographisch untersucht und semi-quantitativ ausgewertet. Der visuelle Vergleich der Fingerprints verschiedener Chargen der Fertigarzneimittel zeigte deutliche Unterschiede in der Intensität der Zonen. Dieses Ergebnis lässt einen unterschiedlichen Gehalt an Procyanidinen in den einzelnen Chargen der Arzneimittel vermuten. Untersuchungen der selben Fertigarzneimittel die auch in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden mittels HPLC-Analytik, ergaben ebenfalls quantitative Unterschiede im Gesamtgehalt an Procyanidinen und im jeweiligen Spektrum der Mono- bis Trimeren Procyanidine (Wittig et al. 2002). Die Arbeiten von Vierling et al. zeigten jedoch, dass diese Unterschiede im Procyanidingehalt keinen signifikanten Einfluss auf die pharmakologische Wirkung der Arzneimittel zu haben (Vierling et al. 2000). Dies könnte sich aus der großen Breite von Weißdornzubereitungen erklären, und daraus, dass die pharmakologische Qualität von Weißdornzubereitungen nicht nur durch die Procyanidine bestimmt wird, sondern auch durch andere Inhaltsstoffe wie Flavonoide und weitere Polyphenole (Rohr und Meier 1997).

Die densitometrische Auswertung der quantitativen Dünnschichtchromatographie wird heute primär in der Analytik von chemisch definierten Substanzen eingesetzt (Saelzer et al. 2001, Renger et al. 1995). In der Phytoanalytik ist die Quantifizierung einzelner Substanzen komplizierter, da es sich bei den Analysen um Vielstoffgemische handelt und Interferenzen mit der komplexen Matrix nie auszuschließen sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur quantitativen Hydrochinonbestimmung in Fertigarzneimitteln, die Bärentraubenblätterextrakt enthalten, entwickelt und validiert. Die Validierung erfolgte in Anlehnung an die EU-Richtlinien CPMP/ICH 381/95, Q2A und CPMP/ICH 281/95, Q2B und unter Berücksichtigung der bestehenden Validierungskonzepte für analytische Verfahren

allgemein und die quantitative DC speziell (Rampazzo 1990, Szepesi 1993a, Ferenczi-Fodor et al. 1993). Die einzelnen Konzepte wurden unter 7.2 näher erläutert.

Im Rahmen der Validierung wurden in der vorliegenden Arbeit neben Selektivitäts- und Robustheitsprüfungen die Parameter Linearität, Vergleichspräzision, Wiederholpräzision und Richtigkeit überprüft. Für die Linearität wurde ein Korrelationskoeffizient (r) von $r=0,987$ ermittelt; für die Präzision ergaben sich Variationskoeffizienten von $CV = 8 \%$ (Vergleichspräzision) und $CV = 1,97 \%$ (Wiederholpräzision). Vergleichend dazu wurden bei der quantitativen Hydrochinonbestimmung mittels HPLC für die Präzision Variationskoeffizienten zwischen 2 und 7 % ermittelt (interne Daten der Firma Fujisawa Deutschland).

Im Vergleich zu allgemein anerkannten Standards bei der Analyse chemisch definierter Substanzen ($CV = 1-2 \%$) sind die ermittelten Präzisionswerte hoch (FDA und CDER 1994). Der Vergleich ist jedoch nicht ganz zulässig, da die Analyse pflanzlicher Zubereitungen eher mit der Analyse human- oder tierbiologischer Proben vergleichbar ist. So führt in beiden Bereichen der Analytik die Komplexität der Matrix häufig zu Interferenzen mit dem zu bestimmenden Analyten. Des Weiteren können in diesen Stoffgemischen chemische oder enzymatische Reaktionen ablaufen, die das Analyseergebnis beeinflussen. Im Gegensatz zur Bioanalytik, bei der neuere Richtlinien - Entwürfe größere Spannen für Präzision und Richtigkeit zulassen (FDA und CDER 1998), existieren solche sinnvoll aufgeweiteten Richtwerte für die Phytoanalytik nicht.

Dass die Präzisionswerte bei der Analyse von Pflanzenextrakten unabhängig von dem Verfahren (HPLC / DC) stark schwanken können, zeigten auch andere Arbeiten zur Validierung von Phytopharmaka. Für die Procyanidinbestimmung in Weißdornextrakten mittels HPLC ermittelte Rehwald Variationskoeffizienten zwischen 5 und 10 % und Wittig zwischen 2 und 5 % (Rehwald 1995, Wittig 2001). Für die quantitative dünnschichtchromatographische Bestimmung von Harpagosid in den Wurzeln der Teufelskralle wurden für die Präzision Werte zwischen $CV = 1,34$ und $6,02$ ermittelt (Poukens-Renwart et al. 1996); für die Bestimmung der Terpenlactone in Ginkgo biloba ermittelten Peishan et al. Variationskoeffizienten zwischen $CV = 1,9$ und $3,1 \%$ für die Dünnschichtchromatographie (Peishan et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit

wurde für das Hydrochinon in dem Fertigarzneimittel eine Wiederfindung von ca. 91-95 % ermittelt. Für die Wiederfindung von Procyanidinen in Weißdorn mittels HPLC ermittelten Svedstrom und Mitarbeiter 91–97 % (Svedstrom et al. 2002). Auch diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Quantifizierungen einzelner Substanzen in Extrakten vielen Einflüssen durch andere Inhaltsstoffe oder Matrixeffekte unterliegen.

Für die Phytoanalytik ist es sinnvoll, Validierungskonzepte zu entwickeln, in denen die geltenden Richtlinien so umgesetzt werden, dass den Besonderheiten der Phytopharmaka Rechnung getragen wird. Die Validierungsparameter sollten kritisch bewertet werden und vom Analytiker an die Praxis angepasst sein. So kann es zum Beispiel sinnvoll sein zur Erfassung der Präzision einer Methode mehr als die empfohlenen sechs Bestimmungen durchzuführen.

8 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erarbeitung eines **Qualitätsstandards in der Qualitätsanalytik von Phytopharmaka** unter Anwendung **standardisierter Dünnschichtchromatographie (DC)**. Methodenentwicklung und –optimierung in der DC wurden exemplarisch bearbeitet. Anhand der Beispiele Bärentraubenblätter, Weißdornblätter mit Blüten, Traubensilberkerzenwurzelstock und Brennnesselblätter wurden die Vorgehensweisen erläutert und spezielle Problemstellungen bearbeitet. Für das Verfahren qualitative Dünnschichtchromatographie wurde anhand der ausgewählten Beispiele ein **Validierungskonzept für die qualitative DC** erarbeitet. Für die bearbeiteten Drogenbeispiele wurden exemplarisch Monographien entworfen, die neben den neu entwickelten dünn-schichtchromatographischen Verfahren, Strukturformeln wichtiger Inhaltsstoffe und Beispiel-Chromatogramme enthalten.

Bärentraubenblätter und daraus hergestellte Zubereitungen

Ein Verfahren zum qualitativen dünn-schichtchromatographischen Nachweis der Inhaltsstoffe **Arbutin, Gallussäure und Hydrochinon** in Bärentraubenblättern, daraus hergestellten Extrakten und Fertigarzneimitteln wurde erarbeitet. Ausgehend von der Methode der Monographie "Bärentraubenblätter" der Ph. Eur. (Ph. Eur. 4.00) wurden die Parameter Fließmittel, Referenzsubstanzen, Derivatisierungsreagenzien, Plattenmaterial, Trennstrecke, Entwicklungskammer und Probenaufarbeitung optimiert. Im Rahmen der Validierung wurde die **Selektivität für die Identitätsprüfung eines Fertigarzneimittels**, das Bärentraubenblätterextrakt als Wirkstoff enthält nachgewiesen. Hierfür wurden Proben der Droge, des daraus hergestellten Extrakts, des Arzneimittels, das diesen Extrakt enthält und der verwendeten Hilfsstoffe parallel auf einer HPTLC-Platte chromatographiert. Die Selektivität wurde durch vergleichende Fingerprintanalytik belegt. Im Rahmen der **Robustheitsprüfungen** wurde die **Stabilität des Arzneimittels während der Chromatographie**

durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Die **Reproduzierbarkeit** des Verfahrens wurde anhand von **Ringversuchen**, die in verschiedenen Labors durchgeführt wurden, belegt.

Die validierte Methode wurde für **Stabilitätsuntersuchungen** eingesetzt. Die Stabilität eines Fertigarzneimittels, das Bärentraubenblätterextrakt enthält wurde über einen Zeitraum von 24 Monaten nachgewiesen. Proben des Arzneimittels wurden unter den Klimabedingungen 25°C/60 % relative Feuchte, 30°C/60 % relative Feuchte und 40°C/75 % relative Feuchte in Klimaschränken eingelagert, zu den Prüfzeitpunkten 3, 6, 9, 12, 18 und 24 Monate ausgelagert und dünnschichtchromatographisch untersucht. Die Darstellung der einzelnen Fingerprints nebeneinander ermöglichte die direkte visuelle Auswertung mit dem Startchromatogramm. Für die quantitative Hydrochinonbestimmung in einem Arzneimittel, das Bärentraubenblätterextrakt enthält wurde ein quantitatives dünnschichtchromatographisches Verfahren entwickelt. Im Rahmen der Validierung dieses Verfahrens wurden die Parameter Selektivität, Nachweisgrenze, Linearität, Präzision und Richtigkeit überprüft.

Weißdornblätter und daraus hergestellte Zubereitungen

Es wurde ein dünnschichtchromatographisches Verfahren zum qualitativen Nachweis der Flavonoide, der oligomeren- und der polymeren Procyanidine in Weißdornblättern mit Blüten und daraus hergestellten Extrakten und Fertigarzneimitteln entwickelt. Im Rahmen dieser Methodenentwicklung konnte exemplarisch gezeigt werden, dass die Probenaufarbeitung ein entscheidender Schritt in der DC ist und wesentlich dazu beitragen kann, einzelne Substanzen dünnschichtchromatographisch zu trennen. Im Rahmen der Validierung wurde die Selektivität des Verfahrens anhand der Droge, dem daraus hergestellten Extrakt und dem entsprechenden Fertigarzneimittel nachgewiesen. Durch vergleichende Fingerprintanalytik wurde neben der Selektivität auch der "rote Faden" in der Herstellung belegt. Robustheitsprüfungen dieses Verfahrens waren während der Methodenentwicklung durchgeführt worden.

Mit dem neu entwickelten Verfahren wurde eine vergleichende Untersuchung von acht Arzneimitteln des deutschen Marktes, die Extrakt aus Weißdornblättern mit Blüten enthalten, durchgeführt. Qualitativ waren alle Arzneimittel hinsichtlich ihrer Fingerprints gleich zu bewerten. Die semi-quantitative Auswertung der Chromatogramme ergab Hinweise auf quantitative Schwankungen im Flavonoid- und Procyanidingehalt einzelner Chargen.

Traubensilberkerzenwurzelstock und daraus hergestellte Zubereitungen

Ein dünnschichtchromatographisches Verfahren zur Identitätsprüfung der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock, des daraus hergestellten Extrakts und der Fertigarzneimittel, die diesen Extrakt als aktive Substanz enthalten, wurde entwickelt, optimiert und validiert. Die Identifizierung erfolgte anhand der Triterpenglykoside **Actein und 27-Deoxyactein**. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde eine Fließmitteloptimierung durchgeführt. Es konnte exemplarisch gezeigt werden, dass die Anwendung des **“Camag-Optimierungsschemas“** bei strukturiertem Arbeiten unkompliziert und wenig zeitaufwendig ist. Im Rahmen der Validierung wurde die **Selektivität der Identitätsprüfung für die Droge, für den Extrakt und für das Arzneimittel** nachgewiesen. Die Identifizierung des authentischen Drogenmaterials wurde durch **vergleichende Fingerprintanalytik mit bekannten Verfälschungen und Verunreinigungen der Droge** durchgeführt. Im Rahmen der Robustheitsuntersuchungen wurde die Stabilität der authentischen Droge in Lösung, auf der Platte und während der Chromatographie durch zweidimensionale DC nachgewiesen. Veränderungen der Chromatographie durch Änderungen der Parameter Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Fließmittelstabilität, Laufstrecke, Stabilität des Derivatisierungsreagenzes, Trocknungszeiten und Wartezeiten wurden untersucht und dokumentiert. Die Reproduzierbarkeit wurde durch Vergleich der R_f -Werte von 10 Chromatogrammen über einen Zeitraum von 5 Monaten nachgewiesen.

Die validierte Methode wurde für **Stabilitätsuntersuchungen** eingesetzt. Die Stabilität eines Fertigarzneimittels, das Traubensilberkerzenwurzelextrakt als aktive Substanz enthält wurde über einen Zeitraum von 18 Monaten nachgewiesen. Proben

des Arzneimittels wurden unter den Klimabedingungen 25°C/60 % relative Feuchte, 30°C/60 % relative Feuchte und 40°C/75 % relative Feuchte in Klimaschränken eingelagert, zu den Prüfzeitpunkten 3, 6, 9, 12 und 18 Monate ausgelagert und dünnschicht-chromatographisch untersucht. Für die visuelle Auswertung wurden die einzelnen Fingerprints nebeneinander dargestellt.

Ein zweites Verfahren zur **Identifizierung der Droge und den daraus hergestellten Zubereitungen anhand der Hydroxyzimtsäurederivate** wurde entwickelt. Im Rahmen der Methodenentwicklung konnte die Substanz **Isoferulasäure** im Inhaltsstoffspektrum der Droge, des Extrakts und des Arzneimittels identifiziert werden. Damit einhergehend wurde der Nachweis geführt, dass **Formononetin nicht im Inhaltsstoffspektrum** zu finden ist. Die Validierung erfolgte analog der Validierung des Verfahrens zum Nachweis der Triterpenglykoside.

Brennnesselblätter und daraus hergestellte Zubereitungen

Ein Verfahren zum qualitativen dünnschichtchromatographischen Nachweis der Inhaltsstoffe **Scopoletin, Kaffeoyläpfelsäure und Chlorogensäure** in Brennnesselblättern, daraus hergestellten Extrakten und Fertigarzneimitteln wurde erarbeitet. **Kaffeoyläpfelsäure wurde aus frischem Kraut von *Urtica dioica* isoliert** und spektrometrisch identifiziert. Kaffeoyläpfelsäure wurde als Referenzsubstanz ausgewählt, da sie die phenolische Hauptkomponente der Blätter von *U. dioica* ist. Durch die neu entwickelte Methode wurden nicht nur einzelne Inhaltsstoffe identifiziert, sondern auch der Extrakt in seiner Gesamtheit anhand eines charakteristischen Fingerprints.

Im Rahmen der Validierung wurde eine Prüfung der **Drogenausgangsmaterialien** "starting materials" durchgeführt. Durch vergleichende Fingerprintanalytik konnte gezeigt werden, dass das Pflanzenmaterial aus Bulgarien ein abweichendes Inhaltsstoffmuster zu den Pflanzen anderer Länder aufwies. Es wurde belegt, dass die Identitätsprüfung der Droge so selektiv ist, dass **Verunreinigungen mit *Lamium album*** differenziert werden können. Die Selektivitätsprüfung der Identitätsprüfung des Extrakts und des Fertigarzneimittels erfolgte für einen isopropanolischen Extrakt

und für einen ethanolischen Extrakt und die entsprechenden Arzneimittel. Es wurde belegt, dass das Verfahren für den ethanolischen Extrakt und das Arzneimittel selektiv war, nicht aber für den isopropanolischen Extrakt. Für den Identitätsnachweis dieses Extraktes müsste ein neues Verfahren entwickelt werden.

Das Verfahren wurde validiert; es wurden die Parameter Stabilität des Analyten während der Chromatographie, Fließmittelstabilität und Stabilität der Fluoreszenz überprüft.

Das validierte Verfahren wurde angewendet, um **die offiziellen Brennnesselarten *Urtica dioica* und *Urtica urens* anhand ihrer Fingerprints zu differenzieren.**

Die erarbeiteten Ergebnisse wurden in **Qualitätssicherungsdokumenten** für eine **virtuelle "Firma Muster"** zusammengefasst. Diese Dokumentvorlagen sind für den Bereich Dünnschichtchromatographie erstellt worden und so konzipiert, dass sie in jedes Qualitätssicherungssystem implementiert werden können.

9 Literatur

AHP (2002). Monographie "Black Cohosh Rhizome", Herbal Pharmacopeia and Therapeutic Compendium, Santa Cruz.

Amborn, J., Anhalt, E., Braun-Neubrand, U., Glöckl, I., Goßler, G., Hermening, P., Holzkamp, G., Kaltenbach, M., Klein, M., Lotze, U., Lorenzen, S., Pamperin, D., Schiemann, U., Schwarm, H. M., Veit, M. und Wittig, J. (2001). Qualitätssicherung – Handbuch Validierung analytischer Verfahren. Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller e.V., 1. Auflage.

AOAC Peer-Verified Methods Program (1998), AOAC International.

Bakshi, B. und Singh, S. (2002). "Development of stability-indicating assay methods-critical review". J Pharm Biomed Anal 28: 1011-1040.

BfArM (1996). Bekanntmachung über die Zulassung von Arzneimitteln vom 31. Oktober 1996. Bundesanzeiger 44a.

Bauer, I. und Hölscher, U. (1992). "Crataegus". In: Blaschek, W., von Bruchhausen, F., Ebel, S., Hackenthal, E., Hänsel, R., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., Rimpler, H., Schneemann, H., Schneider, G., Wurm, G. "Hagers Handbuch", Band 4, Drogen A-K, Springer Verlag, 5. Auflage: 1040-1059.

Beuscher, N. (1995). "*Cimicifuga racemosa* L. - Die Traubensilberkerze". Zeitschrift für Phytotherapie 16: 301-310.

Beuscher, N. (1998). "Cimicifuga". In: Blaschek, W., von Bruchhausen, F., Ebel, S., Hackenthal, E., Hänsel, R., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., Rimpler, H., Schneemann, H., Schneider, G., Wurm, G. "Hagers Handbuch", Folgeband 2, Drogen A-K, Springer Verlag, 5. Auflage: 369-381.

Billeter, M., Meier, B. und Sticher, O. (1990). "Densitometric Determination of Flavonoids after Derivatisation". J of Planar Chromatogr 3: 370-375.

Blatter, A. (2001) "Optimierung der dünnschichtchromatographischen Identitätsprüfung von Hyperici herba Ph. Eur. und Versuche zur Quantifizierung von Hypericin und Hyperforin". Diplomarbeit, Universität Basel.

Botanicals International (2000), Standard operating Procedure "Identification of Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by Thin Layer Chromatography".

British Herbal Pharmacopeia (1996). Monographie "Black Cohosh". British Herbal Medicine Association: 36-37.

Carr, G. P. und Wahlich, J. C. (1990). "A pharmaceutical approach to method validation in pharmaceutical analysis". J Pharm Biomed Anal 8: 613-618.

Chaurasia, N. und Wichtl, M. (1987). "Sterol and steryl glycosides from *Urtica dioica*". J Nat Prod 50: 881.

CPMP (1989). "Note for Guidance on Stability Testing: Stability testing of Existing Active Substances and Related Finished Products", (CPMP/QWP/556/96), London.

CPMP (2002). "Note for Guidance on Stability Testing: Stability testing of Existing Active Substances and Related Finished Products", (CPMP/QWP/122/02), London.

CPMP und ICH (2001). "Note for Guidance on specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Herbal Drugs, Herbal Drug Preparations and Herbal Medicinal Products", (CPMP/QWP/2820/00), London.

CPMP und ICH (2001). "Note for Guidance on quality of Herbal Medicinal Products", (CPMP/QWP/2819/00), London.

Dallenbach-Toelke, K., Nyiredy, S., Meier, B. und Sticher O. (1986). "Optimization of overpressured layer chromatography of polar, naturally occurring compounds by the "Prisma" model". J Chromatogr 365: 63-72.

Deutsches Arzneibuch, DAB 10 (2. Nachtrag 1993). Monographie "Brennesselblätter". Deutscher Apotheker Verlag.

Dücker, E., Kopanski, L., Jarry, H. und Wuttke, W. (1991). "Effects of extracts from *Cimicifuga racemosa* on gonadotropin release in menopausal women and ovariectomized rats". Planta Med 57: 420-425.

Edwardson, P. A. D., Bhaskar, G. und Fairbrother, J. E. (1990). "Method validation in pharmaceutical analysis". J Pharm Biomed Anal 8: 929-933.

EMEA (1999). "Notice to Applicants". Vol. 2B Part IIC und IIF. London.

European Scientific Cooperative on Phytopharmaka (ESCOP), (1997) Monographie: "Bearberry Leaf", Fascicule 5.

European Scientific Cooperative on Phytopharmaka (ESCOP), (1999), Monographie: "Hawthorn Leaf and Flower", Fascicule 6.

European Scientific Cooperative on Phytopharmaka (ESCOP) (1997), Monographie: "Nettle Leaf and Herb", Fascicule 4.

- Europäisches Arzneibuch** (2002). Monographie "Bärentraubenblätter". Deutscher Apotheker Verlag (4.00).
- Europäisches Arzneibuch** (2002). Monographie "Dünnschichtchromatographie". Deutscher Apotheker Verlag (4.00).
- Europäisches Arzneibuch** (2002). Monographie "Weißdornblätter mit Blüten". Deutscher Apotheker Verlag (4.00).
- FDA** und CDER (1994). Reviewer Guidance: "Validation of Chromatographic Methods", Rockville.
- FDA** und CDER (1998). Guidance for Industry (Draft): "Bioanalytical Methods Validation for Human Studies", Rockville.
- FDA** und CDER (2000a). Guidance for Industry (Draft): "Botanical Drug Products", Rockville.
- FDA** und CDER (2000b). Guidance for Industry (Draft): "Analytical Procedures and Methods Validation", Rockville.
- Ferenczi-Fodor, K.**, Vegh, Z. und Pap-Sziklay Z. (1993). "Validation of the Quantitative Planar Chromatographic Analysis of Drug Substances. 1: Definitions and Practice in TLC". J Planar Chromatogr 6: 198-203.
- Ferenczi-Fodor, K.**, Vegh, Z. Nagy-Turak, A., Renger, B. und Zeller, M. (2001). "Validation and Quality Assurance of Planar Chromatographic Procedures in Pharmaceutical Analysis". J AOAC Internat 84: 1258-1264.
- Frank, B.**, Bohn I. und Uehleke. B. (1998). "Urtica". In: Blaschek, W., von Bruchhausen, F., Ebel, S., Hackenthal, E., Hänsel, R., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., Rimpler, H., Schneemann, H., Schneider, G. und Wurm, G. "Hagers Handbuch", Folgeband 3, Drogen L-Z, Springer Verlag, 5. Auflage: 710-736.
- Frey, H. P.** und Zielhoff K. (1993). "Qualitative und Quantitative Dünnschichtchromatographie". VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Gaedcke F.** (2000). "Qualitätssicherung von Phytopharmaka". In: Gaedcke, F. und Steinhoff, B. Phytopharmaka, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart: 37-66.
- Galand, N.**, Pothier, J. und Viel, C. (2002). "Plant Drug Analysis by Planar Chromatography". J Chromatogr Sci 40: 585-597.

- Geiss, F.** (1987). "Fundamentals of Thin - Layer Chromatography", Hüthig Verlag, Heidelberg.
- Glajch J. L.,** Kirkland J. J. und Snyder L. R. (1982). "Practical optimization of solvent selectivity in liquid-solid chromatography using a mixture design statistical technique". J Chromatogr 238: 269-280.
- Green, J. M.** (1996). "A Practical Guide to Analytical Method Validation". Anal Chem 68: 305A-309A.
- Hänsel, R.,** Sticher, O. und Steinegger, E. (1999). In: Pharmakognosie – Phytopharmazie. 6. Auflage, Springer Verlag: 518-519, 788-791, 844-849.
- Hagels, H.,** Baumert-Krauss, J. und Freudenstein, J. (2000). "Composition of Phenolic Constituents in *Cimicifuga racemosa*". In: Abstracts of Lectures, Workshops and Posters of the 48th Annual Congress of GA, Zürich.
- Harnischfeger, G.** und Cilien, N. (1996). "Influence of *Cimicifuga racemosa* extract fractions on the proliferation of human carcinoma cells in vitro with regard to their estrogen receptor sensitivity". In: Abstracts of the 44th Annual Congress of GA, Prag.
- Haslam, E.,** Lilley, T. H., Cai, Y., Martin, R. und Magnolato, D. (1989). "Traditional Herbal Medicines – the role of polyphenols". Planta Med 55:1.
- Hözl, J.** und Strauch, A. (1977). "Untersuchungen zur Biogenese der oligomeren Procyanidine von *Crataegus*". Planta Med 32: 141-153.
- Holubarsch, C. J.,** Colucci, W. S., Meinertz, T., Gaus, W. und Tendera, M. (2000). "Survival and prognosis: investigation of *Crataegus* extract WS 1442 in cognitive heart failure (Spice)-rationale, study design and study protocol". Eur J Heart Fail 2: 431-437.
- ICH** (1995). "Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology". (Q2A).
- ICH** (1996). "Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology". (Q2B).
- Jarry, H.** und Harnischfeger, G. (1985a). "Endocrine effects of constituents of *Cimicifuga racemosa*. 1. The on serum levels of pituitary hormones in ovariectomized rats". Planta Med 1: 46-49.

- Jarry, H.**, Harnischfeger, G. und Dücker, E. (1985b). "Untersuchungen zur endokrinen Wirksamkeit von Inhaltsstoffen aus *Cimicifuga racemosa* 2. *in vitro*-Bindung von Inhaltsstoffen an Östrogenrezeptoren". *Planta Med* 4:316-319.
- Jork, H.**, Funk, W., Fischer, W. und Wimmer, H. (1990). "Thin-Layer Chromatography – Reagents and Detection Methods". 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Jork, H.**, Funk, W., Fischer, W. und Wimmer, H. (1992). "Thin-Layer Chromatography – Physical and Chemical Detection Methods". 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Kaul, R.** (1996). "Pflanzliche Procyanidine - Vorkommen, Klassifikation und pharmakologische Wirkungen". *Pharmazie in unserer Zeit* 25: 175-185.
- Kenelly, E. J.**, Baggett, S., Nuntanakorn, P., Ososki, A. L., Mori, S. A., Duke, J., Coleton, M. and Kronenberg, F. (2002). "Analysis of thirteen populations of Black Cohosh for formononetin". *Phytomedicine* 9: 461-467.
- Kirchner, J. G.**, Miller, J. M. und Keller, G. J. (1951). "Separation and Identification of Some Terpenes by New Chromatographic Technique". *Anal Chem* 23: 420-425.
- Kommission E** (1994). Monographie "Bärentraubenblätter". *Bundesanzeiger* 109.
- Kommission E** (1987). Monographie "Brennesselkraut / Brennesselblätter". *Bundesanzeiger* 70.
- Kommission E** (1989). Monographie "Cimicifugawurzelstock". *Bundesanzeiger* 43.
- Kommission E** (1994). Monographie "Weißdornblätter mit Blüten". *Bundesanzeiger* 133.
- Kotiyan P. N.** und Vavia P. R. (2000). "Stability indicating HPTLC method for the estimation of estradiol". *J Pharm Biomed Anal* 22: 667-671.
- Kraus, L.** (1974). "Einfacher Nachweis des Methyларbutins in Folia Uvae Ursi mit dem TAS-Verfahren". *Dtsch Apoth Ztg* 114: 1423-1424.
- Kraus, L.**, Koch, A. und Hofstetter-Kuhn, S. (1995). *Dünnschichtchromatographie*. Springer Verlag.
- Krawczyk, U.**, Petri, G. und Kery A. (1991). "HPLC analysis of procyanidines in *Crataegus abstracts*". *Arch Pharm* 324: 97-99.

- Kruse, S. O.**, Löhning, A. Pauli, G. F., Winterhoff, H. und Nahrstedt, A. (1999). "Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* and the in vitro estrogenic activity of fukinolic acid". *Planta Med* 65:763-764.
- Kulkarni S. P.** und Amin P. D. (2000). "Stability indicating HPTLC determination of trinolol malate as bulk drug and in pharmaceutical preparations". *J Pharm Biomed Anal* 23: 983-987.
- Leipolz, I.** (1999). "Quantifizierung von Procyanidinen und Flavonoiden in Weißdorn Präparaten". Diplomarbeit. Würzburg, Julius- Maximilians-Universität.
- Liu, J.**, Burdette, J. E., Xu, H., Gu, C., van Breemen R. B., Bath, K. P., Booth N., Constantinou A. L., Pezzuto, J. M., Fong, H. H., Farnsworth N. R. und Bolton J. L. (2001a). "Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms". *J Agric Food Chem* 49: 2472-2479.
- Liu, J.**, Yang. Z., Zhu, M. und Huo, J., (2001b). "Estrogenicity of black cohosh (*cimicifuga racemosa*) and its effect on estrogen receptor level in human breast cancer MCF-7 cells". *Weisheng Yanjiu* 30: 77-80.
- Lutomski, J.** und Speichert, H. (1983). "Die Brennessel in Heilkunde und Ernährung". *Pharm Unserer Zeit* 12: 181-186.
- Mc Murrough, I.** (1978). "Chromatographic separation and automated analysis of flavanols". *Anal Biochem* 91: 92.
- Nagell, A.** (1987). "Qualitätssicherung von Arzneidrogen". *Dtsch Apoth Ztg* 127: 7-10.
- Nahrstedt, A.** (1984). "Zum Reaktionsprodukt der quantitativen Arbutinbestimmung in Bärentraubenblättern nach DAB 8". *Dtsch Apoth Ztg* 124: 322-324.
- Nesselhut, T.**, Schellhaus, C., Deitrich R. und Kuhn, W. (1993). "Studies on mamma carcinoma cells regarding the proliferation potential of herbal medication with estrogen-like effects". *Archives of Gynaecology and Obstetrics* 254: 817-818.
- Nyiredy, S.**, Erdelmeier C. A. J., Meier, B. und Sticher O. (1985). "PRISMA Ein Modell zur Optimierung der mobilen Phase für die DC, vorgestellt anhand verschiedener Naturstofftrennungen". *Planta Med* 51: 241-246
- Nyiredy, S.**, Dallenbach-Toelke, K. und Sticher O. (1988). "The "Prisma" Optimization system in Planar Chromatography". *J. Planar Chromatogr* 1: 336-342

- Nyiredy, S.** (2001). "The Role of Planar Chromatography in Medicinal Plant Research". J AOAC Internat. 84 (4): 1219-1231.
- Nyiredy, S.** (2002). "Planar Chromatographic Development Using The PRISMA Optimization System and Flow Charts". J Chromatogr Sci 40: 553-563.
- Pachaly, P.** (1995). "DC-Atlas; Dünnschichtchromatographie in der Apotheke". Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Paper, D. H.,** Koehler, J. und Franz, G. (1993). "Bioavailability of drug preparations containing a leaf extract of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengl. (*Uvae ursi folium*)". Pharm Pharmacol Lett 3: 63-66.
- Patravale, V. B.,** Nair, V. B. und Gore, S. P. (2000). "High Performance Thin Layer chromatographic determination of lignocaine hydrochloride and phenylephrine hydrochloride by HPTLC". J Pharm Biomed Anal 23: 623-627.
- Patravale, V. B.,** D'Souza, S. und Narkar, Y. (2001). "HPTLC determination of nimesulfide from pharmaceutical dosage forms". J Pharm Biomed Anal 25: 685-688.
- Peishan, X.,** Yuzhen, Y., Haoquan, Q. und Qlaoling, L. (2001). "Fluorophotometric Thin-Layer Chromatography of *Ginkgo* Terpenes by Postchromatographic Thermochemical Derivatization and Quality Survey of Commercial *Ginkgo* Products". J AOAC Internat 84 (4): 1232-1241.
- Pharmeuropa** (2002). Monographievorschlag "Black Cohosh". Pharmeuropa 14.2: 353-355.
- Pharmeuropa** (2002). Monographievorschlag "Nettle Leaf". Pharmeuropa 14.1: 142-144.
- Pharmeuropa** (2003). Monographievorschlag "Nettle Leaf". Pharmeuropa 15.3: 522-524.
- Poole, C. F.** und Dias, N. C. (2000). "Practitioner's guide to method development in thin-layer chromatography". J Chromatogr A 892: 123-142.
- Poukens-Renwart, P.,** Tits, M. und Angenot, L. (1996). "Quantitative Densitometric Evaluation of Harpagoside in the Secondary Roots of *Harpagophytum procumbens* D. C.". J Planar Chromatogr 9: 199-202.
- Putman, L. J.** und Butler L. G. (1989). "Separation of High Molecular Weight Sorghum Procyanidines by High-Performance Liquid Chromatography". J Agric Food Chem 37: 943-946.

- Ramm, S.** und Hansen, C. (1995). "Brennnesselblätter-Extrakt bei rheumatischen Beschwerden". Dtsch Apoth Ztg 135: 3-8.
- Ramm, S.** und Hansen, C. (1997). "Brennnesselblätter-Extrakt: Wirksamkeit und Verträglichkeit bei Arthrose und rheumatoider Arthritis". In: Chrubasik, S. und Wink, M. "Rheumatherapie mit Phytopharmaka". Hippokrates Verlag Stuttgart: 97-106.
- Rampazzo, P.** (1990). "Standardisation and Validation of Analytical Methods in the Pharmaceutical Industry". Il Farmaco 45: 807-815.
- Rehwald, A.** (1995). "Analytical Investigation of Crataegus species and Passiflora incamata L. High-Performance Liquid Chromatography". Dissertation. Zürich, ETH.
- Reich, R.,** Blatter, A., Jorns, R., Kreuter, M. und Thiekötter, K. (2002). "An AOAC Peer-Verified Method for Identification of *Echinacea Species* by HPTLC". J Planar Chromatogr 15: 244-251.
- Reich, E.** und George, T. (1997). "Method development in HPTLC". J Planar Chromatogr 10: 273-280.
- Reich, E.** und Blatter, A. (2003a). "HPTLC for the Analysis of Herbal Drugs, Herbal Drug Preparations and Herbal Medicinal Products". In: Sherma, J. und Fried, B. Handbook of Thin Layer Chromatography, 3rd Edn, Chapter 7, Verlag Dekker, New York.
- Reich, E.,** Blatter, A. und Meier B. (2003b). "TLC for the Analysis of Herbal Drugs – A Critical Review of the Status and Proposal for Improvement of Monographs". Pharmeuropa 15.3: 424-430.
- Renger, B.,** Jehle, H., Fischer, M. und Funk, W. (1995). "Validation of Analytical Procedures in Pharmaceutical Analytical Chemistry: HPTLC Assay of Theophylline in an Effervescent Tablet". J Planar Chromatogr 8: 269-278.
- Rice-Evans, C. A.,** Miller, N. J. und Paganga, G. (1997). "Antioxidant properties of phenolic compounds". Trends in Plant Science 2: 152-159.
- Rohr, G.** und Meier, B. (1997). "Crataegus – Pharmazeutische Qualität und Wirksamkeit". Dtsch Apoth Ztg 137: 3740-3752.
- Rohr, G.** (1999). Analytical Investigation on and Isolation of Procyanidines from Crataegus Leaves and Flowers". Dissertation No. 13020. Zürich, ETH.
- Rothmaler S.,** Schubert, R. und Vent, W. (1988). "Exkursionsflora". Band 4, Kritischer Band. Berlin, Volk und Wissen Verlag: 140-141.

- Saelzer, R.**, Dodoy, G., Vega, M., De Diego, M., Godoy, R. und Rios, G. (2001). "Instrumental Planar Chromatographic Determination of Benzodiazepines: Comparison with Liquid Chromatography and Gas Chromatography". *J AOAC Internat* 84 (4): 1287-1295.
- Schmid, A.** (2000). "Einsatz neuer DC-Techniken (Video Store) zur Dokumentation von Phytopharmaka am Beispiel Baldrian". Diplomarbeit, Universität Basel.
- Schomakers, J.**, Bollbach, F. D. und Hagels, H. (1995). "Brennnesselkraut; Phytochemische und anatomische Unterscheidung der Herba-Drogen von *Urtica dioica* und *U. urens*". *Dtsch Apoth Ztg* 135: 578-584.
- Siegers, C. P.**, Siegers J. P., Pentz, R., Bodinet, C. und Freudenstein, J. (1997). "Metabolism of Arbutin in *Uvae Ursi* – extracts in humans". *Pharm Pharmacol Lett* 7 (2/3): 90-92.
- Snyder, L. R.** (1971). "Solvent selectivity in adsorption chromatography in alimina. Non-donor solvents and solutes". *J Chromatogr* 63: 15-44.
- Snyder, L. R.** (1978). "Classification of the solvent properties of common liquids". *J Chromatogr.Sci.* 16: 223-234.
- Stafford, F. A.** und Lester, H. H. (1980). "Procyanidins condensed tannins in green cell suspension cultures of Douglas-fir (*Pseusotsuga*) compared with those in strawberry (*Fragaria chiloensis* var. *ananassa*) and avocado (*Persea gratissima*) leaves by means of C18 reversed phase chromatography". *Plant Physiol* 66: 1085-1091.
- Stahl, E.** (1962). "Dünnschichtchromatographie: Ein Laboratoriumshandbuch". Berlin: Springer Verlag.
- Stahl, E.** und Dumont, E., (1969). "Ein neues Gerät zur vollautomatischen Aufgabe von Lösungen in Strichform zur Chromatographie". *J Chromatogr* 39: 157.
- Svedstrom, U.**, Vuorela, H., Kostianen, R., Huovinen, K. und Laakso I. (2002). "High-performance liquid chromatographic determination of oligomeric procyanidines from dimers up to hexamers in Hawthorn". *J Chromatogr A.* 968 (1-2): 53-60.
- Szepesi, G.**, Gazdag, M. und Mihalifi, K. (1989). "Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis III method validation". *J chromatogr* 464: 265-278.

- Szepesi, G.** (1990). In: Szepesi "Method Validation in HPLC in Pharmaceutical Analysis", Vol. 1, CRC Druck, Boca Raton, FL, USA: 179-221.
- Szepesi, G.** (1992). "Method Validation". In: Szepesi "How to use Reversed Phase HPLC", VCH, New York, USA: 281-347.
- Szepesi, G.** und Nyiredy S. (1992). "Planar chromatography: current status and future perspectives in pharmaceutical analysis – I. Applicability, quantitation and validation". J Pharm Biomed Anal 10: 1007-1015.
- Szepesi, G.** (1993a). "Some Aspects of the Validation of Planar Chromatographic Methods used in Pharmaceutical Analysis. I: General Principles and Practical Approaches". J Planar Chromatogr 6: 187-197.
- Szepesi, G.** (1993b). "Some Aspects of the Validation of Planar Chromatographic Methods used in Pharmaceutical Analysis. II: Ruggedness Testing". J Planar Chromatogr 6: 259-268.
- Terao, J.** (1999). "Dietary Flavonoids as antioxidants in vivo: conjugated metabolites of (-)-epicatechin and quercetin participate in antioxidative defence in blood plasma". J Med Invest 46: 159-168.
- UPAC** (2001). "Selectivity in Analytical Chemistry" (Draft).
- Veit, M.,** Czygan, F.-C., Frank, B., Hofmann, D. und Worlicak, B. (1989). "Schachtelhalmkraut; Reinheits- und Identitätsuntersuchungen mit Hilfe der HPLC". Dtsch Apoth Ztg 129: 1591-1598.
- Vierling, W.,** Brand, G., Gaedcke, F., Sensch, K. H., Schneider, E. und Scholz, M. (2000). "Crataegus-Extrakte". Dtsch Apoth Ztg 140: 5301-5306.
- Wagner, H.** und Bladt, S. (1996). "Plant Drug Analysis". Springer Verlag, 2. Auflage: 224-225 und 355-358;
- Wahli, F.** (2002). "Eignung der Dünnschichtchromatographie zur Stabilitätsprüfung am Beispiel von Vitex agnus castus". Diplomarbeit, Universität Basel.
- Wahlich, J. C.** und Carr, G. P. (1990). "Chromatographic system suitability tests – what should we be using?". J Pharm Biomed Anal 8: 619-623.
- Wilson, T. D.** (1990). "Liquid chromatographic methods validation for pharmaceutical products". J Pharm Biomed Anal 8: 389-400.

Winterhoff, H., Spengler, B., Christoffel, V., Butterweck, V. und Löhning, A. (2003). "Cimicifuga extract BNO 1055: reduction of hot flushes hints on antidepressant activity". *Maturitas* 44: 1-8.

Wittig, J. (2001). "Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Flavonoiden – analytische und biochemische Untersuchungen". Dissertation. Würzburg, Julius- Maximilians-Universität.

Wittig, J., Leipolz, I., Graefe, E. U., Jaki, B., Treutter, D. und Veit, M. (2002). "Quantification of procyanidines in oral herbal medicinal products containing extracts of *Crataegus* species." *Arzneimittelforschung* 52: 89-96.

Wuttke, W., Jarry, H., Becker, T., Schultens, A., Christoffel, V., Gorke, F. und Seidlova - Wuttke, D. (2003). "Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy?". *Maturitas* 44 (1): 9-20.

10 Anhang

10.1 Untersuchungsmuster

Folia Uvae Ursi, Ch.: 97110464	MA001-01
Folia Uvae Ursi, Ch.: 98210294	MA001-02
Folia Uvae Ursi, Ch.: 01520023	MA001-03
Folia Uvae Ursi, Ch.: 6101/-01518	MA001-04
Folia Uvae Ursi, Ch.: 2201099	MA001-05
Folia Uvae Ursi, Ch.: 112121	MA001-06
Uvae Ursi aquos. sicc. (DEV 3-4:1), Ch.: 97221247	MA001-07
Uvae Ursi aquos. sicc. (DEV 3-4:1), Ch.: 98220442	MA001-08
Uvae Ursi aquos. sicc. (DEV 3-4:1), Ch.: 98220056	MA001-09
Bärentraubenblätterextrakt (DEV 3-4:1), Ch.: 35342	MA001-10
Tabletten, Ch.: 23717	MA001-11-1
Tabletten, Ch.: 23651	MA001-11-2
Tabletten, Ch.: 38996	MA001-11-3
Tabletten, Ch.: 40629	MA001-11-4
Tabletten, Ch.: 39069	MA001-11-5
Tabletten, Ch.: 40558	MA001-11-6
Tabletten, Ch.: 05200148	MA001-11-7
Tabletten, Ch.: 05200149	MA001-11-8
Tabletten, Ch.: 05200150	MA001-11-9
Dragees, Ch.: 222371	MA001-12
Tabletten, Ch.: 10711	MA001-13
Hilfsstoffmischung der Tabletten, MA001-11C, Ch.: 0520014	MA001-14

Weißdornblätter mit Blüten, Extrakte und Fertigarzneimittel

Fructus crataegi, Ph. Eur. Suppl. 98, Ch.: 99110681	MA002-01
Crataegi e fol. cum flor., Ch.: 00120543	MA002-02
Crataegi e fol. cum flor., Ch.: W104598	MA002-02a
Crataegi e fruct. sicc., Ch.: 99122289	MA002-03

Crataegi e fruct. spir. sicc., Ch.: 98121689	MA002-04
Crataegi e fruct. spir. sicc., Ch.: 99122508	MA002-05
Crataegi e fol. cum flor. sicc., Ch.: 99120704	MA002-06
Crataegi e fol. cum flor. sicc., Ch.: 99120731	MA002-07
Crataegi e fol. cum flor. sicc., Ch.: 99121655	MA002-08
Crataegi e fol. cum flor. spiss., Ch.: 264	MA002-08a
Tabletten, Ch.: 0131096	MA002-09-A
Tabletten, Ch.: 0420799	MA002-09-B
Tabletten, Ch.: 3090799	MA002-10-A
Tabletten, Ch.: 1380697	MA002-10-B
Tabletten, Ch.: 3371099	MA002-10-C
Tabletten, Ch.: 2531298	MA002-10-D
Dragees, Ch.: 98010300	MA002-11-A
Dragees, Ch.: 96110100	MA002-11-B
Dragees, Ch.: 95050200	MA002-11-C
Dragees, Ch.: 97100502	MA002-11-D
Dragees, Ch.: 99020202	MA002-11-E
Dragees, Ch.: 97110201	MA002-11-F
Dragees, Ch.: 99110555	MA002-12-A
Dragees, Ch.: 99110155	MA002-12-A
Dragees, Ch.: 9911502	MA002-13
Filmtabletten, Ch.: 299531	MA002-14-A
Filmtabletten, Ch.: 299521	MA002-14-B
Filmtabletten, Ch.: 1010898	MA002-15-A
Filmtabletten, Ch.: 010798	MA002-15-B
Filmtabletten, Ch.: 951082	MA002-16-A
Filmtabletten, Ch.: 752243	MA002-16-B
Filmtabletten, Ch.: 551101	MA002-17

Traubensilberkerzenwurzelstock, Extrakte und Fertigarzneimittel

Unbekannte serratula spezies,	MA007-065
Deklaration: Guan Dong Sheng Ma-Sheng Ma	
Cimicifuga racemosa - ganzes getrocknetes Rhizom (authentische Droge lt. Zertifikat), USA	MA007-066
Cimicifuga racemosa –ganzes getrocknetes Rhizom, Botanicals International, Ch.: A005022	MA007-067
Unbekannte Spezies, geschnittene Wurzel, Deklaration: Sheng Ma	MA007-068
Droge, ganzes getrocknetes Rhizom	MA007-113
Deklaration: Actaea podocarpa	
Rhizoma Cimicifugae racemosa, Ch.: 98110828, (authentische Droge lt. Zertifikat), Deutschland	MA007-123
Rhizoma Cimicifugae racemosa, Ch.: 98110949, (authentische Droge lt. Zertifikat), Deutschland	MA007-124
Rhizoma Cimicifugae racemosa, Ch.: 98110808, (authentische Droge lt. Zertifikat), Deutschland	MA007-125
Radix Cimicifugae pulvis, Ch.: 199900, Juli 2001	MA007-117
Cimicifugae Versuchsextrakt ethanolisch, 75 % Extrakt nativ / 25 % PVP, (DEV 6,5 : 1)	MA007-118
Cimicifugae Versuchsextrakt ethanolisch, 75 % Extrakt nativ / 25 % PVP, (DEV 6,5 : 1)	MA007-119
Nativer Extrakt, Cimicifuga Versuchsextrakt	MA007-120
Simethicon Emulsion 30 %, Ch.: 105130	MA007-121
Polyvinylpyrrolidon PVPKW 29-32, Ch.: 104920	MA007-122
Fertigarzneimittelmischung bestehend aus Placebomischung und isopropanolischem Extrakt im Verhältnis 14:1, DEV 1:1	MA007-126
Tabletten, Ch.: 910041	MA007-127
Tabletten, Ch.: 910051	MA007-128
Tabletten, Ch.: 910071	MA007-129
Placebomischung der Fertigarzneimittelmischung MA007-126	MA007-130

Isopropanolischer Extrakt der Droge *Cimicifugae racemosae rhizoma* (DEV 1:1), Ch.: 904430 MA007-131

Brennnesselblätter, Extrakte und Fertigarzneimittel

Folia Urticae conc., Ch.: 000857 (Bulgarien) MA015-01
Folia Urticae conc., Ch.: 004610 (Polen) MA015-02
Folia Urticae conc., Ch.: 011587 (Ungarn) MA015-03
Folia Urticae conc., Ch.: 000189(Albanien) MA015-04
Folia Urticae conc., Ch.: 022579 (Deutschland) MA015-05
Brennnesselblätter, 100 g, Provita, Ch.: 31585 MA015-06
Brennnesselblätter, 20g, Ch.: 13299491 MA015-07
Brennnesselblätter, Ch.: 113017/18 MA015-08
Brennnesselblätter, Ch.: 4282 MA015-09
Urtica dioica (Bonn) MA015-10
Urtica dioica (Bonn) MA015-10a
Urtica dioica (Bad Neuenahr) MA015-10b
Urtica dioica (Berlin) MA015-11
Urtica urens (Bad Neuenahr) MA015-12
Urtica urens (Berlin) MA015-13
Urticae e fol.spir.sicc., 80% nativ, Ch.: 00420060 MA015-14
Extract Urticae e. fol. Sicc., Ch.: 9802/01 (ethanolisch) MA015-15
Extract Urticae e. fol. Sicc., Ch.: 140032 (isopropanolisch) MA015-16
Urticae e fol. aquos. sicc., Ch.: 01120323 MA015-17
Urticae e fol. rad. Spir. sicc., 70% nativ, Ch.: 01121758 MA015-18
Kapseln, Ch.: 108184 (ethanolischer Extrakt) MA015-19
Kapseln, Ch.: 111048 (isopropanolischer Extrakt) MA015-20
Lamium album MA015-21

10.2 Ringversuche

Im ersten Ringversuch gaben alle neun beteiligten Firmen ein Versuchsergebnis ab.

Im zweiten Ringversuch gaben 11 von 14 der beteiligten Firmen ein Versuchsergebnis ab.

Tabelle 10-1: Auswertung Ringversuch I

Teilnehmer	Abweichungen zur Prüfvorschrift	Bewertung der DC-Platte
A	Entwicklung: Vertikalkammer Detektion: Tauchen	Diffuse Zonen durch das Tauchen der Platte Plattenhintergrund ist dunkel verfärbt.
B	Probenaufarbeitung: Faltenfilter	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.
C	Nein	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.
D	Trocknen der vorgewaschenen Platte in der Mikrowelle Untersuchungslösung: 15 min im Ultraschallbad behandelt, anschließend zentrifugiert	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.
E	Horizontalkammer ohne Konditionierungswanne verwendet, deshalb kein Vorkonditionieren der Platte	Plattenhintergrund ist blau gefärbt, R_T -Werte zu hoch, Zonen sind blau-grün gefärbt
F	Entwicklung: Vertikalkammer, Platten 10x10 cm Untersuchungslösung: halbe Extraktmenge verwendet, Probe wird zentrifugiert Auftragemengen falsch, Bandbreite 6 mm	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein
G	Untersuchungslösung: 10 min. im Ultraschallbad behandelt, nach dem Temperieren auf RT wurde durch einen PTFE-Membranfilter filtriert. Entwicklung: da nur eine ältere CAMAG Horizontalkammer zu Verfügung stand, wurde	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein

	ein mit 15-20 ml getränktes Filterpapier zur Vorkonditionierung auf den Kammerboden gelegt. Erwärmen der Platte nach dem ersten Besprühen mit Reagenz, Zwischentrocknung der Platte während des Sprühens mit wässriger Lösung	
H	Entwicklung: Vertikalkammer	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.
J	Entwicklung: Vertikalkammer Lagerung der Platte über Nacht vor der Dokumentation	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.

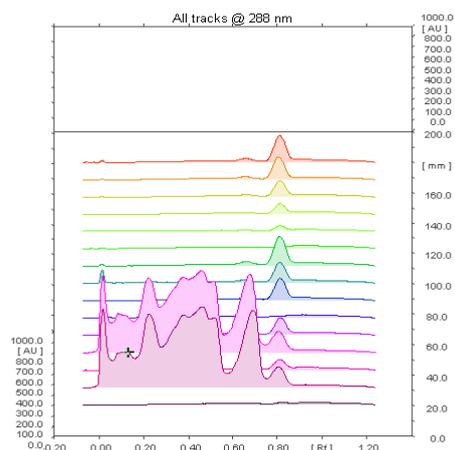
Tabelle 10-2: Auswertung Ringversuch II

Teilnehmer	Abweichungen zur Prüfvorschrift	Bewertung der DC-Platte
A	Nein	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.
B	Probenaufarbeitung durch Röhren auf einem Magnetrührer	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.
C	Nein	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.
D	Nein	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein. Plattenhintergrund leicht verfärbt
E	Nein	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein. Plattenhintergrund leicht verfärbt, Diffuse Zonen
F	Nein	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein Plattenhintergrund zeigt "Siebdruckeffekt"
G	Nein	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein
H	Nein	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.

J	Nein	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.
K	Nein	Plattenhintergrund leicht verfärbt Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.
L	Nein	Die Zonen stimmen in Lage und Farbe mit dem Ergebnis der Prüfvorschrift überein.

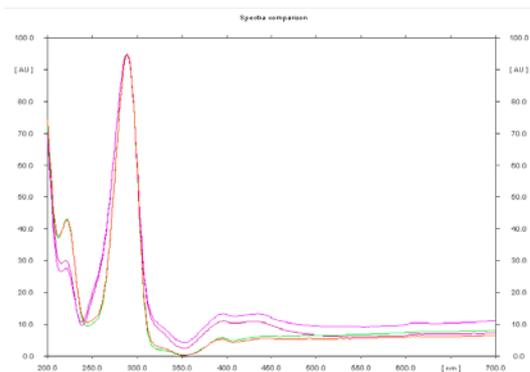
10.3 Validierungsprotokoll (quantitative Hydrochinonbestimmung in Fertigarzneimitteln, die Bärentraubenblätterextrakt enthalten)

Selektivität



	Appl. position (mm)	Appl. volume	Units	Rack column	Rack row	Sample ID	Active
1	20	1	µl	A	1	Hydrochinonlsg.	<input checked="" type="checkbox"/>
2	31.4	8	µl	A	2	Extrakt	<input checked="" type="checkbox"/>
3	42.8	2	µl	A	1	Hydrochinonlsg.	<input checked="" type="checkbox"/>
4	54.2	8	µl	A	3	FAM	<input checked="" type="checkbox"/>
5	65.6	4	µl	A	1	Hydrochinonlsg.	<input checked="" type="checkbox"/>
6	77	8	µl	A	4	Placebo	<input checked="" type="checkbox"/>
7	88.4	6	µl	A	1	Hydrochinonlsg.	<input checked="" type="checkbox"/>
8	99.8	8	µl	A	4	Placebo	<input checked="" type="checkbox"/>
8*	99.8	5	µl	A	1	Hydrochinonlsg.	<input checked="" type="checkbox"/>
9	111.2	8	µl	A	1	Hydrochinonlsg.	<input checked="" type="checkbox"/>
10	122.6	8	µl	A	5	Blank	<input checked="" type="checkbox"/>
11	134	1	µl	A	1	Hydrochinonlsg.	<input checked="" type="checkbox"/>
12	145.4	2	µl	A	1	Hydrochinonlsg.	<input checked="" type="checkbox"/>
13	156.8	4	µl	A	1	Hydrochinonlsg.	<input checked="" type="checkbox"/>
14	168.2	6	µl	A	1	Hydrochinonlsg.	<input checked="" type="checkbox"/>
15	179.6	8	µl	A	1	Hydrochinonlsg.	<input checked="" type="checkbox"/>

Abbildung 10-1: Selektivitätsprüfung des Verfahrens zur quantitativen Hydrochinonbestimmung in Fertigarzneimitteln, die Bärentraubenblätterextrakt enthalten.

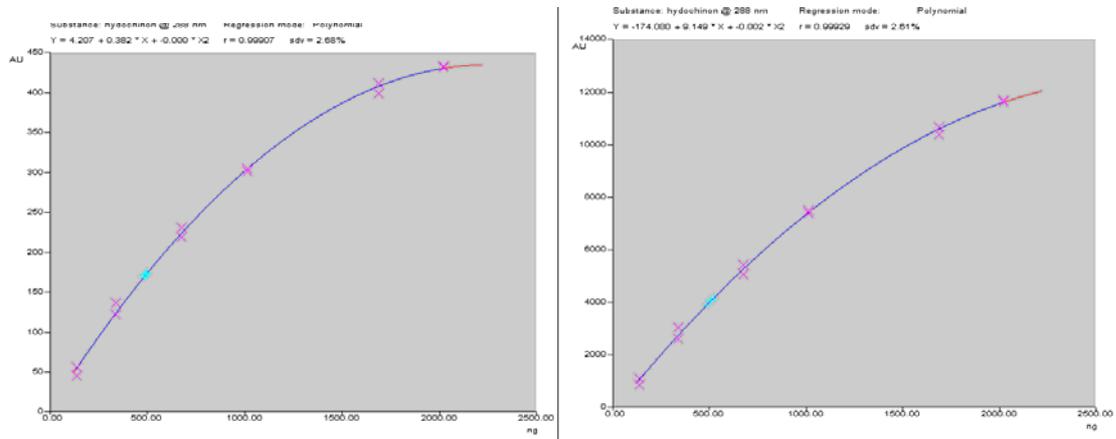


Track	Rf	Assigned Substance	Max Signal	Display	
1	1	0.82	Hydrochinon	39 AU @ 200 nm	<input type="checkbox"/>
2	2	0.80	Hydrochinon	218 AU @ 288 nm	<input checked="" type="checkbox"/>
3	3	0.81	Hydrochinon	103 AU @ 289 nm	<input checked="" type="checkbox"/>
4	4	0.80	Hydrochinon	224 AU @ 288 nm	<input checked="" type="checkbox"/>
5	5	0.81	Hydrochinon	186 AU @ 289 nm	<input checked="" type="checkbox"/>
6	7	0.81	Hydrochinon	236 AU @ 289 nm	<input type="checkbox"/>
7	8	0.81	Hydrochinon	223 AU @ 289 nm	<input type="checkbox"/>
8	9	0.81	Hydrochinon	318 AU @ 289 nm	<input checked="" type="checkbox"/>
9	11	0.81	Hydrochinon	44 AU @ 289 nm	<input type="checkbox"/>
10	12	0.81	Hydrochinon	99 AU @ 289 nm	<input type="checkbox"/>
11	13	0.81	Hydrochinon	167 AU @ 289 nm	<input type="checkbox"/>
12	14	0.80	Hydrochinon	243 AU @ 289 nm	<input type="checkbox"/>
13	15	0.81	Hydrochinon	289 AU @ 289 nm	<input checked="" type="checkbox"/>

Abbildung 10-2: UV-Spektren bei 288 nm der Extraktlösung (Bahn 2), der Fertigarzneimittellösung (Bahn 4), der Placebolösung mit Hydrochinon versetzt (Bahn 8) und der reinen Hydrochinonlösung (Bahn 13).

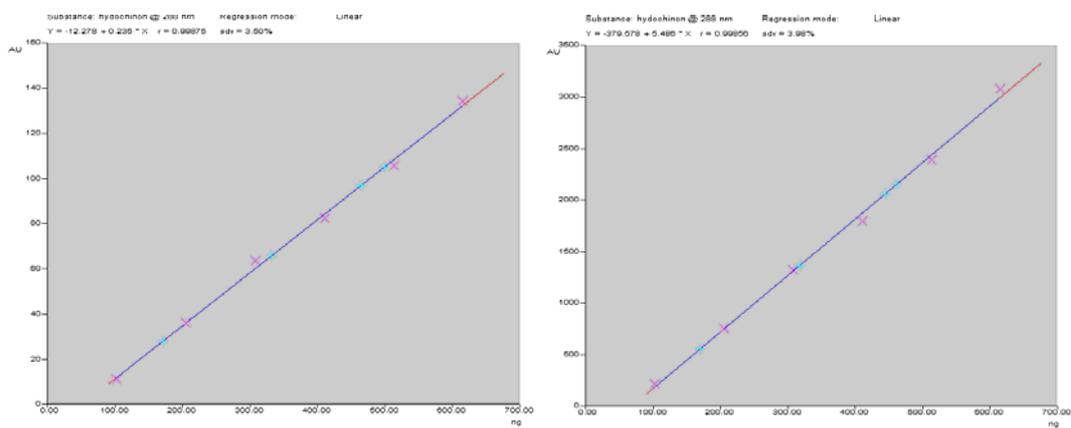
Auf den Bahnen 6 und 10 wo die Placebolösung bzw. das reine Lösungsmittel aufgetragen worden waren, wurde keine Absorption bei 288 nm gemessen.

Kalibriergerade



a)

b)



c)

d)

Abbildung 10-3: Kalibriergerade Hydrochinon; a) und b) Polynominalfunktion, c) und d) lineare Funktion

Substance: hydrochinon @ 288 nm Regression mode: Polynomial

Regression via: Height $Y = 4.207 + 0.382 * X + -0.000 * X^2$ $r = 0.99907$ $sdv = 2.68 \%$
 Area $Y = -174.080 + 9.149 * X + -0.002 * X^2$ $r = 0.99929$ $sdv = 2.61 \%$

Track	Vial	Rf	Amount / Fraction	Height	X(calc)	Area	X(calc)	Sample ID/ Remark
1	A1	0.71	134.90 ng	44.37		847.51		
2	A1	0.71	337.25 ng	121.82		2587.56		
3	A2	0.70		172.02	493.45 ng	4145.35	520.93 ng	Extrakt
4	A1	0.71	674.50 ng	218.22		5054.89		
5	A3	0.70		169.12	483.76 ng	3893.66	487.32 ng	FAM
6	A1	0.71	1.012 ug	301.53		7376.80		
7	A4							Placebo not detected
8	A1	0.71						
9	A2	0.70		173.42	498.14 ng	4045.69	507.56 ng	Extrakt
10	A1	0.71	1.696 g	411.05		10636.50		
11	A3	0.69		171.47	491.61 ng	4144.01	520.74 ng	FAM
12	A1	0.70	2.023 g	432.59		11672.64		
13	A4							Placebo not detected
14	A1	0.70	134.90 ng	55.36		1098.30		
15	A1	0.70	337.25 ng	135.81		3015.39		
16	A1	0.69	674.50 ng	229.86		5408.11		
17	A1	0.69	1.012 ug	303.77		7463.85		
18	A1	0.69						
19	A1	0.69	1.696 g	398.69		10385.88		
20	A1	0.69	2.023 g	431.67		11611.20		

Abbildung 10-4: Daten der polynominalen Kalibrierfunktion

Substance: hydrochinon @ 288 nm Regression mode: Linear

Regression via: Height $Y = -12.278 + 0.235 * X$ $r = 0.99875$ $sdv = 3.50 \%$
 Area $Y = -379.578 + 5.486 * X$ $r = 0.99856$ $sdv = 3.98 \%$

Track	Vial	Rf	Amount / Fraction	Height	X(calc)	Area	X(calc)	Sample ID/ Remark
1	A1							not detected or delete
2	A2	0.88		27.91	171.07 ng	555.13	170.38 ng	
3	A1	0.87	102.60 ng	11.11		213.80		
4	A2	0.86		65.61	331.57 ng	1362.76	317.61 ng	
5	A1	0.87	205.20 ng	35.91		754.27		
6	A2	0.86		96.69	463.89 ng	2055.96	443.97 ng	
7	A1	0.86	307.80 ng	63.37		1316.17		
8	A2	0.85		105.03	499.37 ng	2147.31	460.62 ng	
9	A1	0.85	410.40 ng	82.22		1790.21		
10	A1	0.85	513.00 ng	105.66		2390.67		
11	A1	0.85	615.20 ng	134.10		3075.02		

Abbildung 10-5: Daten der linearen Kalibrierfunktion

Nachweisgrenze

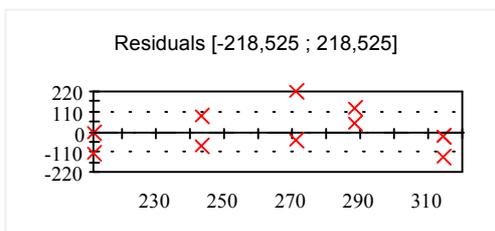
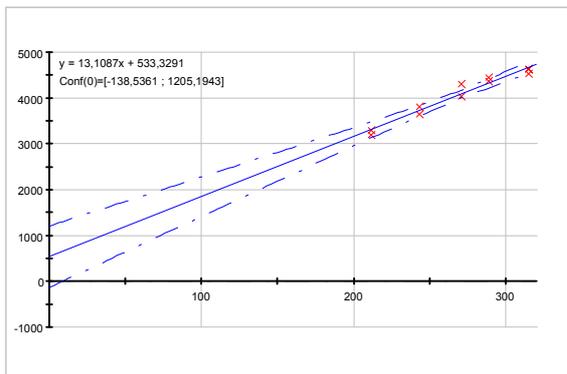
Visueller Nachweis: Die Hydrochinonzone auf Bahn 5 ist visuell gerade noch zu erkennen. Auf Bahn 5 wurden 2 µL Hydrochinonlösung (10,25 mg / 100 mL Methanol) aufgetragen.

	Appl. position (mm)	Appl. volume	Units	Rack column	Rack row	Sample ID	Active
1	25	0.5	µl	A	1	Hydrochinon	<input checked="" type="checkbox"/>
2	40	5	µl	A	2	Droge erhitzt	<input checked="" type="checkbox"/>
3	55	1	µl	A	1	Hydrochinon	<input checked="" type="checkbox"/>
4	70	10	µl	A	2	Droge erhitzt	<input checked="" type="checkbox"/>
5	85	2	µl	A	1	Hydrochinon	<input checked="" type="checkbox"/>
6	100	15	µl	A	2	Droge erhitzt	<input checked="" type="checkbox"/>
7	115	4	µl	A	1	Hydrochinon	<input checked="" type="checkbox"/>
8	130	20	µl	A	2	Droge erhitzt	<input checked="" type="checkbox"/>
9	145	6	µl	A	1	Hydrochinon	<input checked="" type="checkbox"/>
10	160	8	µl	A	1	Hydrochinon	<input checked="" type="checkbox"/>
11	175	10	µl	A	1	Hydrochinon	<input checked="" type="checkbox"/>

Abbildung 10-6: Nachweisgrenze Hydrochinon, visuelle Auswertung.

Linearität

Number of value pairs: 6			
concentration	values		
211,44	3243,55	3300,1	
		3187,0	
243,01	3725,45	3806,1	
		3644,8	
271,00	4169,75	4304,3	
		4035,2	
288,52	4399,70	4440,7	
		4358,7	
314,70	4523,20	4523,2	
			MV
314,70	4628,20	4628,2	
			MV



Statistical Data

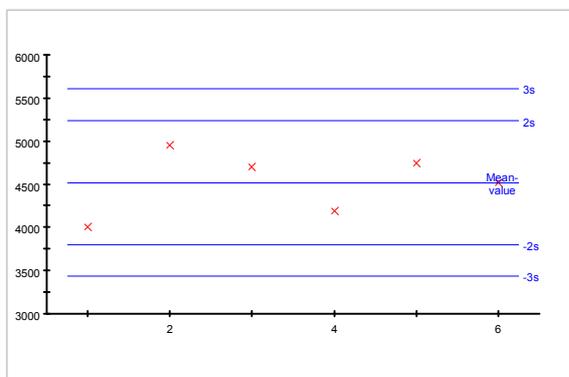
Sum of the x = 1643,370
 Sum of the y = 24689,850
 Squaresum of the x = 458517,704
 Squaresum of the y = 103023342,937

Mean value of the x = 273,895
 s_0^2 = 9058,490
 Slope (b) = 12,854
 Intercept (a) = 594,374
 Correlation coefficient r = 0,987
 r^2 = 0,975
 Residual sum of squares = 36233,958
 Standard deviation s_a = 286,954
 Confidence interval of a = 594,374 \pm 796,586 (5%-two-sided)
 Standard deviation s_b = 1,038
 Confidence interval of b = 12,854 \pm 2,882 (5%-two-sided)
 Residual standard deviation = 95,176
 Method standard deviation = 7,404

Vergleichspräzision

Values

4002,2	4953,3
4702,4	4183,7
4748,9	4514,5



Characteristics Precision

Number of values n = 6
 Mean value x_m = 4517,50
 Standard deviation s_j = 361,83
 Relative standard deviation CV (%) = 8,01
 Repeatability limit r = 1315,61
 t-value = 2,57 (5%-two-sided)
 Error of result = 379,78 (5%-two-sided)
 Lower limit of confidence interval = 4137,72
 Upper limit of confidence interval = 4897,28
 Outlier test according to Dixon
 Q-value for the smallest x-value = 0,19

Q-value for the largest x-value = 0,21

Table value Q = 0,56 (5%-one-sided)

Outliers could not be detected.

Neumann trend test

Test value W = 2,46

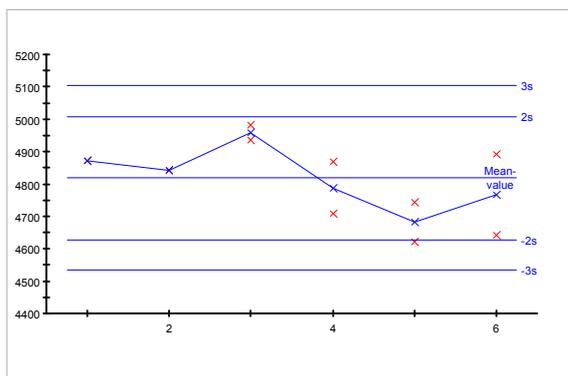
Table value = 0,89 (5%-one-sided)

There is no trend.

Wiederholpräzision

Values

4870,320: MV	4842,780:	MV	4958,535:	4934,43
	4870,32	4842,78		4982,64
4787,935:	4706,98 4681,880:	4620,86	4767,315:	4893,09
	4868,89	4742,90		4641,54



Characteristics Precision

Number of values n = 6

Mean value x_m = 4818,127

Standard deviation s_j = 94,977

Relative standard deviation CV (%) = 1,971

Repeatability limit r = 345,330

t-value = 2,571 (5%-two-sided)

Error of result = 99,688 (5%-two-sided)

Lower limit of confidence interval = 4718,439

Upper limit of confidence interval = 4917,816

Outlier test according to Dixon

Q-value for the smallest x-value = 0,309

Q-value for the largest x-value = 0,319

Table value Q = 0,560 (5%-one-sided)

Outliers could not be detected.

Neumann trend test

Test value W = 1,370

Table value = 0,890 (5%-one-sided)

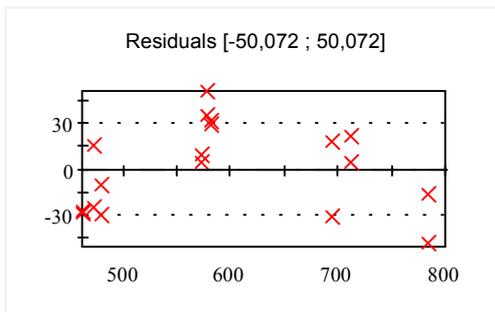
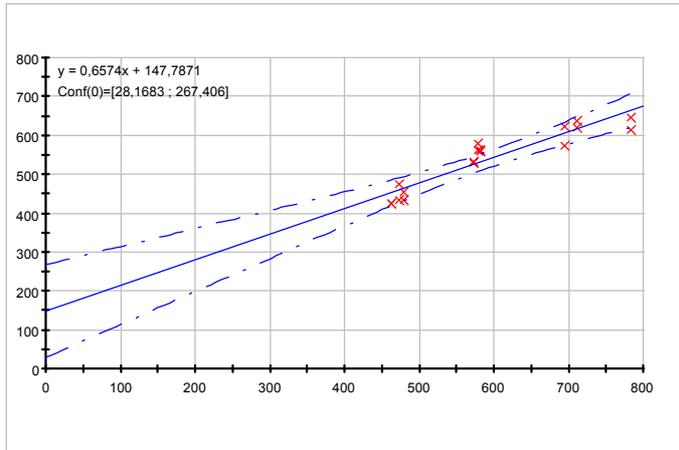
There is no trend.

Richtigkeit

Recovery

No of values : 9

	concentration	values	%	
Value 1	461,92	423,460	91,674	423,51 423,41
Value 2	473,06	453,810	95,931	433,46 474,16
Value 3	480,12	443,785	92,432	434,06 453,51
Value 4	572,38	530,855	92,745	528,04 533,67
Value 5	578,18	570,425	98,659	577,98 562,87
Value 6	581,38	559,950	96,314	559,21 560,69
Value 7	694,79	597,795	86,040	621,65 573,94
Value 8	711,91	628,615	88,300	620,30 636,93
Value 9	783,43	630,280	80,451	646,39 614,17



Characteristics

Intercept a	=	147,787
Standard deviation of a	=	50,579
Slope b	=	0,657
Standard deviation of b	=	0,084
Correlation coefficient r	=	0,947
Recovery in % (100% * b)	=	65,744
Recovery in %	=	91,394
Confidence interval of recovery	=	91,394 ± 4,370
Residual standard deviation $s_{y'k_1}$	=	27,297
Method standard deviation	=	41,519
Test value t_a	=	2,922
Test value t_b	=	4,083
Threshold value of t-distribution	=	2,365 (5%-two-sided)

10.4 Monographien

<p>Bärentraubenblätter</p> <p><i>Uvae Ursi folium</i></p>

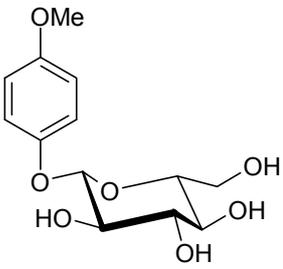
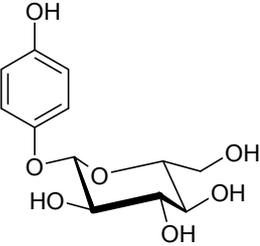
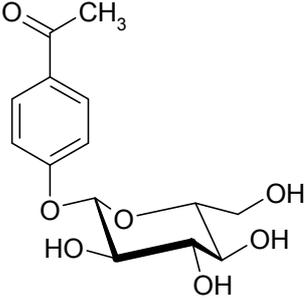
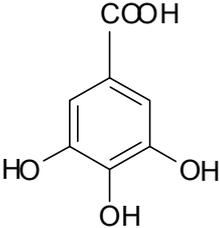
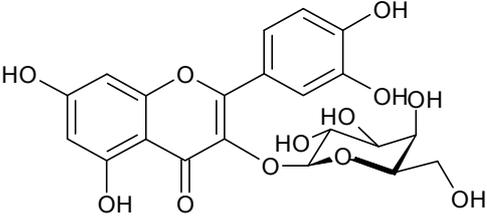
Monographien: Ph. Eur. Version 4.00

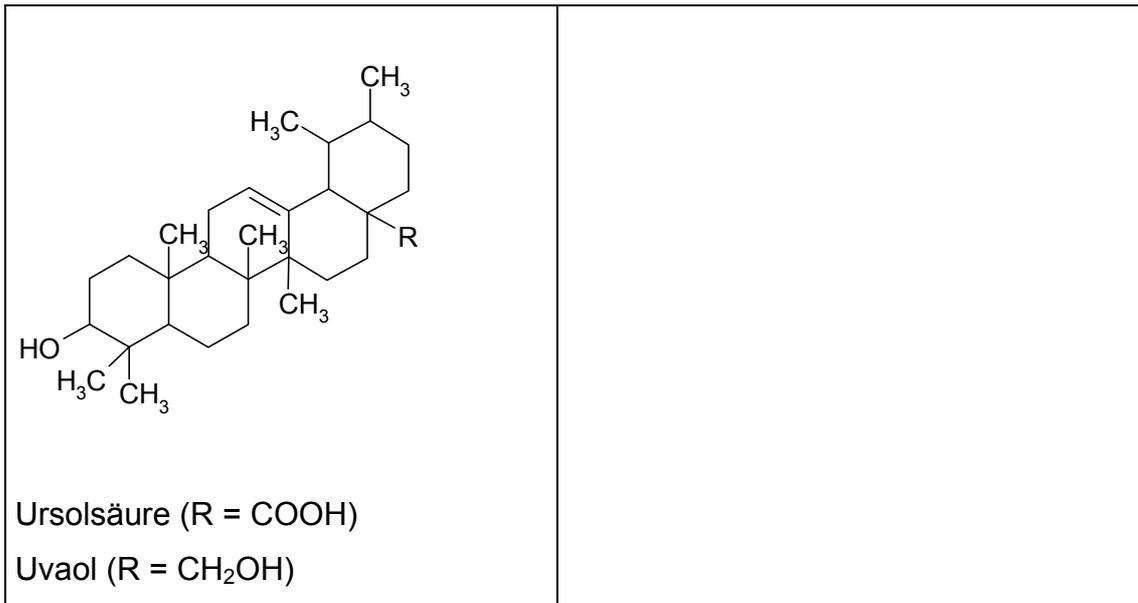
Bärentraubenblätter bestehen aus den getrockneten ganzen oder geschnittenen Blättern von *Arctostaphylos Uva-Ursi* (L.) Spreng. Die Droge enthält mindestens 8,0 Prozent Hydrochinon -Derivate, berechnet als wasserfreies Arbutin und bezogen auf die getrocknete Droge.

Arzneilich wird die Droge zu Trockenextrakten verarbeitet. Auszugsmittel ist in der Regel Wasser, das DEV ist 3-4:1. Der Extrakt wird zu Fertigarzneimitteln mit festen oralen Darreichungsformen verarbeitet (Kapseln, Dragees, Filmtabletten).

Inhaltsstoffe:

Phenolglucoside (6-15 %), insbesondere Arbutin (Arbutosid), Methylarbutin, Arbutin-Gallussäure-Ester, Piceosid und in geringen Mengen das Aglykon Hydrochinon;
Gerbstoffe (10-15 %), hauptsächlich vom Typus der Gallotannine;
Flavonoide (1-2 %), darunter Quercetin-3-galactosid (Hyperosid), weitere Quercetin-Myricetinglykoside, z. T. mit Gallussäure verestert;
Triterpene (0,4 - 0,8 %), darunter die Ursolsäure (pentazyklische Triterpensäure), der entsprechende Alkohol Uvaol sowie das Iridoidglucosid Monotropein.

Inhaltstoffe	Inhaltsstoffe als Vergleichssubstanzen
 <p data-bbox="236 808 432 846">Methylarbutin</p>	 <p data-bbox="788 831 890 869">Arbutin</p>
 <p data-bbox="236 1346 357 1384">Piceosid</p>	 <p data-bbox="788 1361 959 1400">Gallussäure</p>
 <p data-bbox="236 1832 379 1870">Hyperosid</p>	 <p data-bbox="788 1794 970 1832">Hydrochinon</p>



Arbeitsvorschrift

Stationäre Phase:

HPTLC Kieselgel 60 F 254 (vorgewaschen)

Fließmittel:

Ethylacetat	88 VT
Ameisensäure	6 VT
Wasser	6 VT

Untersuchungslösung:

700 mg pulverisierte Droge (Siebanalyse gemäß Ph. Eur. Zerkleinerungsgrad "feinst gemahlen") (entspricht 200 mg Extrakt) werden mit 10 mL Methanol 50 % (V/V) versetzt, 10 min im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Das Filtrat wird mit Methanol durch Waschen des Filters auf 10,0 mL ergänzt.

Referenzsubstanzen:

Arbutin, Gallussäure, Hydrochinon

Referenzlösungen:

5 mg Arbutin werden in 10 mL Methanol gelöst.

1 mg Gallussäure werden in 10 mL Methanol gelöst.

5 mg Hydrochinon werden in 10 mL Methanol gelöst.

Die Referenzlösungen werden vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Probenauftragung:

Werden die Untersuchungs- und Referenzlösungen automatisch aufgetragen, gelten die folgenden Auftragemengen für 8 mm Banden:

Untersuchungslösung (en): 5 µL, Referenzlösungen: 5 µL,

Auftrageposition der ersten Bahn ist mind. 20 mm von linken Plattenrand und 8 mm vom unteren Plattenrand. Nach dem Probenauftragen bleibt die Platte 5 min an der Luft liegen.

Chromatographie:

10 x 10 cm oder 20 x 10 cm Doppeltrogkammer, Kammersättigung 10 min mit Filterpapier, Trennstrecke 5 cm. Nach beendeter Chromatographie wird die Platte bei 120°C getrocknet bis der Geruch nach Ameisensäure verschwunden ist.

Detektion:

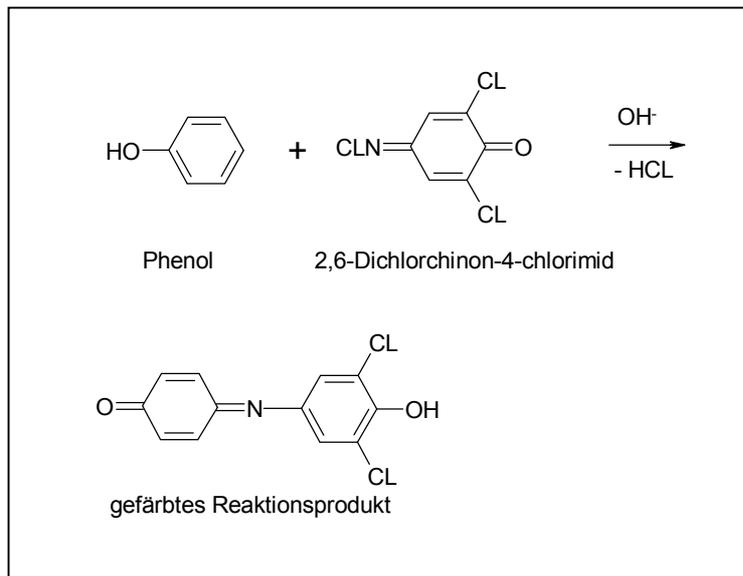
a) UV $\lambda=254$ nm (UV₂₅₄)

b) Tageslicht nach der Derivatisierung mit 2,6-Dichlorchinon-4-chlorimid Reagenz und Natriumcarbonatlösung

Derivatisierungsreagenz:

2,6-Dichlorchinon-4-chlorimid 1 % (m/V) in Methanol und Natriumcarbonat 10 % (m/V) in Wasser

Detektionsreaktion:



2,6-Dichloroquinon-4-chlorimid bildet im alkalischen mit Phenolen gefärbte Reaktionsprodukte. Die Reaktion läuft nur im alkalischen Milieu vollständig ab, deshalb ist darauf zu achten, ausreichend Carbonatlösung auf die Platte zu sprühen. Da diese Lösung wässrig ist, sollte das Reagenz in kleinen Teilschritten auf die Platte gesprüht werden, um zu verhindern, dass die Zonen "verlaufen".

Beispiel:

Selektivitätsprüfungen der dünnschichtchromatographischen Methode zur Identitätsbestimmung der Droge *Uvae Ursi Folium* und daraus hergestellten Zubereitungen

Relative Feuchte: 24,2 %

Probenauftragung: CAMAG ATS 4

Temperatur: 32,0 °C

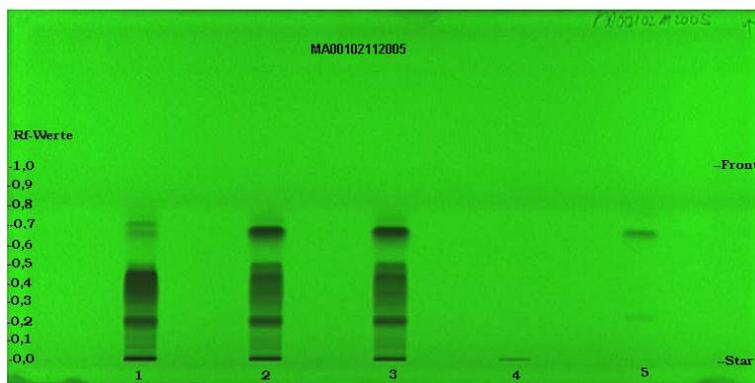
Derivatisierung: Sprühen

Dokumentation: CAMAG Video System

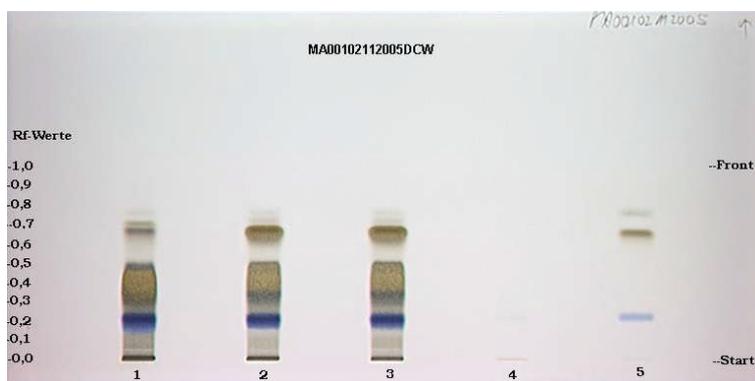
Bahnbelegung:

1: Droge, 2: Extrakt, 3: Fertigarzneimittel, 4: Hilfsstoffmischung, 5: Referenzsubstanzen: Arbutin, Gallussäure, Hydrochinon.

a) Vor der Derivatisierung UV 254 nm



d) Nach der Derivatisierung im Weißlicht



Auswertung:

Vor der Derivatisierung erkennt man unter **UV₂₅₄** die Referenzsubstanzen Arbutin und Gallussäure deutlich als dunkle Zonen im unteren und mittleren R_F-Bereich. Die Untersuchungslösungen auf den Bahnen 1-3 zeigen dunkle Zonen, deren Lage und R_F-Werte mit den Zonen des Arbutins und der Gallussäure übereinstimmen. Die Zone der Gallussäure ist in dem Fingerprint des Extrakts auf Bahn 2 und in dem Fingerprint des Fertigarzneimittels auf Bahn 3 sehr viel intensiver, als in dem Fingerprint der Droge auf Bahn 1. Im mittleren R_F-Bereich der Fingerprints auf den Bahnen 1-3 sieht man weitere dunkle Zonen. Die Untersuchungslösung auf Bahn 4 zeigt keine dunklen Zonen.

Nach **Derivatisierung** erkennt man im **Weißlicht** die Referenzsubstanzen Arbutin, Gallussäure und Hydrochinon. Die Zone des Arbutins ist blau gefärbt und liegt im unteren R_F-Bereich bei ca. 0,2 - 0,3, die Zone der Gallussäure ist braun-grau gefärbt und liegt im oberen R_F-Bereich bei ca. 0,7, die Zone des Hydrochinons ist braun gefärbt und liegt im oberen R_F-Bereich bei ca. 0,8. Die Fingerprints der Untersuchungslösungen auf den Bahnen 1-3 zeigen jeweils Zonen, die den Zonen des Arbutins, der Gallussäure und des Hydrochinons in Bezug auf Lage, Form und Farbe entsprechen. Die blaue Zone des Arbutins ist in den Fingerprints der drei Untersuchungslösungen sehr intensiv, die Zone der Gallussäure ist vor allem in den Fingerprints des Extraktes und des Fertigarzneimittels sehr intensiv. Die Zone des Hydrochinons ist in allen drei Fingerprints nur sehr schwach zu erkennen. Die Untersuchungslösung auf Bahn 4 zeigt keine Zonen.

Weißdornblätter mit Blüten

Crataegi folium cum flore

Monographien: Ph. Eur. Version 4.00

Weißdornblätter mit Blüten bestehen aus den ganzen oder geschnittenen, getrockneten Blüten tragenden Zweigen von *Crataegus monogyna* Jacq. (Lindm.), *C. laevigata* (Poiret) D. C. (*C. oxyacanthoides* Thuill.) oder ihrer Hybride, seltener von anderen europäischen *Crataegus*-Arten wie *C. pentagyna* Waldst. et Kit. ex Willd., *C. nigra* Waldst. et Kit., *C. azarolus* L. Sie enthalten mindestens 1,5 % Flavonoide, berechnet als Hyperosid und bezogen auf die getrocknete Droge (Ph. Eur.).

Inhaltsstoffe:

Flavone mit C - glykosylisch gebundenem Zuckeranteil, Bsp: Vitexinrhamnosid

Flavonolglykoside, Bsp.: Hyperosid, Rutin.

Catechine, darunter (+) - Catechin und (-) - Epicatechin

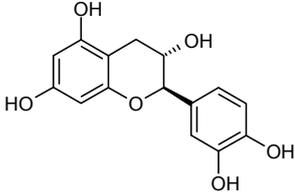
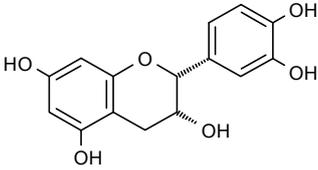
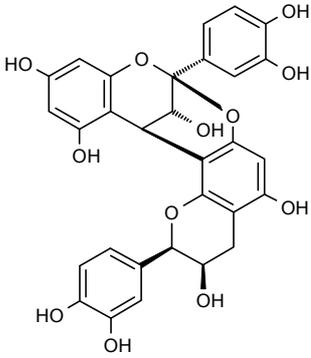
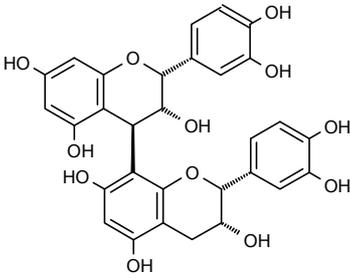
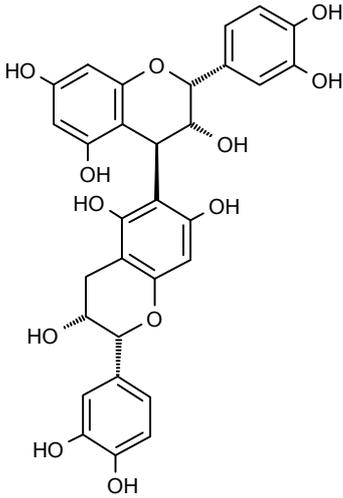
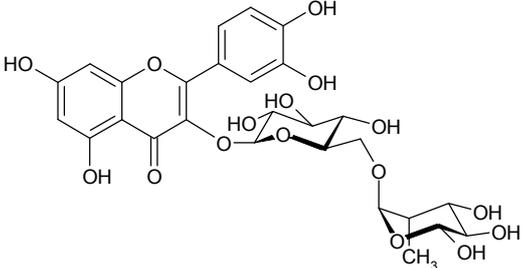
Procyanidine, darunter die dimeren Procyanidine B₂ und B₅

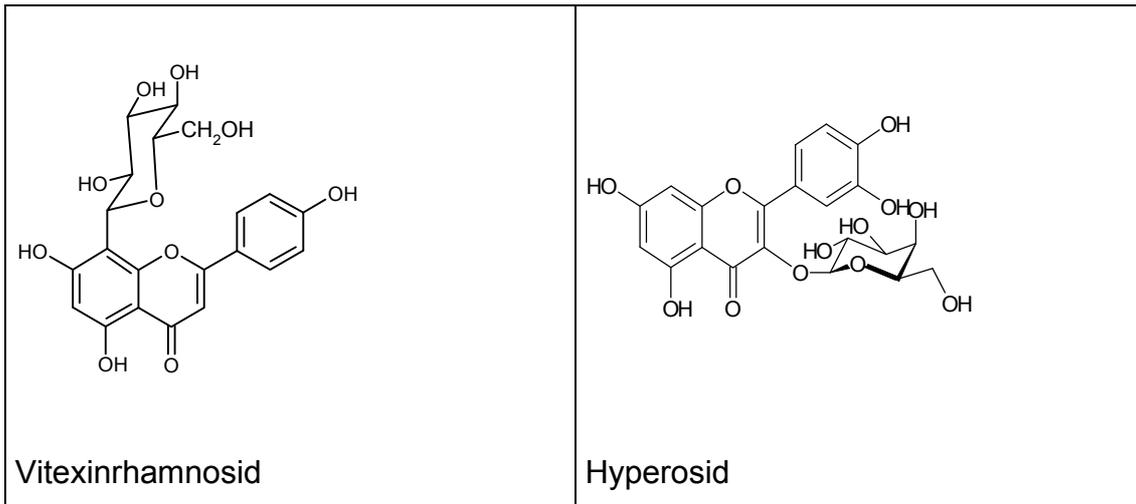
Aromatische Carbonsäuren, hauptsächlich Chlorogensäure und Kaffeesäure

Pentazyklische Triterpene

Zahlreiche einfache Amine und Polyamine

Als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe gelten Flavonoide und Procyanidine. Ihr Gehalt variiert stark, je nachdem um welche Stammpflanze bzw. Droge es sich handelt.

Weitere Inhaltstoffe	Inhaltsstoffe als Vergleichssubstanzen
 <p>(+)-Catechin</p>	 <p>(-)-Epicatechin</p>
 <p>Procyanidin A₂</p>	 <p>Procyanidin B₂</p>
 <p>Procyanidin B₅</p>	 <p>Rutin</p>



Arbeitsvorschrift

Stationäre Phase:

HPTLC Kieselgel 60 F 254, 20 X 10 cm (vorgewaschen)

Fließmittel:

Ethylacetat	100 VT
Ameisensäure	12 VT
Essigsäure	12 VT
Wasser	24 VT

Untersuchungslösung:

1 g Extrakt oder die entsprechende Menge der Droge bzw. des Fertigarzneimittels wird eingewogen und mit 10 mL Ethanol 70 % (V/V) versetzt. Der Ansatz wird 30 min maschinell geschüttelt, zentrifugiert und filtriert. 1 mL des Filtrates wird durch Festphasenextraktion weiter aufgearbeitet.

Zur Festphasenextraktion werden fertig gepackte Säulen (500 mg PA 6 MN) verwendet, die mit Polyamid gefüllt sind. Die Säule wird mit je 5 mL Methanol und

Wasser vorkonditioniert. 1 mL der Untersuchungslösung wird auf die Säule gegeben. Anschließend werden die an der Festphase angereicherten Flavonoide, Catechine und Procyanidine mit Elutionsmitteln unterschiedlicher Elutionsstärke nacheinander je nach Polarität in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad in separaten Fraktionen von der Säule eluiert. Auf diese Weise findet eine fast vollständige Vortrennung der Flavonoide, Catechine, oligomeren (n=2 bis 8) und polymeren (n > 8) Procyanidine statt.

Für die selektive Elution der drei Fraktionen Flavonoide, Catechine, oligomere und polymere Procyanidine werden Elutionsmittel bestehend aus Ethanol 96 %, Aceton und Wasser verwendet mit folgender Zusammensetzung:

Fraktion	Elutionsmittel	Menge Elutionsmittel
Fraktion 1 (Flavonoide und Catechine)	Ethanol 96 %	4x10 ml
Fraktion 2 (oligomere Procyanidine OPC)	Ethanol 96 % 80 VT, Aceton 16 VT, Wasser 4 VT	8x10 ml
Fraktion 3 (polymere Procyanidine PPC)	Aceton 70 VT, Wasser 30 VT	1x10 ml

Die jeweils ersten 10 ml der Eluate werden in einem Rundkolben aufgefangen und bei 40 °C zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird jeweils in 1,0 ml Ethanol 96 % aufgenommen.

Wird die Droge untersucht, so wird die eingesetzte Menge unter Berücksichtigung des DEV errechnet. Die Probe wird in einer Labormühle pulverisiert, es wird eine Siebanalyse gemäß Ph. Eur. durchgeführt, der Zerkleinerungsgrad sollte den Anforderungen "feinst gemahlen" entsprechen.

Referenzsubstanzen:

Epicatechin, Procyanidin B₂, Hyperosid, Rutin

Referenzlösungen:

Je 1 mg Referenzsubstanz wird in je 10 mL Methanol gelöst. Die Referenzlösungen werden vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Probenauftragung:

Werden die Untersuchungs- und Referenzlösungen automatisch aufgetragen, gelten die folgenden Auftragemengen für 8 mm Banden:

Untersuchungslösungen Fraktion 1: 5 µL,

Untersuchungslösungen Fraktion 2: 6 µL,

Untersuchungslösungen Fraktion 3: 6 µL,

Referenzlösungen Epicatechin und Procyanidin B₂: 4 µL,

Referenzlösung Hyperosid: 6 µL,

Referenzlösung Rutin 8 µL.

Auftrageposition der ersten Bahn ist mind. 20 mm von linken Plattenrand und 8 mm vom unteren Plattenrand. Nach dem Probenauftragen bleibt die Platte 5 min an der Luft liegen.

Chromatographie:

20 x 10 cm Horizontal Entwicklungskammer, 15 min Vorkonditionieren mit Fließmittel (20 mL), 4 mL Fließmittel für die Entwicklung, Trennstrecke 6 cm. Nach beendeter Chromatographie wird die Platte bis zum Verschwinden des Fließmittelgeruches im Warmluftstrom getrocknet.

Detektion:

a) UV $\lambda=254$ nm (UV₂₅₄)

b) UV $\lambda=366$ nm (UV₃₆₆)

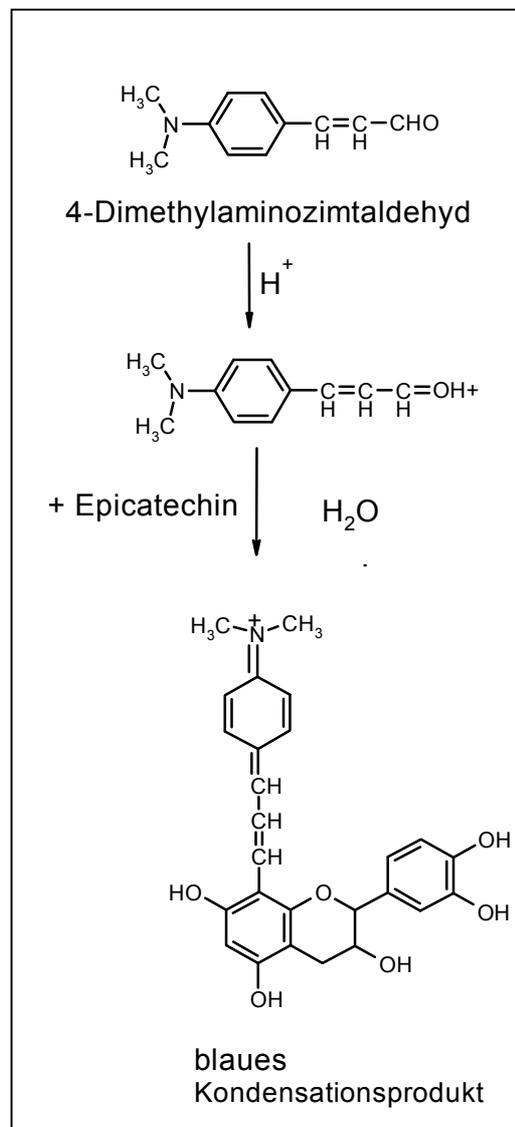
c) Weißlicht nach Derivatisierung mit Dimethylaminozimtaldehyd-Reagenz

Derivatisierungsreagenz:

Dimethylaminozimtaldehyd 1 % in einer Mischung aus 75 VT Salzsäure 6 N und 25 VT Ethanol 96 %. Die Lösung kann zum Tauchen und zum Sprühen verwendet werden.

Detektionsreaktion:

Dimethylaminozimtaldehyd bildet mit Phenolen blau gefärbte Kondensationsprodukte. Die Affinität zu den Flavan-3-olen ist sehr hoch, woraus sich die Spezifität der Reaktion für Procyanidine erklärt. Procyanidine sind di- bis polymere Flavan-3-ole mit den Diastereomeren (+) - Catechin und (-) - Epicatechin.



Beispiel:

Weißdornblätter mit Blüten, dünnschichtchromatographische Untersuchung von Droge, Extrakt und Fertigarzneimittel im Rahmen der Qualitätskontrolle

Relative Feuchte: 30,9 %

Probenauftragung: CAMAG ATS 4

Temperatur: 22,3 °C

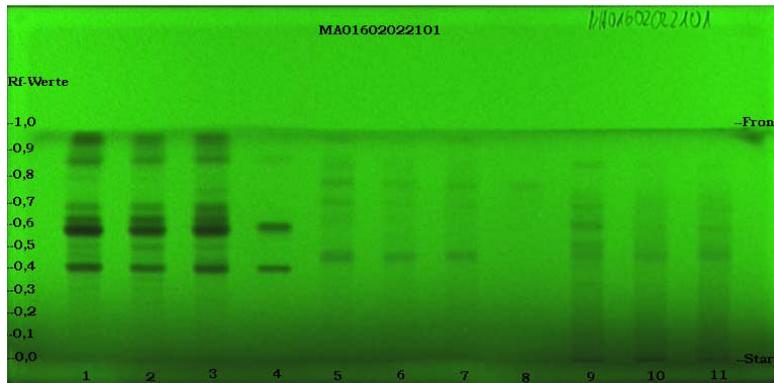
Derivatisierung: Sprühen

Dokumentation: CAMAG VideoSystem

Bahnbelegung:

Bahn	Probe
1	Untersuchungslösung Droge Fraktion 1 (Flavonoide und Catechine)
2	Untersuchungslösung Extrakt Fraktion 1 (Flavonoide und Catechine)
3	Untersuchungslösung Fertigarzneimittel Fraktion 1 (Flavonoide und Catechine)
4	Referenzlösungen Rutosid, Hyperosid, Epicatechin (mit steigendem R _F -Wert)
5	Untersuchungslösung Droge Fraktion 2 (oligomere Procyanidine)
6	Untersuchungslösung Extrakt Fraktion 2 (oligomere Procyanidine)
7	Untersuchungslösung Fertigarzneimittel Fraktion 2 (oligomere Procyanidine)
8	Referenzlösung Procyanidin B ₂
9	Untersuchungslösung Droge Fraktion 3 (polymere Procyanidine)
10	Untersuchungslösung Extrakt Fraktion 3 (polymere Procyanidine)
11	Untersuchungslösung Fertigarzneimittel Fraktion 3 (polymere Procyanidine)

a) Vor der Derivatisierung UV $\lambda=254$ nm



b) Vor der Derivatisierung UV $\lambda=366$ nm



c) Nach der Derivatisierung im Weißlicht



Auswertung

Vor der Derivatisierung erkennt man unter **UV₂₅₄** die Referenzsubstanzen Rutin und Hyperosid deutlich als dunkle Zonen im mittleren R_f -Bereich. Epicatechin ist nur sehr schwach im oberen R_f -Bereich als dunkle Zone zu erkennen. Die Untersuchungslösungen auf den Bahnen 1-3 zeigen dunkle Zonen, deren Lage und Farbe mit denen von Rutin, Hyperosid und Epicatechin übereinstimmen. Die Untersuchungslösungen auf den Bahnen 5-7 und 9-11 zeigen schwache dunkle Zonen im mittleren und oberen R_f -Bereich. Procyanidin B₂ ist im oberen R_f -Bereich sehr schwach zu sehen.

Vor der Derivatisierung erkennt man unter **UV₃₆₆** die Referenzsubstanzen Rutin und Hyperosid als nicht fluoreszierende dunkle Zonen. Die Untersuchungslösungen zeigen dunkle Zonen, deren Lage mit denen von Rutin und Hyperosid übereinstimmen. Die Untersuchungslösungen 1-3 zeigen nahe der Front deutlich rot gefärbte Zonen, wahrscheinlich Chlorophyll. Die Untersuchungslösungen 5-7 zeigen ebenfalls rote Zonen nahe der Front, sie sind aber nur schwach zu erkennen. Die Untersuchungslösungen 9-11 zeigen diese Zonen nicht. In allen Untersuchungslösungen ist im mittleren R_f -Bereich eine blau fluoreszierende Zonen zu sehen. Im mittleren und im oberen R_f -Bereich der Untersuchungslösungen sind außerdem zwei schwach blau fluoreszierende Zonen zu erkennen.

Nach der **Derivatisierung** erkennt man im **Weißlicht** die Referenzsubstanzen Rutin und Hyperosid als gelbe Zonen und die Referenzsubstanzen Epicatechin (R_f ca. 0,9) und Procyanidin B₂ (R_f ca. 0,8) als blau-grün gefärbte Zonen. Die Untersuchungslösungen auf den Bahnen 1-3 (Flavonoid- und Catechinfractionen) zeigen deutlich Zonen, die in Bezug auf Lage, Form und Farbe mit Rutin, Hyperosid und Epicatechin übereinstimmen. Eine weitere schwach blau gefärbte Zone ist zu sehen, diese stimmt in Bezug auf Farbe und Lage mit Procyanidin B₂ überein.

Die Untersuchungslösungen auf den Bahnen 5-7 (Fraktion der oligomeren Procyanidine) zeigen eine Zone, die in Farbe und R_f -Wert mit der Zone des Procyanidin B₂ übereinstimmt. Darunter ist bei den Untersuchungslösungen eine weitere blau-grün gefärbte Zone zu erkennen.

Die Untersuchungslösungen auf den Bahnen 9-11 zeigen im mittleren R_f -Bereich eindeutig zu erkennende blau-grün gefärbte Zonen.

Traubensilberkerzenwurzelstock

Cimicifugae rhizoma

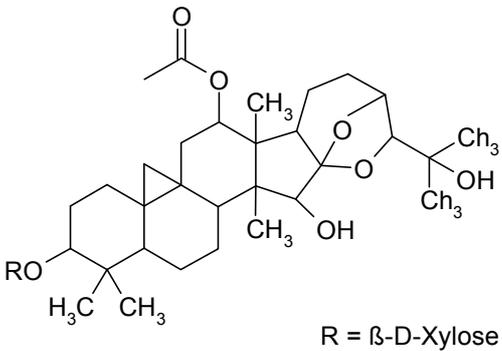
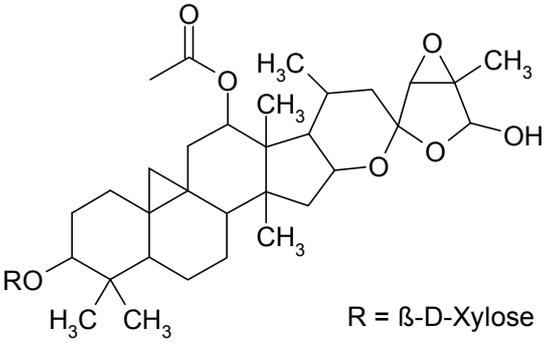
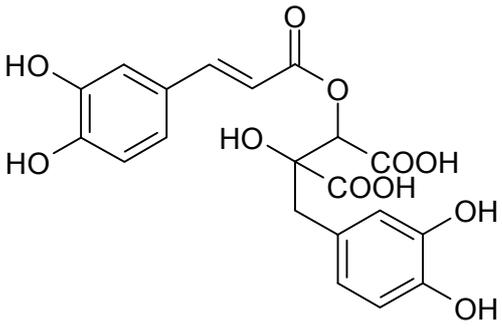
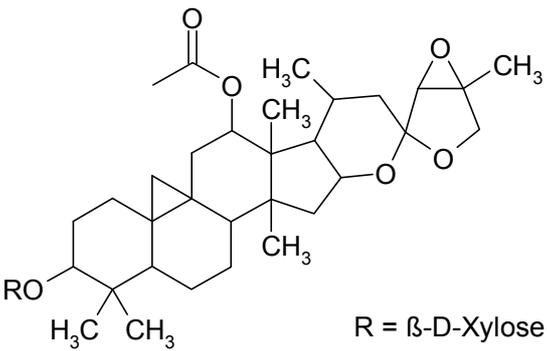
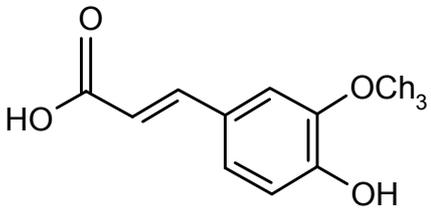
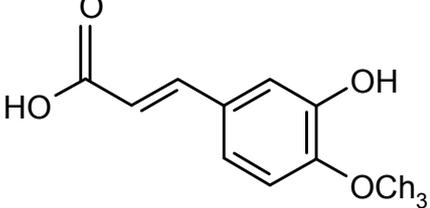
Traubensilberkerzenwurzelstock besteht aus den getrockneten Rhizomen und Wurzeln der Droge *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt., gesammelt nach der Ausbildung der Frucht.

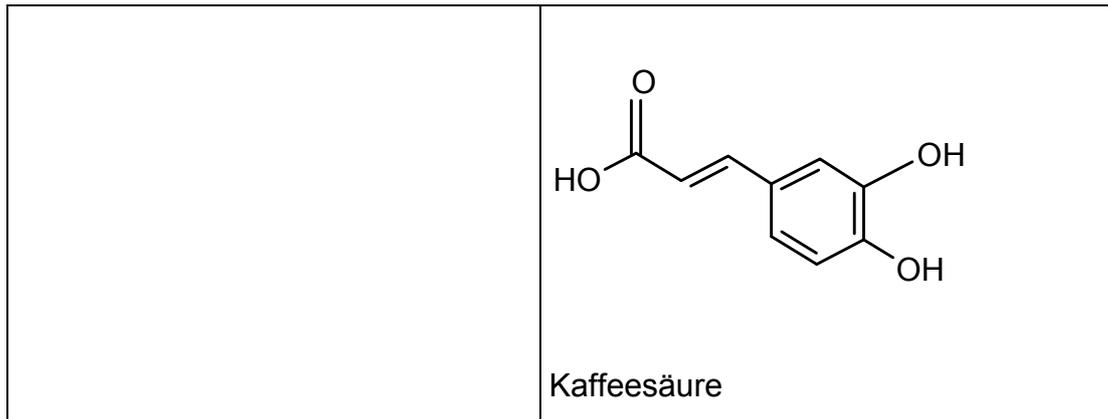
Arzneilich wird die Droge zu Trockenextrakten verarbeitet. Auszugsmittel sind in der Regel Ethanol 50-60 % und Isopropanol 40 %. Das DEV ist meistens 7 bis 14:1. Die Extrakte werden zu Fertigarzneimitteln mit festen oralen Darreichungsformen verarbeitet (Kapseln, Dragees, Filmtabletten).

Inhaltsstoffe:

Triterpenglykoside, z.B. Actein, 27-Deoxyactein, Cimicifugosid

Hydroxycimtsäurederivate, z.B. Kaffeesäure, Isoferulasäure, Ferulasäure, Fukinolsäure, Cimicifugasäuren B,A,F und E

Weitere Inhaltstoffe	Inhaltsstoffe als Vergleichssubstanzen
 <p>R = β-D-Xylose</p> <p>Cimicifugosid</p>	 <p>R = β-D-Xylose</p> <p>Actein</p>
 <p>Fukinolsäure</p>	 <p>R = β-D-Xylose</p> <p>27-Deoxyactein</p>
 <p>Ferulasäure</p>	 <p>Isoferulasäure</p>



Arbeitsvorschrift

Triterpenglykoside in *Cimicifugae rhizoma* und daraus hergestellten Zubereitungen

Stationäre Phase:

HPTLC Kieselgel 60 F 254, 20 X 10 cm (vorgewaschen)

Fließmittel:

Ethylformiat	30 VT
Toluol	50 VT
Ameisensäure	20 VT

Untersuchungslösung:

500 mg pulverisierte Droge (Siebanalyse gemäß Ph. Eur., Zerkleinerungsgrad "feinst gemahlen") werden mit 5 mL Methanol versetzt, 10 min im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Das Filtrat wird mit Methanol durch Waschen des Filters auf 10,0 mL ergänzt.

Referenzsubstanzen:

Actein, 27-Deoxyactein

Referenzlösungen:

1 mg Actein wird in 10 mL Ethanol 60 % gelöst.

1 mg 27-Deoxyactein wird in 10 mL Methanol gelöst.

Die Referenzlösungen werden vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Probenauftragung:

Werden die Untersuchungs- und Referenzlösungen automatisch aufgetragen, gelten die folgenden Auftragemengen für 8 mm Banden:

Untersuchungslösung (en) : 2 µL,

Referenzlösung Actein: 5 µL, Referenzlösung 27-Deoxyactein: 4 µL,

Auftrageposition der ersten Bahn ist mind. 20 mm von linken Plattenrand und 8 mm vom unteren Plattenrand. Nach dem Probenauftragen bleibt die Platte 5 min an der Luft liegen.

Chromatographie:

20 x 10 cm Doppeltrogkammer, Kammersättigung 10 min mit Filterpapier, Trennstrecke 6 cm. Nach beendeter Chromatographie wird die Platte bis zum Verschwinden des Fließmittelgeruches im Warmluftstrom getrocknet.

Detektion:

Tageslicht nach der Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz

Derivatisierungsreagenz:

Anisaldehyd-Reagenz: Stammlösung 1 ist eine Mischung aus 2 mL Anisaldehyd, 40 mL Eisessig und 340 mL Methanol. Die Lösung wird kalt gelagert. Unter Eiskühlung werden 9,5 mL der Stammlösung 1 mit 0,5 mL Schwefelsäure versetzt (= Reaktionsreagenz).

Die Stammlösung kann bei Lagerung im Kühlschrank eine Woche aufbewahrt werden, das Reagenz sollte frisch hergestellt werden.

Beispiel:

Selektivitätsprüfungen der dünnschichtchromatographischen Methode zur Identitätsbestimmung der Droge *Cimicifugae rhizoma* und daraus hergestellten Zubereitungen

A Selektivitätsprüfungen der dünnschichtchromatographischen Methode zur Identitätsbestimmung der Droge *Cimicifugae rhizoma*

Relative Feuchte: 50,0 %

Probenauftragung: CAMAG ATS 4

Temperatur: 26,0 °C

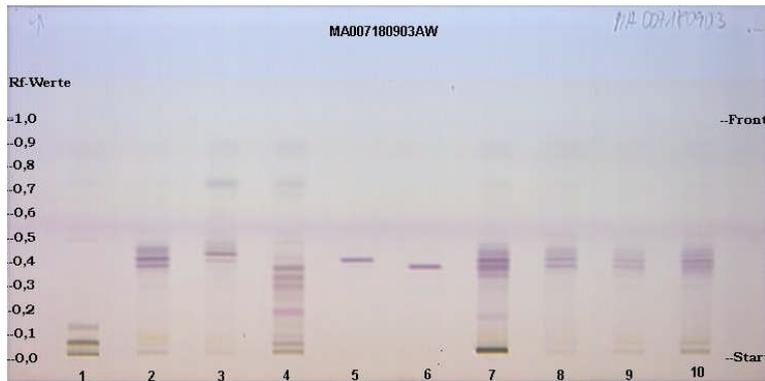
Derivatisierung: Tauchen

Dokumentation: CAMAG VideoSystem

Bahnbelegung:

- 1: Droge mit der Deklaration "Guan Dong Sheng Ma, *Serratula species*"
- 2: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga racemosa*"
- 3: Droge mit der Deklaration "Sheng Ma, species unknown"
- 4: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga americana*"
- 5: Actein
- 6: 27-Deoxyactein
- 7: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga racemosa*", authentische (zertifizierte) Droge
- 8: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga racemosa*"
- 9: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga racemosa*"
- 10: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga racemosa*"

a) Nach der Derivatisierung im Weißlicht



Auswertung

Nach der Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz sieht man im mittleren R_f -Bereich auf Bahn 5 die violette Zone des Acteins und auf Bahn 6 die violette Zone des 27-Deoxyacteins. Die Untersuchungssubstanzen, deren Fingerprints auf den Bahnen 2 und 7-10 zu sehen sind, zeigen im mittleren R_f -Bereich zwei Zonen, die denen des Actein und des 27-Deoxyacteins in Bezug auf Lage, Form und Farbe entsprechen. Im unteren R_f -Bereich sind schwache gelb-braune Zonen zu sehen. Auf den Bahnen 1, 3 und 4 sieht man Fingerprints, die eindeutig nicht mit dem Fingerprint der authentischen Droge auf Bahn 7 übereinstimmen. Es handelt sich hier auch lt. Deklaration um Verfälschungen der Droge. Auf den Bahnen 2, 8, 9 und 10 sieht man die Fingerprints der Drogen mit der Deklaration "*C. racemosa*". Die Fingerprints entsprechen dem Fingerprint der authentischen Droge in Bezug auf Lage, Form und Farbe der Zonen, allerdings sind die Zonen nur sehr schwach zu sehen, was auf quantitative Unterschiede hindeutet.

B Selektivitätsprüfungen der dünnschichtchromatographischen Methode zur Identitätsbestimmung des aus der Droge *Cimicifugae rhizoma* hergestellten Extraktes.

Relative Feuchte: 50,0 %

Probenauftragung: CAMAG ATS 4

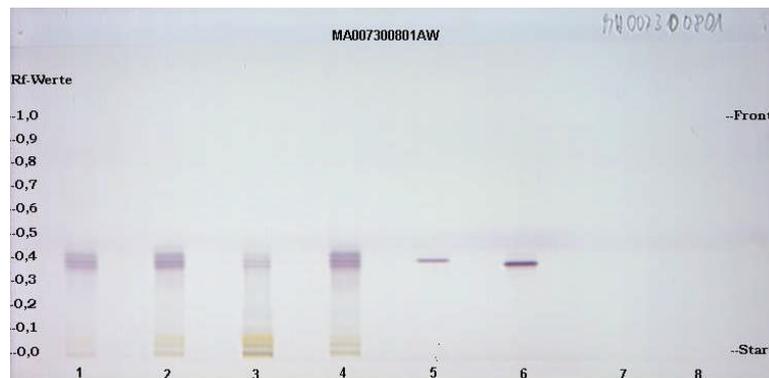
Temperatur: 26,0 °C

Derivatisierung: Tauchen

Dokumentation: CAMAG VideoSystem

Bahnbelegung: 1: Droge, 2: Extrakt (Vorstufe), 3: Extrakt (Vorstufe), 4: Extrakt, 5: Actein, 6: 27-Deoxyactein, 7: Stellmittel, 8: Stellmittel

a) Nach der Derivatisierung im Weißlicht



Auswertung

Nach der Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz sieht man im mittleren R_f -Bereich auf Bahn 5 die violette Zone des Actein und auf Bahn 6 die violette Zone des 27-Deoxyactein. Die Droge und der Extrakt wie auch die Vorstufen des Extraktes zeigen in ihrem Fingerprint im mittleren R_f -Bereich zwei Zonen, die denen des Actein und des 27-Deoxyactein in Bezug auf Lage, Form und Farbe entsprechen. Im unteren R_f -Bereich sind schwache gelb-braune Zonen zu sehen. Auf den Bahnen 6 und 7 sieht man keine Zonen. Die Fingerprints von Droge und Extrakt entsprechen einander in Bezug auf Lage, Form und Farbe der Zonen. Die Hilfsstoffe stören die Detektion nicht.

C Selektivitätsprüfungen der dünnschichtchromatographischen Methode zur Identitäts- bestimmung eines Fertigarzneimittels, das Extrakt der Droge *Cimicifugae rhizoma* enthält.

Relative Feuchte: 50,0 %

Probenauftragung: CAMAG ATS 4

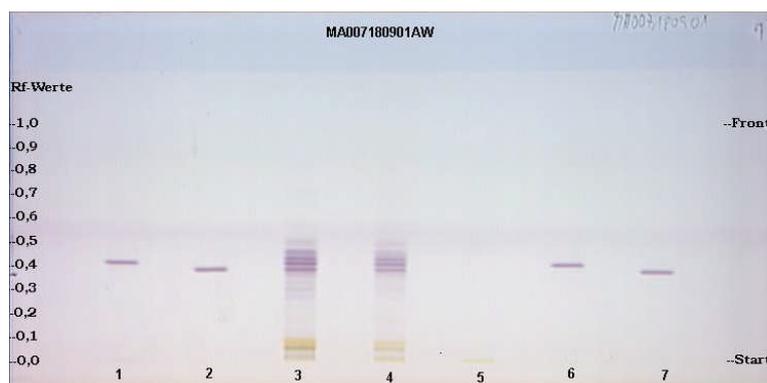
Temperatur: 26,0 °C

Derivatisierung: Tauchen

Dokumentation: CAMAG VideoSystem

Bahnbelegung: 1: Actein, 2: 27-Deoxyactein, 3: Extrakt, 4: Fertigarzneimittel,
5: Hilfsstoffmischung, 6: Actein, 7: 27-Deoxyactein

a) Nach der Derivatisierung im Weißlicht



Auswertung

Nach der Derivatisierung mit Anialdehyd-Reagenz sieht man im mittleren R_f -Bereich auf den Bahnen 1 und 6 die violette Zone des Actein und auf den Bahnen 2 und 7 die violette Zone des 27-Deoxyactein. Die Fingerprints von Droge und Extrakt zeigen Zonen, die diesen Zonen von Actein und 27-Deoxyactein in Bezug auf Farbe, Form und Lage entsprechen. Im unteren R_f -Bereich sind sowohl bei der Droge als auch im Extrakt gelb-braune Zonen zu erkennen. Auf Bahn 5 ist keine Zonen zu erkennen, die Hilfsstoffe stören die Chromatographie nicht. Die Fingerprints von Extrakt und Fertigarzneimittel entsprechen einander in Bezug auf Lage, Form und Farbe der Zonen.

B Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Hydroxycimtsäurederivate

Arbeitsvorschrift

Stationäre Phase:

HPTLC Kieselgel 60 F 254, 20 X 10 cm (vorgewaschen)

Fließmittel:

Ethylformiat	30 VT
Toluol	50 VT
Ameisensäure	20 VT

Untersuchungslösung:

500 mg pulverisierte Droge (Siebanalyse gemäß Ph. Eur., Zerkleinerungsgrad "feinst gemahlen") werden mit 5 mL Ethanol 50% versetzt, 10 min im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Das Filtrat wird mit Ethanol 50% durch Waschen des Filters auf 10,0 mL ergänzt.

Referenzsubstanzen:

Kaffeesäure, Isoferulasäure.

Referenzlösungen:

1 mg Kaffeesäure wird in 10 mL Methanol gelöst.

1 mg Isoferulasäure wird in 10 mL Methanol gelöst.

Die Referenzlösungen werden vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Probenauftragung:

Werden die Untersuchungs- und Referenzlösungen automatisch aufgetragen, gelten die folgenden Auftragemengen für 8 mm Banden:

Untersuchungslösung (en) : 2 µL,

Referenzlösung Isoferulasäure: 4 µL, Referenzlösung Kaffeesäure: 2 µL.

Auftragepositionen der ersten Bahn ist mind. 20 mm von linken Plattenrand und 8 mm vom unteren Plattenrand. Nach dem Probenauftragen bleibt die Platte 5 min an der Luft liegen.

Chromatographie:

20 x 10 cm Doppeltrogkammer, Kammersättigung 10 min mit Filterpapier, Trennstrecke 6 cm. Nach beendeter Chromatographie wird die Platte bis zum Verschwinden des Fließmittelgeruches im Warmluftstrom getrocknet.

Detektion:

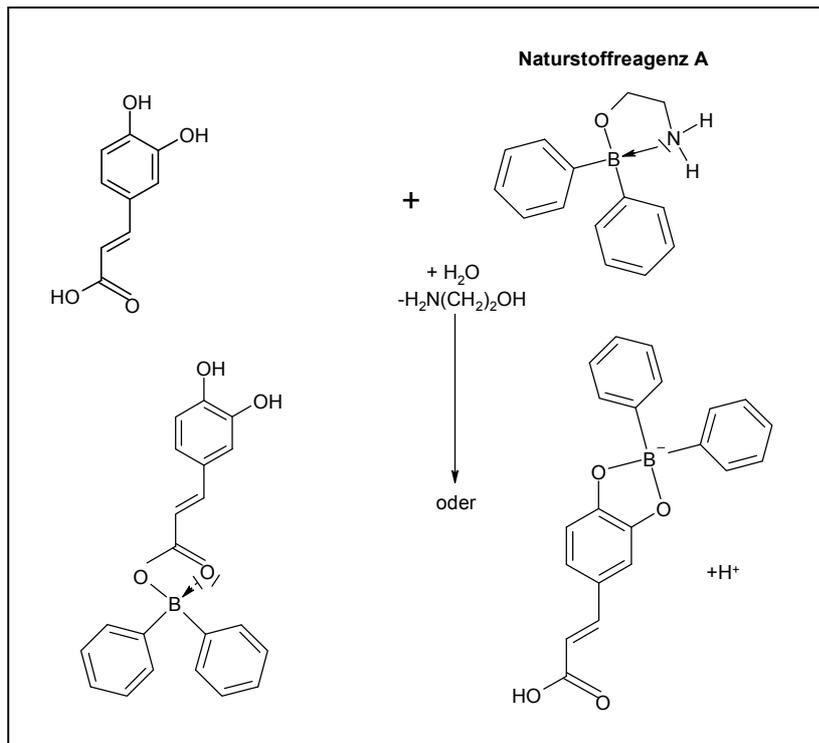
a) UV 366 nm (UV₃₆₆) nach der Derivatisierung mit Naturstoffreagenz und Macrogollösung

Derivatisierungsreagenz:

Naturstoffreagenz: 1 % 2-Aminoethyldiphenylborinat in Methanol (m/V), Macrogol 400: 5 % in Methanol.

Detektionsreaktion:

Diphenylborsäure- β -aminoethylester, Aminoethyldiphenylborinat (Naturstoffreagenz A): Verwendet werden 0,5 bis 1 % Lösungen in Methanol, Ethanol oder Ethylacetat. Durch Komplexbildung mit dem Reagenz fluoreszieren die Substanzflecken. Die Fluoreszenzintensität kann durch Nachbesprühen mit Polyethylenglykol (PEG)-Lösung verstärkt werden. Verwendet wird meist eine 5 % methanolische Lösung von PEG 400. Um die Platten mit ausreichenden Reagenzmengen besprühen zu können, können die Platten vor der Derivatisierung erwärmt werden.



Beispiel:

Selektivitätsprüfungen der dünnschichtchromatographischen Methode zur Identitätsbestimmung der Droge *Cimicifugae rhizoma* und daraus hergestellten Zubereitungen

A Selektivitätsprüfungen der dünnschichtchromatographischen Methode zur Identitätsbestimmung der Droge *Cimicifugae rhizoma*

Relative Feuchte: 50,0 %

Probenauftragung: CAMAG ATS 4

Temperatur: 26,0 °C

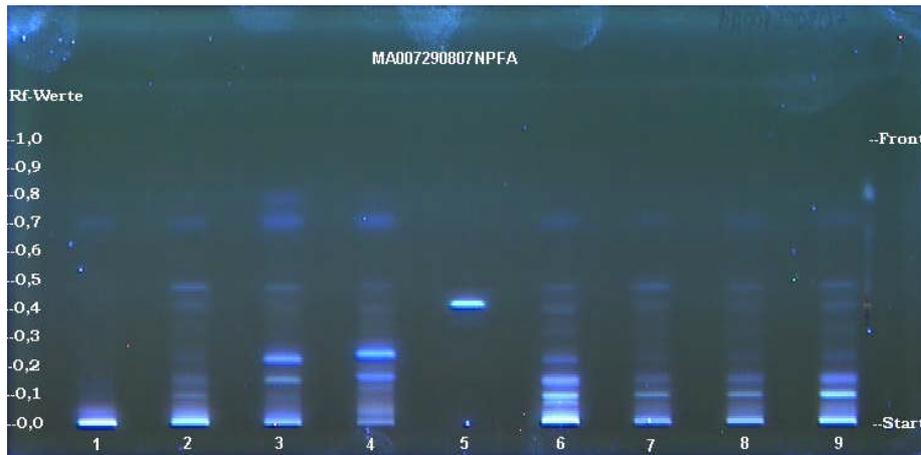
Derivatisierung: Sprühen

Dokumentation: CAMAG VideoSystem

Bahnbelegung:

- 1: Droge mit der Deklaration "Guan Dong Sheng Ma, *Serratula species*"
- 2: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga racemosa*"
- 3: Droge mit der Deklaration "Sheng Ma, species unknown"
- 4: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga americana*"
- 5: Kaffeesäure
- 6: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga racemosa*", authentische (zertifizierte) Droge
- 7: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga racemosa*"
- 8: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga racemosa*"
- 9: Droge mit der Deklaration "*Cimicifuga racemosa*"

a) Nach der Derivatisierung $\lambda=UV\ 366$



Auswertung

Nach der Derivatisierung mit Naturstoffreagenz sieht man im mittleren R_f -Bereich auf Bahn 5 die blau fluoreszierende Zone der Kaffeesäure. Die Untersuchungssubstanzen, deren Fingerprints auf den Bahnen 2 und 7-10 zu sehen sind, zeigen im mittleren R_f -Bereich eine sehr schwache blau fluoreszierende Zone, die der Zone der Kaffeesäure in Bezug auf Form, Lage und Farbe entspricht. Im unteren R_f -Bereich sind weitere blau fluoreszierende Zonen zu sehen. Auf den Bahnen 1,3 und 4 sieht man Fingerprints, die eindeutig nicht mit dem Fingerprint der authentischen Droge auf Bahn 7 übereinstimmen. Es handelt sich hier laut Deklaration um Verfälschungen der Droge. Auf den Bahnen 2, 8, 9 und 10 sieht man die Fingerprints der Drogen mit der Deklaration "*C. racemosa*". Die Fingerprints entsprechen dem Fingerprint der authentischen Droge in Bezug auf Lage, Form und Farbe der Zonen, allerdings sind die Zonen nur sehr schwach zu sehen, was auf quantitative Unterschiede hindeutet.

B Selektivitätsprüfungen der dünnschichtchromatographischen Methode zur Identitätsbestimmung des aus der Droge *Cimicifugae rhizoma* hergestellten Extraktes.

Relative Feuchte: 50,0 %

Probenauftragung: CAMAG ATS 4

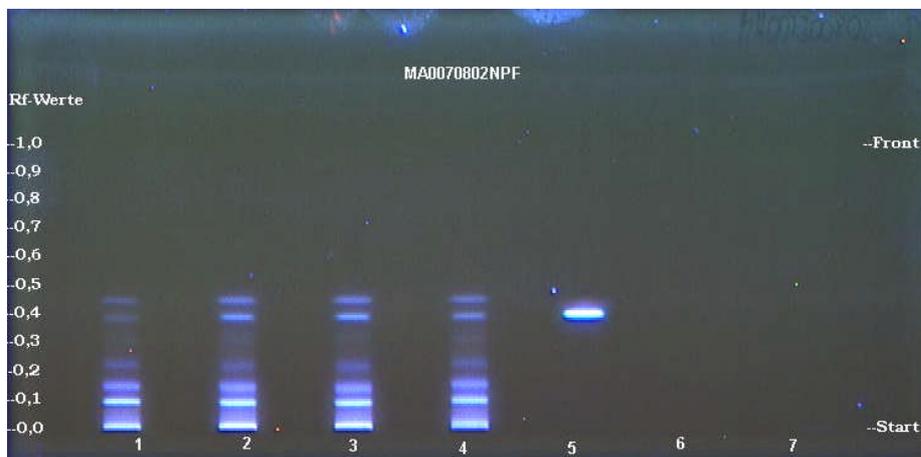
Temperatur: 26,0 °C

Derivatisierung: Sprühen

Dokumentation: CAMAG VideoSystem

Bahnbelegung: 1: Droge , 2: Extrakt (Vorstufe), 3: Extrakt (Vorstufe), 4: Extrakt,
5: Kaffeesäure, 6: Stellmittel, 7: Stellmittel

a) Nach der Derivatisierung UV 366



Auswertung

Nach der Derivatisierung mit Naturstoffreagenz sieht man im mittleren R_f -Bereich auf Bahn 5 die blau fluoreszierende Zone der Kaffeesäure. Die Droge und der Extrakt sowie auch die Vorstufen des Extraktes zeigen in ihrem Fingerprint im mittleren R_f -Bereich eine Zone, die der der Kaffeesäure in Bezug auf Lage, Form und Farbe entsprechen. Im unteren R_f -Bereich sind weitere blau fluoreszierende Zonen zu sehen. Auf den Bahnen 6 und 7 sieht man keine Zonen. Die Fingerprints von Droge und Extrakt entsprechen einander in Bezug auf Lage, Form und Farbe der Zonen.

C Selektivitätsprüfungen der dünnenschichtchromatographischen Methode zur Identitätsbestimmung eines Fertigarzneimittels, das Extrakt der Droge *Cimicifugae rhizoma* enthält.

Relative Feuchte: 50,0 %

Probenauftragung: CAMAG ATS 4

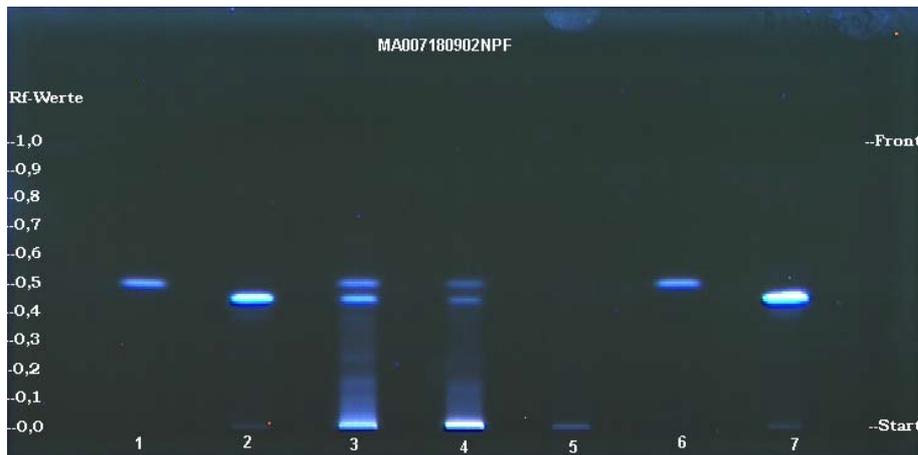
Temperatur: 26,0 °C

Derivatisierung: Sprühen

Dokumentation: CAMAG VideoSystem

Bahnbelegung: 1: Isoferulasäure, 2: Kaffeesäure, 3: Extrakt, 4: Fertigarzneimittel, 5: Hilfsstoffmischung, 6: Isoferulasäure, 7: Kaffeesäure

a) Nach der Derivatisierung V 366



Auswertung

Nach der Derivatisierung mit Naturstoffreagenz sieht man im mittleren R_f -Bereich auf den Bahnen 1 und 6 die blau fluoreszierende Zone der Isoferulasäure und auf den Bahnen 2 und 7 die blau fluoreszierende Zone der Kaffeesäure. Die Fingerprints von Droge und Extrakt zeigen Zonen, die diesen Zonen von Isoferulasäure und Kaffeesäure in Bezug auf Farbe, Form und Lage entsprechen. Auf Bahn 5 ist keine Zonen zu erkennen, die Hilfsstoffe stören die Chromatographie nicht. Die Fingerprints von Extrakt und Fertigarzneimittel entsprechen einander in Bezug auf Lage, Form und Farbe der Zonen.

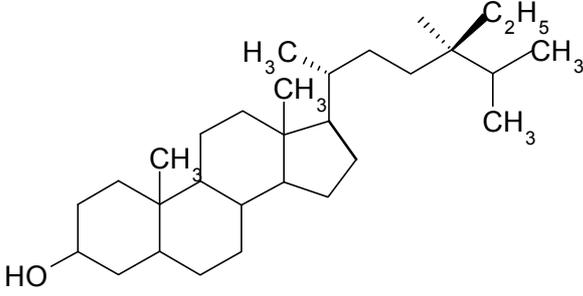
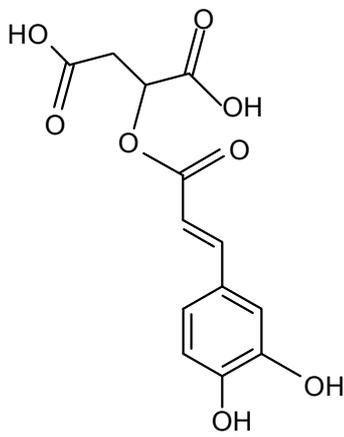
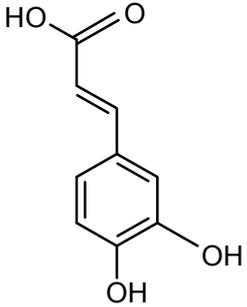
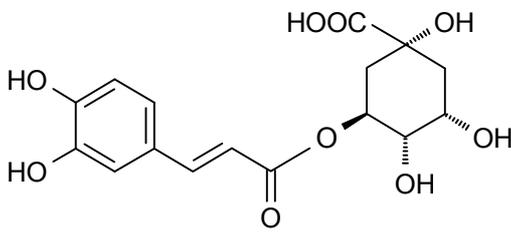
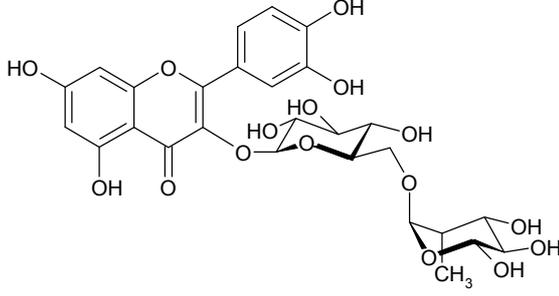
Brennnesselblätter

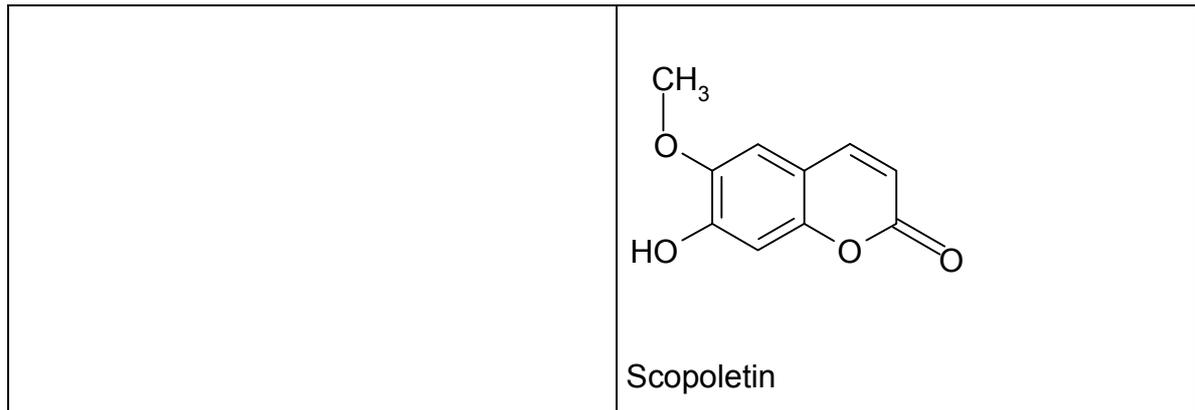
Urticae folium

Monographie: DAB 10, 2. Nachtrag 1993

Brennnesselblätter bestehen aus den ganzen oder geschnittenen, getrockneten Blättern von *Urtica dioica* L., *Urtica urens* L., deren Hybriden oder Mischungen von diesen.

Arzneilich wird die Droge als Tee verwendet oder zu Trockenextrakten verarbeitet. Auszugsmittel sind in der Regel Ethanol unterschiedlicher Konzentrationen, Wasser und Isopropanol. Das DEV ist in der Regel 5 bis 10:1, bei isopropanolischen Extrakten kann auch ein DEV von 19-33:1 vorkommen.

Weitere Inhaltstoffe	Inhaltsstoffe als Vergleichssubstanzen
 <p>β-Sitosterol</p>	 <p>Kaffeoyläpfelsäure</p>
 <p>Kaffeesäure</p>	 <p>Chlorogensäure</p>
	 <p>Rutin</p>



Arbeitsvorschrift

Stationäre Phase:

HPTLC Kieselgel 60 F 254, 20 X 10 cm (vorgewaschen)

Fließmittel:

Ethylacetat	50 VT
Methanol	4 VT
Wasser	4 VT
Ameisensäure	2,5 VT

Untersuchungslösung:

500 mg pulverisierte Droge (Siebanalyse gemäß Ph. Eur., Zerkleinerungsgrad "feinst gemahlen") werden mit 10 mL Ethanol 70 % versetzt, 10 min im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Das Filtrat wird unter Vakuum zur Trockne einrotiert und in 1 mL Ethanol 70 % wieder aufgenommen.

Referenzsubstanzen:

Scopoletin, Kaffeoylepfelsäure, Chlorogensäure, Rutin

Vergleichssubstanzen:

Hyperosid

Referenzlösungen:

Je 1 mg Referenzsubstanz wird in je 10 mL Methanol gelöst. Die Referenzlösungen werden vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Probenauftragung:

Werden die Untersuchungs- und Referenzlösungen automatisch aufgetragen, gelten die folgenden Auftragemengen für 8 mm Banden:

Untersuchungslösung (en) : 2 µL,

Referenzlösung Scopoletin: 1 µL,

Referenzlösung Kaffeoyläpfelsäure: 3 µL,

Referenzlösung Chlorogensäure: 2 µL,

Vergleichslösung Hyperosid: 10 µL

Referenzlösung Rutosid: 10 µL

Auftragepositionen der ersten Bahn ist mind. 20 mm von linken Plattenrand und 8 mm vom unteren Plattenrand. Nach dem Probenauftragen bleibt die Platte 5 min an der Luft liegen.

Chromatographie:

20 x 10 cm Doppeltrogkammer, Kammersättigung 10 min mit Filterpapier, Trennstrecke 6 cm. Nach beendeter Chromatographie wird die Platte bis zum Verschwinden des Fließmittelgeruches im Warmluftstrom getrocknet.

Detektion:

a) UV 254 nm (UV₂₅₄)

b) UV 366 nm (UV₃₆₆)

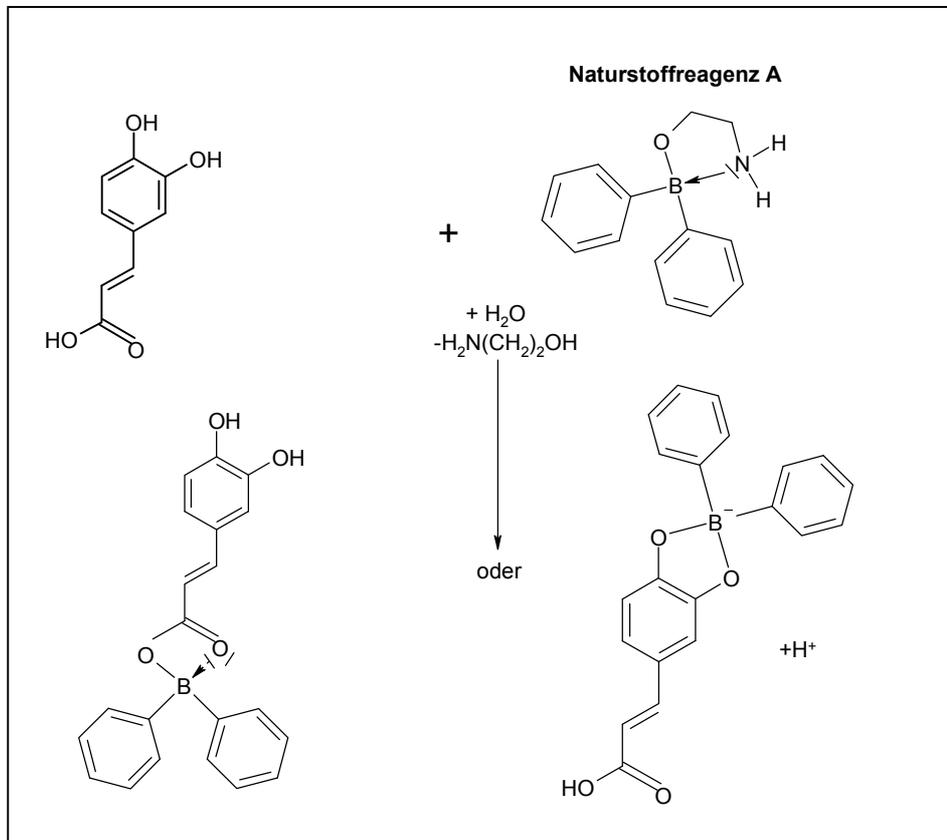
c) UV 366 nm (UV₃₆₆) nach der Derivatisierung mit Naturstoffreagenz und Macrogollösung

d) Im Weißlicht nach der Derivatisierung mit Naturstoffreagenz und Macrogollösung

Derivatisierungsreagenz:

Naturstoffreagenz: 1 % 2-Aminoethyldiphenylborinat in Methanol (m/V), Macrogol 400: 5 % in Methanol.

Detektionsreaktion:



Diphenylborsäure- β -aminoethylester, Aminoethyldiphenylborinat (Naturstoffreagenz A): Verwendet werden 0,5 bis 1 % Lösungen in Methanol, Ethanol oder Ethylacetat. Durch Komplexbildung mit dem Reagenz fluoreszieren die Substanzflecken. Die Fluoreszenzintensität kann durch Nachbesprühen mit Polyethylenglykol (PEG)-Lösung verstärkt werden. Verwendet wird meist eine 5 % methanolische Lösung von PEG 400. Um die Platten mit ausreichenden Reagenzmengen besprühen zu können, können die Platten vor der Derivatisierung erwärmt werden.

Beispiel:

Brennnesselblätter, dünnschichtchromatographische Untersuchung unterschiedlicher Chargen der Droge *Urticae folium*.

Relative Feuchte: 29,0 %

Probenauftragung: CAMAG ATS 4

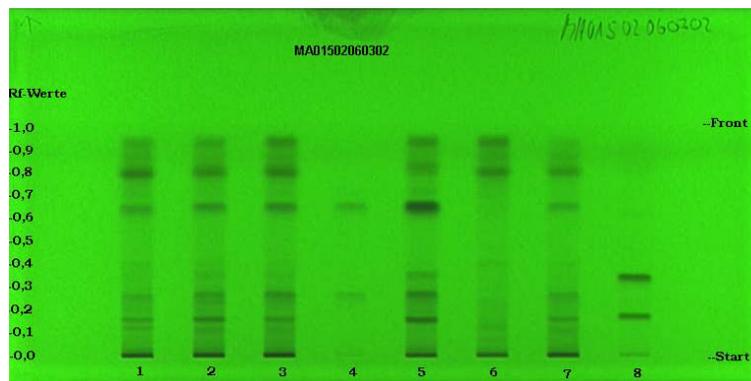
Temperatur: 29,1 °C

Derivatisierung: Sprühen

Dokumentation: CAMAG VideoSystem

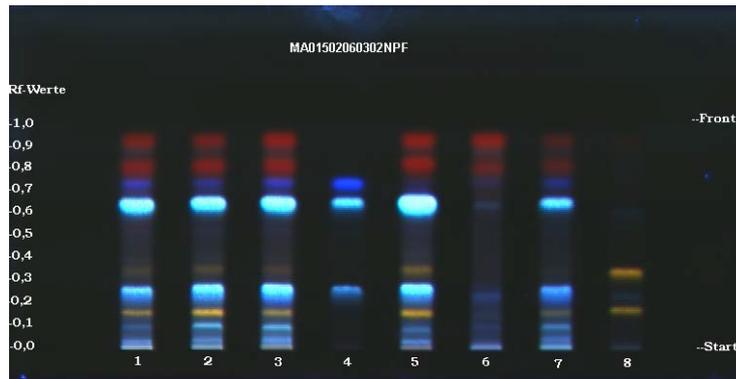
Bahnbelegung: 1: Brennnesselblätter Ch.: 000189, 2: Brennnesselblätter Ch.: 11587, 3: Brennnesselblätter Ch.: 31585, 4: Scopoletin, Kaffeoyläpfelsäure, Chlorogensäure, 5: Brennnesselblätter Ch.: 022579, 6: Brennnesselblätter Ch.: 000857, 7: Brennnesselblätter Ch.: 004610 , 8 Hyperosid, Rutosid

a) Vor der Derivatisierung UV $\lambda=254$ nm

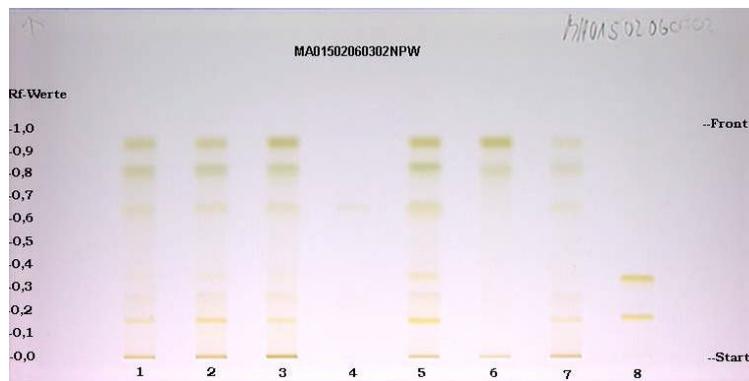


b) Vor der Derivatisierung UV $\lambda=366$ nm



c) Nach der Derivatisierung UV $\lambda=366$ 

d) Nach der Derivatisierung im Tageslicht



Auswertung

Vor der Derivatisierung erkennt man unter UV_{254} die Referenzsubstanzen Kaffeoyläpfelsäure, Chlorogensäure und Rutosid deutlich als dunkle Zonen im mittleren bis unteren R_f -Bereich. Hyperosid ist ebenfalls als dunkle Zone im mittleren R_f -Bereich zu sehen. Die Untersuchungslösungen auf den Bahnen 1-3, 5 und 7 zeigen dunkle Zonen, deren Lage und R_f -Werte mit den Zonen der Kaffeoyläpfelsäure und der Chlorogensäure übereinstimmen. Die Untersuchungslösung auf Bahn 6 zeigt diese dunklen Zonen nicht. Alle Untersuchungslösungen zeigen im unteren R_f -Bereich eine dunkle Zone, die der Zone des Rutosid in Bezug auf Lage und Form entspricht.

Vor der Derivatisierung erkennt man unter **UV₃₆₆** die Referenzsubstanzen Scopoletin, Kaffeoyläpfelsäure und Chlorogensäure als blau fluoreszierende Zonen. Die Untersuchungslösungen auf den Bahnen 1,2,3,5 und 7 zeigen Zonen, die mit diesen drei Zonen vergleichbar sind in Bezug auf die Lage, Form, Farbe und Fluoreszenz. Im unteren R_f-Bereich sind weitere blau fluoreszierende Zonen zu sehen. Im oberen R_f-Bereich, nahe der Fließmittelfront, sind rote Zonen (Chlorophyll) zu erkennen. Im Fingerprint der Untersuchungslösung auf Bahn 6 sind nur wenige schwach blau fluoreszierende Zonen zu erkennen.

Nach der Derivatisierung mit Naturstoffreagenz ist die Fluoreszenz der Zonen sehr viel intensiver. Man erkennt unter UV₃₆₆ die Referenzsubstanzen Scopoletin, Kaffeoyläpfelsäure und Chlorogensäure als hellblau fluoreszierende Zonen. Hyperosid und Rutosid sieht man als gelbe Zonen im unteren bis mittleren R_f-Bereich. Die Untersuchungslösungen auf den Bahnen 1,2,3,5 und 7 zeigen Zonen, die mit den drei Zonen von Scopoletin, Kaffeoyläpfelsäure und Chlorogensäure vergleichbar sind in Bezug auf die Lage, Form, Farbe und Fluoreszenz. Im unteren R_f-Bereich sind weitere blau fluoreszierende Zonen und eine gelbe Zone, die der Zone des Rutin in Bezug auf Lage, Form und Farbe entspricht zu sehen. Unterhalb der Zone des Hyperosids zeigen die Untersuchungslösungen auf den Bahnen 1,2,3 und 5 eine schwache gelbe Zone. Im oberen R_f-Bereich, nahe der Fließmittelfront, sind rote Zonen (Chlorophyll) zu erkennen. Im Fingerprint der Untersuchungslösung auf Bahn 6 sind nur wenige schwach blau fluoreszierende Zonen zu erkennen.

Nach **Derivatisierung** erkennt man im **Weißlicht** die Referenzsubstanzen Rutin und Hyperosid als gelbe Zonen. Die Fingerprints der Untersuchungslösungen auf den Bahnen 1,2,3,5 und 7 zeigen eine gelbe Zone, die der Zone des Rutosids in Bezug auf Lage, Form und Farbe entspricht. Im mittleren R_f-Bereich sieht man weitere gelbe Zonen und im oberen R_f-Bereich die grünen Zonen des Chlorophylls.

10.5 Identifizierung der Kaffeoyläpfelsäure

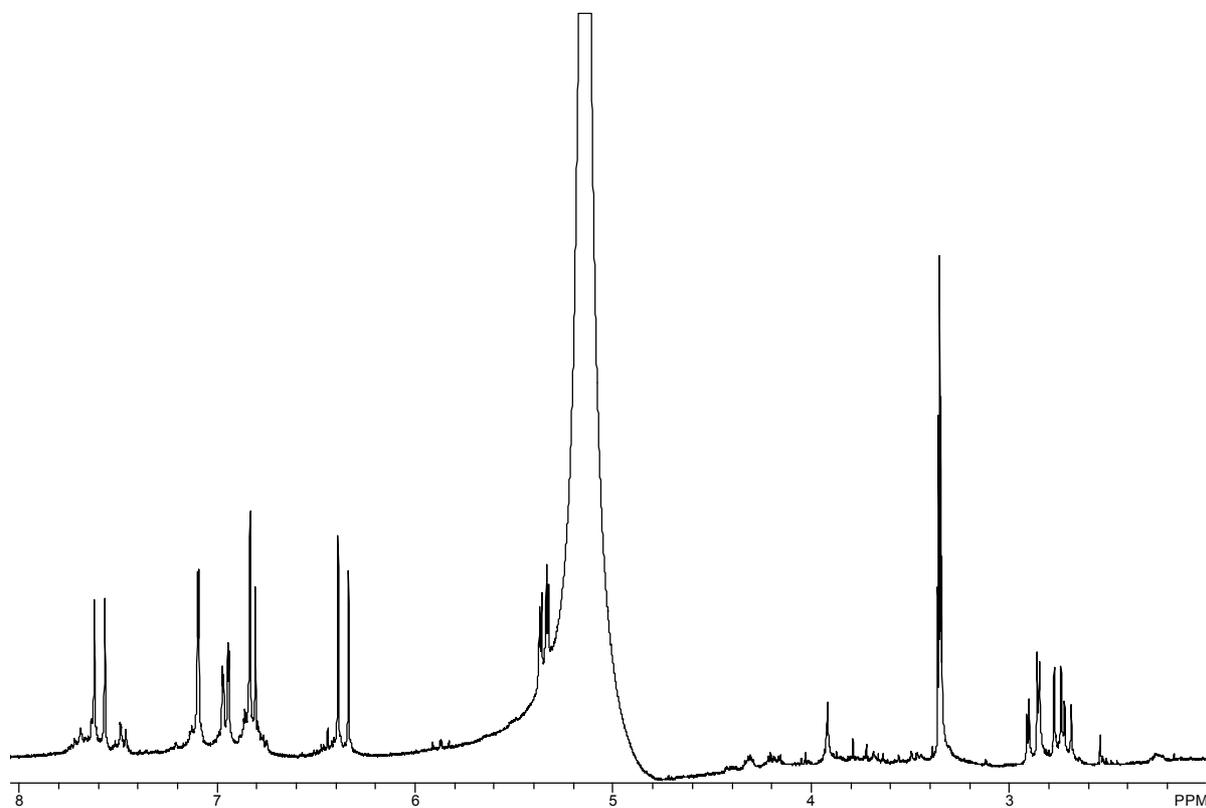


Abbildung 10-7: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Kaffeoyläpfelsäure

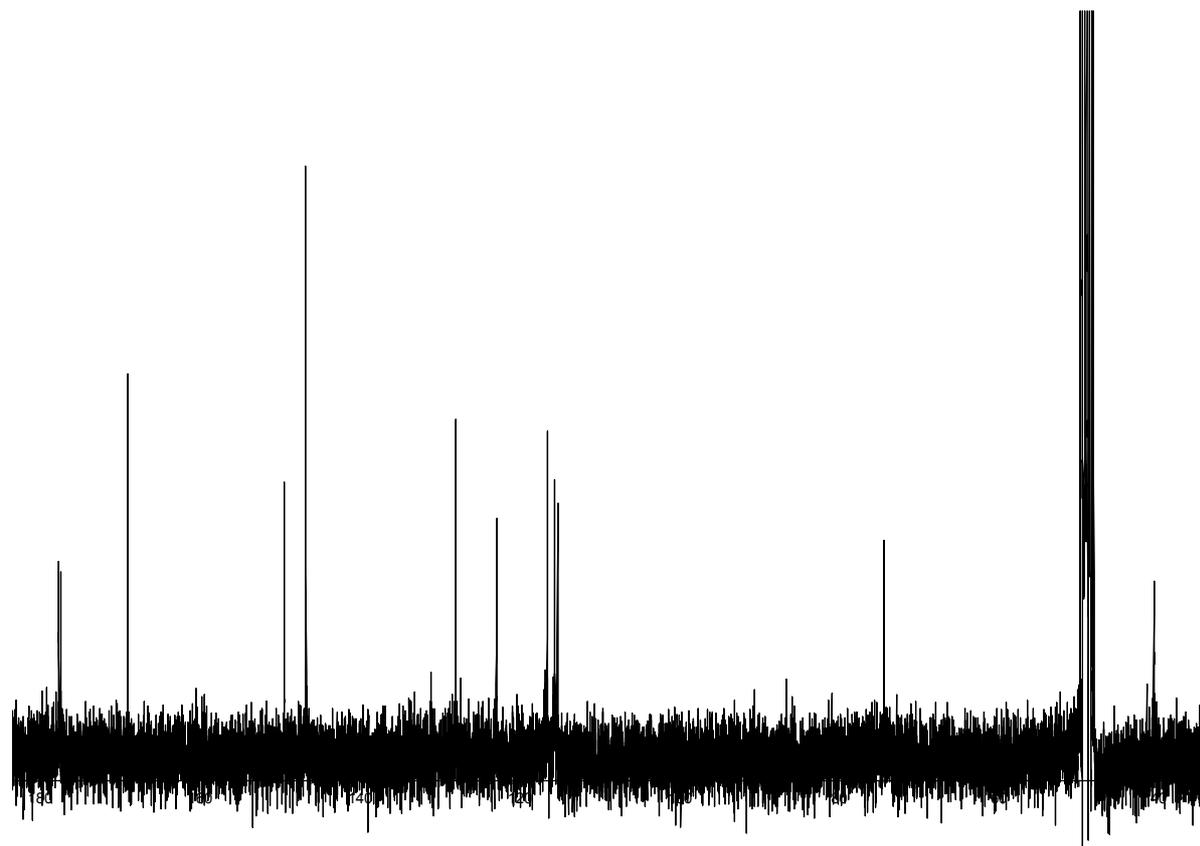


Abbildung 10-8: ^{13}C NMR-Spektrum der Kaffeoyläpfelsäure

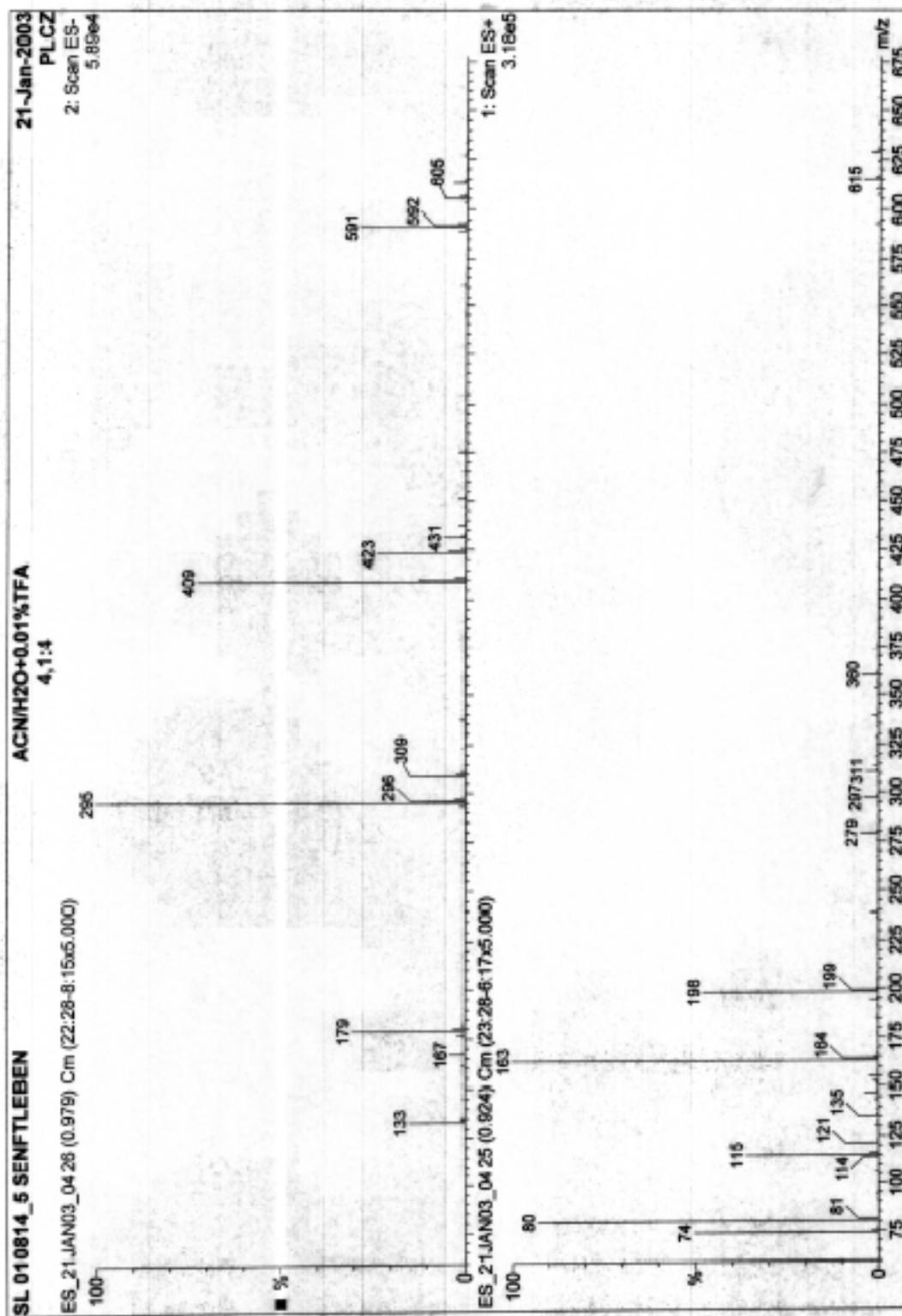


Abbildung 10-9: FAB-MS-Spektren der Kaffeoylquinsäure

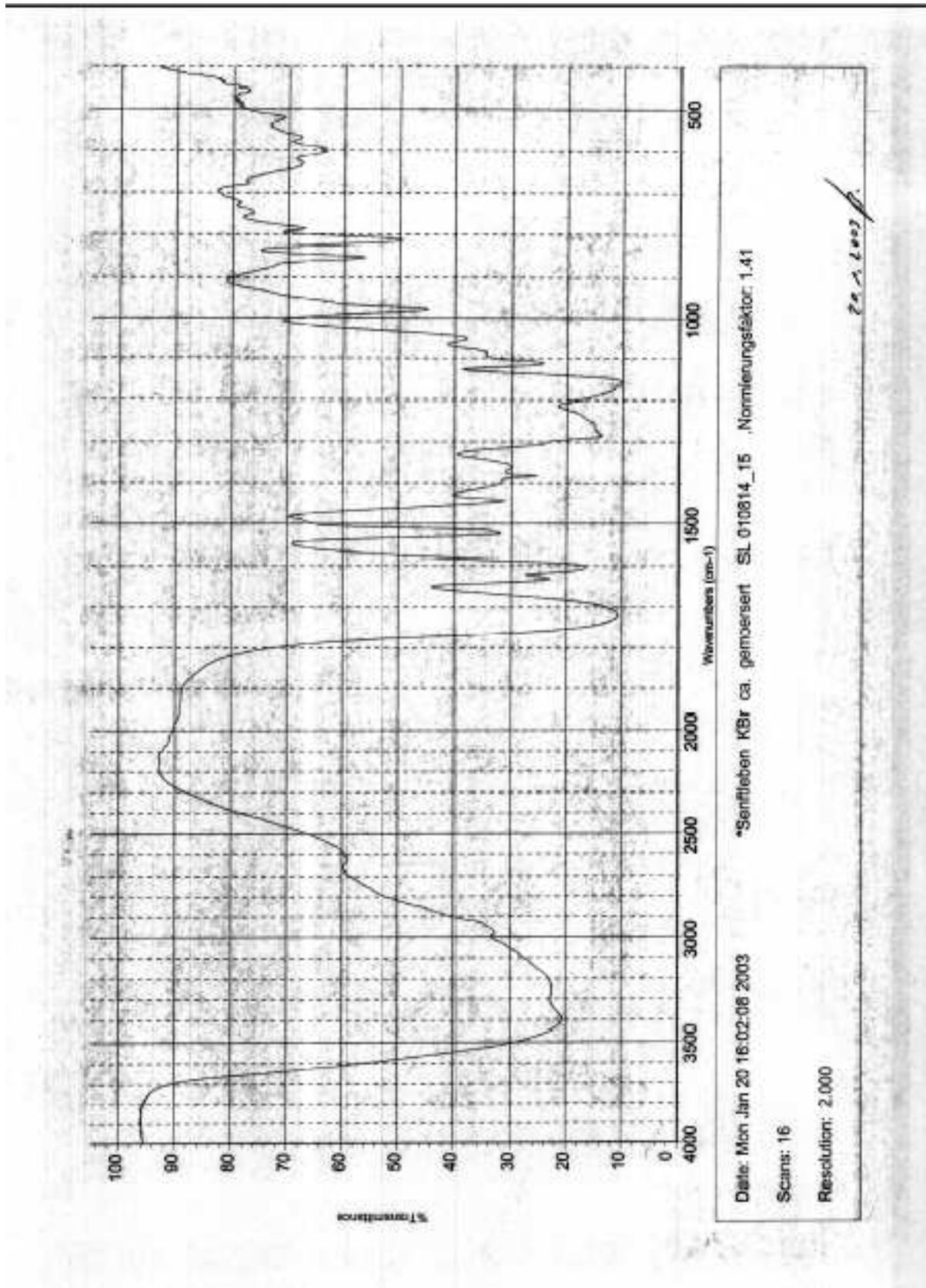


Abbildung 10-10: IR_Spektrum der Kaffeoyläpfelsäure

10.6 Qualitätssicherungsdokumente der virtuellen "Firma Muster"

Dokumentvorlagen

SOP:
Dünnschichtchromatographie (DC) in der qualitativen Analytik von Pflanzen und daraus hergestellten Zubereitungen

1. Zielsetzung

2. Geltungsbereich

3. Anwendung des Verfahrens

3.1 Produktentwicklung

3.2 Qualitätskontrolle

3.3 Stabilität

Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen

4. Durchführung des Verfahrens

Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie

Allgemeine Arbeitsanweisung Methodenentwicklung Dünnschichtchromatographie

5. Validierung des Verfahrens

Allgemeine Arbeitsanweisung
Validierung der qualitativen Dünnschichtchromatographie

Firma: Muster	SOP- Nr.: DC-01 Dünnschichtchromatographie in der qualitativen Analytik von Pflanzen und daraus hergestellten Zubereitungen	Seite 1 von 4 Version: 00
---------------	--	------------------------------

SOP:
Dünnschichtchromatographie (DC)
in der qualitativen Analytik von Pflanzen und daraus
hergestellten Zubereitungen

Verteiler:

Erstellt am:	Geprüft am:	Genehmigt am:
Von:	Von:	Datum:
Unterschrift:	Unterschrift:	Unterschrift:

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	SOP- Nr.: DC-01 Dünnschichtchromatographie in der qualitativen Analytik von Pflanzen und daraus hergestellten Zubereitungen	Seite 2 von 4 Version: 00
---------------	--	------------------------------

Inhalt:

	Seite
1 Zielsetzung	3
2 Geltungsbereich und Verantwortlichkeiten	3
3 Zweck des Verfahrens	3
4 Durchführung	3
5 Validierung	4
6 Pflege, Überwachung / Aktualisierung, Archivierung	4
7 Anhang	4

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	SOP- Nr.: DC-01 Dünnschichtchromatographie in der qualitativen Analytik von Pflanzen und daraus hergestellten Zubereitungen	Seite 3 von 4 Version: 00
---------------	--	------------------------------

1 Zielsetzung

In dieser SOP wird die Vorgehensweise bei der Anwendung des analytischen Verfahrens Dünnschichtchromatographie geregelt.

Die in dieser SOP benannten Arbeitsanweisungen sind die Grundlage für die Erstellung von spezifischen Prüfanweisungen.

2 Geltungsbereich

Diese Richtlinie gilt für alle Bereiche, in denen das Verfahren qualitative Dünnschichtchromatographie angewendet wird. Verantwortlich ist der jeweilige Bereichs- bzw. Abteilungsleiter.

3 Anwendung des Verfahrens

Das Verfahren wird in den Bereichen Entwicklung, Qualitätskontrolle und Stabilität angewendet. Allgemeine Arbeitsanweisungen sind Grundlage der Anwendung des Verfahrens qualitative Dünnschichtchromatographie auf den genannten Gebieten.

Auf der Basis dieser Arbeitsanweisungen werden spezifische Prüfanweisungen erstellt.

4 Durchführung

Dünnschichtchromatographische Verfahren werden gemäß der Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender Prüfanweisungen durchgeführt.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	SOP- Nr.: DC-01 Dünnschichtchromatographie in der qualitativen Analytik von Pflanzen und daraus hergestellten Zubereitungen	Seite 4 von 4 Version: 00
---------------	--	------------------------------

5 Validierung

Die Validierung des Verfahrens erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsanweisung "Validierung der qualitativen Dünnschichtchromatographie".

6 Pflege, Überwachung/Aktualisierung, Archivierung

Diese Themen sind Gegenstand entsprechender SOP`s.

7 Anhang

Änderungsnotizen, Änderungsindex

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung DC im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen	Seite 1 von 5 Version: 00
---------------	---	------------------------------

**Allgemeine Arbeitsanweisung
Dünnschichtchromatographie im Rahmen von
Stabilitätsuntersuchungen**

Verteiler:

Erstellt am:	Geprüft am:	Genehmigt am:
Von:	Von:	Datum:
Unterschrift:	Unterschrift:	Unterschrift:

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung DC im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen	Seite 2 von 5 Version: 00
---------------	---	------------------------------

Inhalt:

	Seite
1 Zielsetzung	3
2 Stabilitätsuntersuchungen	3
3 Verfahren	3
4 Durchführung	3
5 Auswertung	4
6 Dokumentation	4
7 Mitgeltende Unterlagen	4
8 Anhang	5

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung DC im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen	Seite 3 von 5 Version: 00
---------------	--	------------------------------

1 Zielsetzung

Diese Arbeitsanweisung beschreibt die Anwendung der Dünnschichtchromatographie für Stabilitätsuntersuchungen. Sie gilt in Zusammenhang mit der Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie". Auf der Grundlage dieser Anweisung werden spezifische Prüfanweisungen erstellt.

2 Stabilitätsuntersuchungen

Die im Anhang aufgeführten CPMP-Richtlinien schreiben die Durchführung von Stabilitätsuntersuchungen für Phytopharmaka vor. Die Prüfzeitpunkte orientieren sich an diesen Leitlinien.

3 Verfahren

Für Stabilitätsuntersuchungen wird unter anderem das Verfahren Dünnschichtchromatographie angewendet, da die Fingerprintanalytik es ermöglicht, Extrakte in ihrer Gesamtheit qualitativ zu analysieren. Die dünnschichtchromatographischen Methoden, die im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt werden, sollten ausreichend validiert, das heißt selektiv, robust, reproduzierbar und stabilitätsinduzierend sein. Es wird auf die allgemeine Arbeitsanweisung "Validierung der qualitativen Dünnschichtchromatographie" verwiesen.

4 Durchführung

Die Proben werden unter den vorgeschriebenen Bedingungen eingelagert und zu den festgelegten Zeitpunkten geprüft.

Die Chromatographie wird gemäß der Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" und darauf aufbauender Prüfanweisungen durchgeführt.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung DC im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen	Seite 4 von 5 Version: 00
---------------	--	------------------------------

5 Auswertung und Annahmekriterien

Die Chromatogramme werden mit dem "Startchromatogramm" und mit den im Rahmen der Stabilitätsprüfung für frühere Prüfzeitpunkte erstellten Chromatogrammen verglichen. Die Auswertung erfolgt durch visuellen Vergleich der Fingerprints.

Der Nachweis für die Stabilität der Probe ist erbracht, wenn die Fingerprints in Bezug auf Anzahl, Farbe, Intensität und Position der Zonen vergleichbar sind.

6 Dokumentation

Für die Dokumentation der Stabilität werden die gemäß der Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" dokumentierten Platten in einer Abbildung nebeneinander dargestellt.

Weiter werden aus den Chromatogrammen, die zu den unterschiedlichen Prüfzeitpunkten erstellt wurden, die zu vergleichenden Fingerprints mit einem geeigneten EDV-Programm "ausgeschnitten" und direkt nebeneinander dargestellt.

7 Mitgeltende Unterlagen

- Bedienungsanleitungen Dokumentationssysteme
- Bedienungsanleitung Horizontal-Entwicklungskammer
- Bedienungsanleitungen Probenauftragegeräte
- Bedienungsanleitungen von Sprüh- und Tauchvorrichtungen
- Bedienungsanleitung Plattenheizer
- SOP "Archivierung"
- SOP "Entsorgung von Abfällen im Laborbereich"
- Allgemeine Arbeitsanweisung "Dünnschichtchromatographie"
- Allgemeine Arbeitsanweisung "Validierung der qualitativen Dünnschichtchromatographie"

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung DC im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen	Seite 5 von 5 Version: 00
---------------	--	------------------------------

8 Anhang

CPMP-Richtlinien für die Stabilitätsprüfung:

- Note for Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Herbal Drugs, Herbal Drug Preparations and Herbal Medicinal Products (CPMP/QWP/2820/00)
- Note for Guidance on Quality of Herbal Medicinal Products (CPMP/QWP/2819/00)
- Note for Guidance on Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products (CPMP/QWP/122/02)

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie	Seite 1 von 10 Version: 00
---------------	---	-------------------------------

**Allgemeine Arbeitsanweisung
Dünnschichtchromatographie (DC)**

Verteiler:

Erstellt am:	Geprüft am:	Genehmigt am:
Von:	Von:	Datum:
Unterschrift:	Unterschrift:	Unterschrift:

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie	Seite 2 von 10 Version: 00
---------------	---	-------------------------------

Inhalt:

	Seite
1 Zielsetzung	3
2 Material und Geräte	3
2.1 Plattenmaterial	3
2.2 Auftragegeräte	4
2.3 Entwicklungskammern	4
2.4 Derivatisierungsvorrichtungen	4
2.5 Dokumentationssystem	5
3 Identifizierung und Dokumentation	5
4 Probenaufarbeitung	7
4.1 Droge	7
4.2 Extrakt	7
4.3 Fertigarzneimittel	7
5 Durchführung	8
6 Dokumentation	9
7 Mitgeltende Unterlagen	10

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie	Seite 3 von 10 Version: 00
---------------	---	-------------------------------

1 Zielsetzung

Diese allgemeine Arbeitsanweisung beschreibt die Durchführung der Dünnschichtchromatographie in den folgenden Bereichen:

Arzneimittelentwicklung

Kontrolle während der Herstellung

Kontrolle der Ausgangsstoffe

Kontrolle der Zwischenprodukte

Kontrolle der Endprodukte

Stabilitätsprüfungen (mitgeltendes Dokument ist die Arbeitsanweisung "Dünnschichtchromatographie im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen")

Auf der Grundlage dieser Arbeitsanweisungen werden Prüfanweisungen erstellt.

2 Material und Geräte

2.1 Plattenmaterial

Für die Dünnschichtchromatographie werden HPTLC-Platten der Firma Merck verwendet. Das Material anderer Hersteller kann verwendet werden, sofern experimentell belegt ist, dass qualitativ gleichwertige Ergebnisse erzielt werden.

Wenn in den entsprechenden Prüfanweisungen nicht anders spezifiziert, wird Kieselgel 60 F₂₅₄ als stationäre Phase eingesetzt. Nach Anzahl der Proben (1-7) oder (8-14) werden Platten der Größe 10 x 10 cm oder 20 x 10 cm verwendet.

Die Platten werden unter geeigneten Bedingungen gelagert und vor Gebrauch im Tageslicht und im UV-Licht auf Verunreinigungen oder Beschädigungen der Kieselgelschicht geprüft.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie	Seite 4 von 10 Version: 00
---------------	---	-------------------------------

In der Methodenentwicklung werden NICHT vorgereinigte Platten eingesetzt. Für die qualitative Analyse werden gereinigte Platten verwendet. Die Platten werden durch Einstellen in eine 20 x 10 cm bzw. 10 x 10 cm Doppeltrogkammer mit 20 mL bzw. 10 mL eines Gemisches aus Methanol und Ethylacetat (1:1 V/V) pro Trog gereinigt. Mehrere Platten können gleichzeitig vorgewaschen werden, solange sich die stationären Phasen nicht berühren. 15 Minuten nachdem das Fließmittel den oberen Plattenrand erreicht hat, werden die Platten aus der Kammer genommen und der obere Plattenrand wird mit einem Bleistiftstrich markiert, um bei späterer Verwendung die Laufrichtung zu erkennen. Die Platten werden im Trockenschrank bei 120°C für 20 Minuten getrocknet. Zum Abkühlen und Equilibrieren werden die Platten bis zur Verwendung in einem staubfreien Behälter (z. B. Exsikkator ohne Trockenmittel) aufbewahrt.

2.2 Auftragegeräte

Die Auftragung erfolgt automatisch oder manuell. Die Auftragegeräte und die Durchführung sind in den entsprechenden Prüfanweisungen spezifiziert.

2.3 Entwicklungskammern

Die Chromatographie wird in der Horizontal-Entwicklungskammer oder in der Doppeltrogkammer durchgeführt. Sofern in den Prüfanweisungen nicht anders spezifiziert, wird in der gesättigten Kammer entwickelt.

2.4 Derivatisierungsvorrichtungen

Zur Derivatisierung wird entsprechend spezifischer Prüfanweisung eine Sprüh- oder eine Tauchvorrichtung verwendet. Sofern Platten erhitzt werden müssen, erfolgt dies auf einem Plattenheizer.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie	Seite 5 von 10 Version: 00
---------------	---	-------------------------------

2.5 Dokumentationssystem

Für die Dokumentation der Dünnschichtchromatographie wird ein Videodokumentationssystem mit entsprechender Software (siehe Bedienungsanleitung des Videosystems unter 7) oder ein anderes cGMP-kompatibles digitales Dokumentationssystem verwendet.

3 Identifizierung und Dokumentation

Die Platten werden durch die Projektnummer und das Datum identifiziert. Für die Dokumentation werden festgelegte Buchstaben für die Wellenlänge des Lichtes und gegebenenfalls das Derivatisierungsreagenz dieser Nummer beigefügt.

A Identifizierung

Jede Platte wird durch die Beschriftung eindeutig identifiziert und im Laborjournal registriert. Die Angaben „Bzzzjjmmttx“ müssen auf der Platte vermerkt sein. Dabei bedeuten:

Bzzz = Projektnummer bestehend aus einem Großbuchstaben und drei Zahlen (Bsp.: A001)

jjmmtt = Datum (Bsp.: 010618)

xx = laufende Plattennummer an dem bestimmten Datum (Bsp.: 01)

Das Beispiel A00101061801 bezeichnet die erste Platte, die am 18.06.01 im Rahmen des Projektes A001 entwickelt wurde.

Die Beschriftung wird in der rechten oberen Ecke der Platte vorgenommen. Platten, die im Tageslicht oder im UV-Licht bei $\lambda=254$ nm ausgewertet werden, sind mit einem Bleistift zu beschriften, Platten, die im UV-Licht bei $\lambda=366$ nm ausgewertet werden, mit einem Fluoreszenz-Schreiber.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie	Seite 6 von 10 Version: 00
---------------	---	-------------------------------

B Dokumentation

Bei der Dokumentation der Platte mit dem Video-Dokumentationssystem wird die Beschriftung der Platte für die Bezeichnung des Bildes übernommen und durch einen Zusatz für die entsprechende Wellenlänge und das Derivatisierungsreagenz wie folgt ergänzt:

Keine Ergänzung: Aufnahme im UV-Licht bei 254 nm

F: Aufnahme im UV-Licht bei 366 nm

W: Aufnahme im Weißlicht (Auflicht)

Wt: Aufnahme im Weißlicht (Durchlicht)

Wtr: Aufnahme im Weißlicht (Durch- und Auflicht)

Die folgenden Abkürzungen für Derivatisierungsreagenzien sind festgelegt:

S: Schwefelsäurereagenz

A: Anisaldehyd-Reagenz

N: Ninhydrin

I: Joddampf

D: Dragendorff-Reagenz

NP: Naturstoffreagenz

Weitere Reagenzien werden nach Bedarf in Prüfvorschriften definiert.

Beispiel: A00300072508NPF bezeichnet die Aufnahme der achten Platte vom 25.07.00, die im Projekt A003 entwickelt, mit Naturstoffreagenz derivatisiert und unter UV $\lambda=366$ nm aufgenommen wurde.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie	Seite 7 von 10 Version: 00
---------------	---	-------------------------------

4 Probenaufarbeitung

4.1 Droge

Sofern in der entsprechenden Prüfanweisung nicht anders spezifiziert, wird die Droge in einer geeigneten Mühle klein gemahlen. Eine Siebanalyse gemäß der Anweisung des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur. 4.00) wird durchgeführt.

Das Pulver sollte den Anforderungen für feines Pulver entsprechen (Kapitel 2.9 Methoden der pharmazeutischen Technologie, 2.9.12 Siebanalyse).

Je nach Inhaltsstoff oder Inhaltsstoffgruppe, die identifiziert werden soll, ist in den Prüfanweisungen ein geeignetes Lösungsmittel und geeignete Bedingungen für die Extraktion angegeben.

4.2 Extrakt

Für die Aufarbeitung der Extrakte werden geeignete Lösungsmittel gemäß entsprechender Prüfanweisung verwendet. Wurden Stellmittel oder andere Hilfsmittel für die Herstellung des Extraktes verwendet, werden diese im Rahmen der Validierung ebenfalls gemäß entsprechender Prüfanweisung aufgearbeitet.

4.3 Fertigarzneimittel

Es werden feste orale Arzneiformen (Tabletten, Dragees, Kapseln) mit einem oder mehreren Extrakten als Wirkstoff geprüft. Die Aufarbeitung der Fertigarzneimittel und der entsprechenden Hilfsstoffe erfolgt gemäß entsprechender Prüfanweisung.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie	Seite 8 von 10 Version: 00
---------------	---	-------------------------------

5 Durchführung

Sofern in Prüf- oder Arbeitsanweisungen nicht anders geregelt, erfolgt die Durchführung der Dünnschichtchromatographie nach dem folgenden allgemeinen Schema: Die Auftragung der Untersuchungslösung(en) auf die Platte erfolgt automatisiert. Banden von 8 mm Länge werden strichförmig auf die Platte gesprüht, der Bahnabstand beträgt mindestens 12 mm (gemessen von den Mittelpunkten der Banden), der Abstand vom unteren Plattenrand beträgt 8 mm, die erste Auftrageposition ist 20 mm (Mitte der ersten Bande) vom linken Plattenrand festgelegt. Die Auftragemengen von Probenlösung(en) und Referenzlösung(en) sind je 2 µL. Die Laufstrecke beträgt 6 cm vom unteren Plattenrand aus, am rechten Plattenrand wird das Ende der Strecke mit Bleistift markiert.

Für die Herstellung des Fließmittels werden die einzelnen Komponenten getrennt voneinander in geeigneten Volumenmesssystemen abgemessen. Volumina, die ≥ 10 mL sind, werden in einem Messzylinder abgemessen, kleinere Volumina mit einer Messpipette. Die Fließmittelkomponenten werden in einem geeigneten Gefäß gemischt und 1 min mit der Hand geschüttelt. Sofern sie nicht sofort verwendet werden, erfolgt die Lagerung in luftdicht verschlossenen Gefäßen (in der Regel Braunglasflaschen) im Labor bei Raumtemperatur.

Die Entwicklung erfolgt in der Regel in der Horizontal-Entwicklungskammer (es gelten die entsprechende Prüfanweisung und die Bedienungsanleitung der Kammer). Wenn das Fließmittel die markierte Laufstrecke erreicht hat, wird die Platte aus dem System herausgenommen. Anschließend wird die Platte direkt 5 Minuten in einem Luftstrom (evtl. geeigneter Haartrockner) getrocknet und gemäß Prüfanweisung ausgewertet.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie	Seite 9 von 10 Version: 00
---------------	---	-------------------------------

Sofern in der spezifischen Prüfanweisung nicht abweichend geregelt, wird jede Platte sowohl vor als auch nach der Derivatisierung im UV-Licht bei $\lambda=254$ nm, bei $\lambda=366$ nm und im Tageslicht ausgewertet.

Alle Fließmittel werden nur einmal verwendet. Die Entsorgung verwendeter Fließmittel erfolgt gemäß der SOP "Entsorgung von Abfällen im Laborbereich".

6 Dokumentation

Abbildungen der Platten werden mit dem Dokumentationssystem erstellt und archiviert. Dabei erfolgt die Dateibenennung wie unter Punkt 3 beschrieben. Hinsichtlich der Archivierung gelten die dafür relevanten SOPs.

Folgende Angaben werden dokumentiert:

- Datum
- Prüfbedingungen (Temperatur, relative Feuchte)
- Projekt/Projektnummer (Prüfung/Prüfnummer)
- Name der ausführenden Person (Namenskürzel und Unterschrift)
- Ziel der Prüfung
- Materialien und Hilfsmittel
- Chemikalien und Referenzsubstanzen mit Chargennummer und ggf. Verfalldatum
- Proben mit Chargennummer (genaue Bezeichnung und Herkunft), ggf. Verfalldatum
- Herstellung der Untersuchungslösungen (Probe(n) und Referenzsubstanz(en))
- Beschreibung der Methode
- Ergebnisse mit allen Abbildungen der Platte(n)

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie	Seite 10 von 10 Version: 00
---------------	---	--------------------------------

- Auswertung der Ergebnisse
- Bewertung und Schlussfolgerung(en)
- Angaben zur Dateiablage und Archivierung von Rohdaten und Bilddokumenten.

7 Mitgeltende Unterlagen

- Bedienungsanleitungen Dokumentationssysteme
- Bedienungsanleitung Horizontal-Entwicklungskammer
- Bedienungsanleitungen Probenauftragegeräte-Systeme
- Bedienungsanleitungen von Sprüh- und Tauchvorrichtungen
- Bedienungsanleitung Plattenheizer
- SOP "Archivierung"
- SOP "Entsorgung von Abfällen im Laborbereich"
- Allgemeine Arbeitsanweisung "Dünnschichtchromatographie im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen"
- Literaturliste

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Methodenentwicklung	Seite 1 von 8 Version: 00
---------------	--	------------------------------

<p style="text-align: center;">Allgemeine Arbeitsanweisung Methodenentwicklung in der Dünnschichtchromatographie</p>
--

Verteiler:

Erstellt am:	Geprüft am:	Genehmigt am:
Von:	Von:	Datum:
Unterschrift:	Unterschrift:	Unterschrift:

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Methodenentwicklung	Seite 2 von 8 Version: 00
---------------	--	------------------------------

Inhalt:

		Seite
1	Zielsetzung	3
2	Vorgehensweise/Planung	3
3	Probenaufarbeitung	4
4	Fließmitteloptimierung	4
5	Durchführung	6
6	Auswertung	7
7	Dokumentation	7
8	Mitgeltende Dokumente	7
9	Anhang	8

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Methodenentwicklung	Seite 3 von 8 Version: 00
---------------	--	------------------------------

1 Zielsetzung

Diese Arbeitsanweisung beschreibt die Vorgehensweise bei der Entwicklung einer dünnschichtchromatographischen Methode. Sofern in der Literatur eine Methode gefunden wird, die für das zu etablierende Prüfverfahren geeignet erscheint, sollte diese nachgearbeitet werden und gegebenenfalls optimiert und validiert werden. Wenn keine geeignete Methode in der Literatur gefunden wird, erfolgt die Methodenentwicklung nach dieser Arbeitsanweisung.

2 Vorgehensweise / Planung

Vor der Entwicklung wird das analytische Ziel des Prüfverfahrens und der dafür zu entwickelnden Methode festgelegt. Probenaufarbeitung und Fließmittelloptimierung sind die wichtigsten Schritte der Methodenentwicklung.

Bei der Aufarbeitung der Proben muss mit pharmazeutischem Sachverstand entschieden werden, ob und wie eine Zerkleinerung der Probe(n) vorgenommen wird und welche Lösungsmittel für die Probenvorbereitung verwendet werden können. Mit der Probenlösung und ggf. mit der/den Referenzlösung/en wird die Fließmittelloptimierung durchgeführt. Es werden Fließmittel miteinander gemischt, die entsprechend dem Snyder'schen Selektivitäts-Konzept Protonendonator-, Protonenakzeptor- und Dipolwirkungen in das Gemisch einbringen². Für die meisten der Trennprobleme ist es ausreichend, diesen Komponenten entweder einen "Verdünner" (z. B. Hexan) oder einen polaren "Modifier" (z. B. Wasser) zuzusetzen. Wird durch die Fließmittelloptimierung das analytische Ziel nicht erreicht, besteht die Möglichkeit der Optimierung des Plattenmaterials.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

² Nyiredi, Sz., Dallenbach-Toelke, K., Sticher, O., J. Planar Chromatogr. 4 (1988) 336-342

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Methodenentwicklung	Seite 4 von 8 Version: 00
---------------	--	------------------------------

Je nach chemischer Struktur der Probe(n) kann es sinnvoll sein, das chromatographische Verhalten auf anderen stationären Phasen als Kieselgel zu untersuchen. Außerdem kann versucht werden, durch Änderung der Kammerparameter (gesättigt/ungesättigt/vorkonditioniert) das chromatographische Ergebnis zu optimieren.

Derivatisierungsreagenzien werden mit Hilfe der angegebenen Literatur ausgewählt und untersucht (siehe mitgeltende Unterlage "Literaturliste").

3 Probenaufarbeitung

Die Etablierung und Optimierung einer geeigneten Probenvorbereitung erfolgt mit Hilfe der angegebenen Literatur (siehe mitgeltende Unterlage "Literaturliste"). Je nach Beschaffenheit der Probe sollte eine sinnvolle Möglichkeit gewählt werden, diese zu zerkleinern. Lösungsmittel für die Probenvorbereitung sollten unter Berücksichtigung der chemischen Struktur der nachzuweisenden Inhaltsstoffe und / oder Inhaltsstoffgruppen ausgewählt werden. Dabei sollten Lösungsmittel mit geringem toxischen Potential und/oder solche mit unproblematischer Entsorgung bevorzugt werden. Die Beschaffbarkeit aller für das Prüfverfahren nötigen Lösungsmittel muss gewährleistet sein.

4 Fließmitteloptimierung

Die Fließmitteloptimierung erfolgt in vier Stufen nach dem im Anhang aufgeführten Schema.

Stufe 1:

Die Untersuchungslösungen werden sequenziell mit folgenden, die Selektivitätsgruppen nach Snyder repräsentierenden Fließmitteln chromatographiert:

- Tertiär-Butylmethylether (BME)
- Diethylether (Et₂O)

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Methodenentwicklung	Seite 5 von 8 Version: 00
---------------	--	------------------------------

- Ethanol (EtOH)
- Methanol (MeOH)
- Isopropanol (2PrOH)
- Tetrahydrofuran (THF)
- Dichlormethan CH₂Cl₂)
- Ethylacetat (EtOAc)
- Acetonitril (ACN)
- Methylethylketon (MEK)
- Toluol (Toluen)
- Chloroform (CHCl₃)

Es werden die Fließmittel ausgewählt, mit denen Chromatogramme erhalten werden, die dem gewünschten chromatographischen Ergebnis am nächsten sind. Die Auswahl wird getroffen nach Bewertung der R_f -Werte der zu trennenden Analyten. Die Chromatogramme bzw. die Fließmittel werden in drei Gruppen geteilt a) $R_f > 0,8$ b) $0,3 < R_f < 0,8$ und c) $R_f < 0,3$. Die Fließmittel der Gruppen a) und c) werden in Stufe 2 übernommen, die Lösungsmittel aus Gruppe b) werden in Stufe 3 übernommen.

Stufe 2:

Fließmittel der Gruppe a) werden mit Hexan abgeschwächt, bis die R_f -Werte im Bereich von 0,3 – 0,8 liegen. Fließmittel der Gruppe c) werden mit kleinen Mengen (1–10 %) eines polaren Lösungsmittels (Wasser, Essigsäure, Diethylamin, Methanol) verstärkt, bis die R_f -Werte ebenfalls in dem Bereich von 0,3 – 0,8 liegen.

Es werden wieder die modifizierten Fließmittel ausgewählt, die Chromatogramme liefern, die dem gewünschten chromatographischen Ergebnis am nächsten sind.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Methodenentwicklung	Seite 6 von 8 Version: 00
---------------	--	------------------------------

Stufe 3:

Um die Selektivität der Trennung zu verbessern, werden die in Stufe 1 und 2 ausgewählten Fließmittel in verschiedenen Proportionen miteinander kombiniert (1:1, 1:9, 9:1 etc.). Je nach Struktur der zu trennenden Substanzen werden dem Fließmittel gegebenenfalls kleine Mengen an Wasser, Säure oder Base zugesetzt, um die Trennung einzelner Zonen zu verbessern.

Stufe 4:

Die Fließmittel bzw. Fließmittelkombinationen der Stufen 1 – 3, die Chromatogramme ergeben, die dem analytischen Ziel am nächsten sind, werden auf dieser letzten Stufe geringfügig verändert, um die Trennung zu optimieren. Die proportionalen Anteile der Lösungsmittel in dem Fließmittel werden variiert.

Sofern das analytische Ziel durch die Fließmitteloptimierung nicht erreicht wird, sollte diese mit anderen Fließmitteln aus den Selektivitätsgruppen wiederholt werden.

Alle Fließmittel werden nur einmal verwendet. Die Entsorgung verwendeter Fließmittel erfolgt gemäß der SOP "Entsorgung von Abfällen im Laborbereich".

5 Durchführung

Die Chromatographie erfolgt gemäß der Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie". In den folgenden Punkten wird von der Arbeitsanweisung abgewichen:

- Für die Entwicklung werden ungereinigte Platten verwendet.
- Es wird die Doppeltrogkammer verwendet.
- Die Chromatographie kann in der ungesättigten Kammer durchgeführt werden.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Methodenentwicklung	Seite 7 von 8 Version: 00
---------------	--	------------------------------

Mit dem optimierten Fließmittel wird auf der 4. Stufe des Optimierungsschemas die Chromatographie auf gereinigten Platten in der gesättigten Kammer (Doppeltrog- und/oder Horizontal Entwicklungskammer) durchgeführt.

6 Auswertung

Das analytische Ziel sollte optimal erreicht werden und es sollte sich bereits bei der Entwicklung der Methode zeigen, ob diese robust und reproduzierbar ist. Alle Parameter (Probenaufarbeitung, Fließmittelloptimierung, Kammertyp und Kammer-sättigung) werden nach diesen Kriterien festgelegt. Mit pharmazeutischem Sach-verstand wird entschieden, ob weitere Parameter, wie z. B. die Art der verwendeten Platten (stationäre Phase), optimiert werden sollen.

7 Dokumentation

Die Dokumentation erfolgt gemäß der Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie".

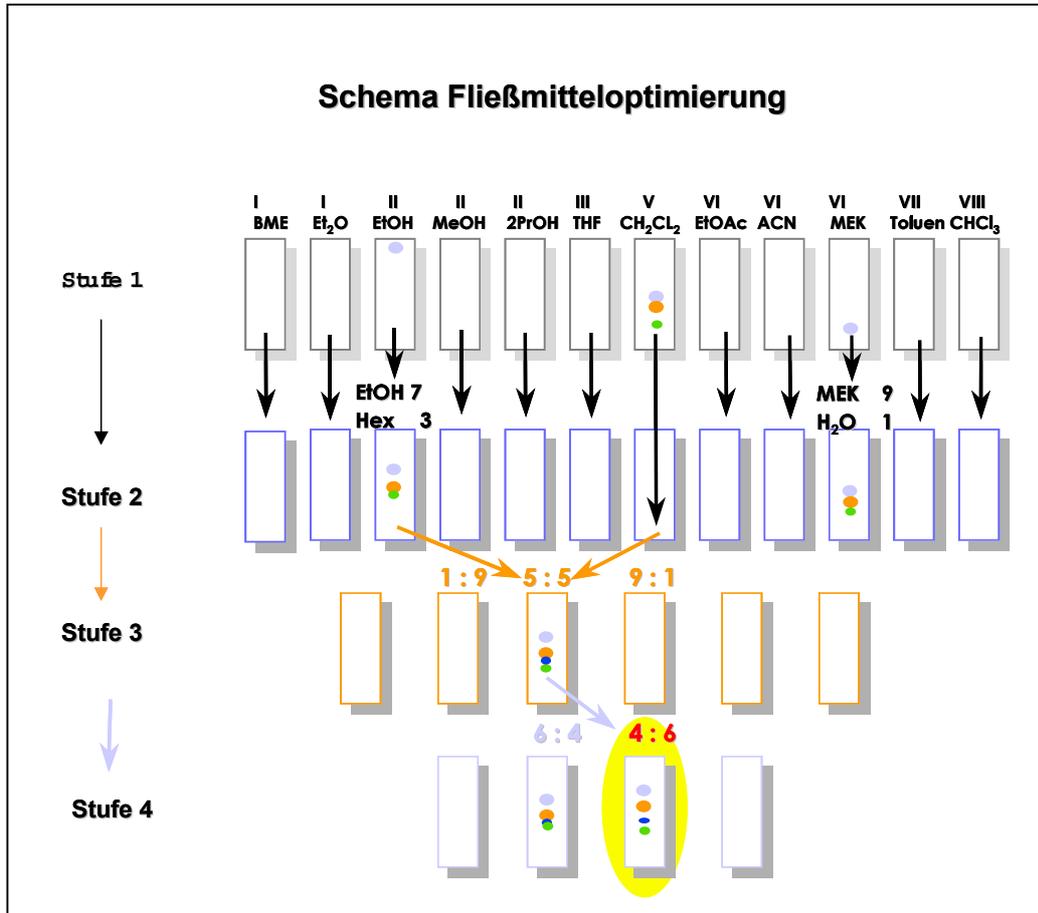
8 Mitgeltende Unterlagen

- Bedienungsanleitungen Dokumentationssysteme
- Bedienungsanleitung Horizontal-Entwicklungskammer
- Bedienungsanleitungen Probenauftragegeräte
- Bedienungsanleitungen von Sprüh- und Tauchvorrichtungen
- Bedienungsanleitung Plattenheizer
- SOP "Archivierung"
- SOP "Entsorgung von Abfällen im Laborbereich"
- Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromato-graphie"
- Literaturliste

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Methodenentwicklung	Seite 8 von 8 Version: 00
---------------	--	------------------------------

9 Anhang



Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 1 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	-------------------------------

**Allgemeine Arbeitsanweisung
Validierung der qualitativen Dünnschichtchromatographie
(DC)**

Verteiler:

Erstellt am:	Geprüft am:	Genehmigt am:
Von:	Von:	Datum:
Unterschrift:	Unterschrift:	Unterschrift:

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 2 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	-------------------------------

Inhalt:

1	Zielsetzung	4
2	Verfahren	5
3	Geräte und Anlagen	5
4	Validierungsparameter	6
4.1	Stabilitätsprüfungen des Analyten	6
4.1.1	Stabilität des Analyten vor der Chromatographie	6
4.1.2	Stabilität des Analyten während der Chromatographie	7
4.2	Selektivitätsprüfungen DC-Identitätsbestimmung einer Droge	8
4.2.1	Droge mit anerkanntem/n Wirkprinzip/ien	8
4.2.2	Droge ohne anerkanntes Wirkprinzip, aber mit charakteristischen Inhaltsstoffen	8
4.2.3	Droge ohne anerkanntes Wirkprinzip	9
4.2.4	Durchführung	9
4.2.5	Auswertung und Annahmekriterien	10
4.3	Selektivität der DC-Identitätsbestimmung eines Extraktes	10
4.3.1	Extrakt mit anerkanntem/n Wirkprinzip/ien	10
4.3.2	Extrakt ohne anerkanntes Wirkprinzip, aber mit charakteristischen Inhaltsstoffen	11

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 3 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	-------------------------------

4.3.3	Extrakt ohne anerkanntes Wirkprinzip	11
4.3.4	Durchführung	12
4.3.5	Auswertung und Annahmekriterien	12
4.4	Selektivität der DC-Identitätsbestimmung eines Fertigarzneimittels mit einem Wirkstoff (Monopräparat)	13
4.4.1	Extrakt mit anerkanntem/n Wirkprinzip/ien	13
4.4.2	Extrakt ohne anerkanntes Wirkprinzip, aber mit charakteristischen Inhaltsstoffen	13
4.4.3	Extrakt ohne anerkanntes Wirkprinzip	14
4.4.4	Durchführung	14
4.4.5	Auswertung und Annahmekriterien	15
4.5	Kombinationsfertigarzneimittel	15
5	Prüfungen zur Robustheit der Methode	16
5.1	Plattenmaterial	16
5.2	Temperatur	18
5.3	Kammersättigung	19
5.4	Mobile Phase	20
5.5	Trennstrecke	21
5.6	Trockenzeiten	22
5.7	Derivatisierung	23
6	Dokumentation	24
7	Mitgeltende Unterlagen	24

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 4 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	-------------------------------

1 Zielsetzung

Die ICH- bzw. CPMP-Leitlinien „Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology“, (CPMP/ICH/381/95; ICH Topic Q2A) und „Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures Methodology“ (CPMP/ICH/281/95; ICH Topic Q2B) schreiben für die Validierung der dünnenschichtchromatographischen Identitätsprüfung vor, die Selektivität³ des angewandten Verfahrens zu belegen. Neben Selektivitätsprüfungen werden Prüfungen zur Robustheit und Reproduzierbarkeit im Rahmen der Validierung durchgeführt. Validierungen für dünnenschichtchromatographische Verfahren werden in den folgenden Bereichen durchgeführt:

Arzneimittelentwicklung

Kontrolle während der Herstellung

Kontrolle der Ausgangsstoffe

Kontrolle der Zwischenprodukte

Kontrolle des Endproduktes

Stabilitätsprüfungen (es gilt die Arbeitsanweisung „Dünnschichtchromatographie im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen“)

Unter bestimmten Umständen kann die Revalidierung des Prüfverfahrens erforderlich sein, z. B. wenn sich Veränderungen des Herstellungsverfahrens, des Ausgangsstoffes oder in der Zusammensetzung des Endproduktes ergeben haben.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

³ Es wird der Begriff Selektivität verwendet anstatt Spezifität. In den UPAC Provisional Recommendations „Selectivity in Analytical Chemistry, Draft 27 February 2001“ stellt die UPAC die Überlappung beider Begriffe klar durch die Aussage „Specificity is the ultimate of Selectivity“).

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Validierung der qualitativen Dünnschichtchromatographie	Seite 5 von 24 Version: 00
---------------	---	-------------------------------

Dieser Validierungsplan muss keine Anwendung finden bei offiziellen und anerkannten Prüfverfahren (z. B. Arzneibuchmethoden). Werden solche Prüfverfahren im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen verwendet, sollte sicher gestellt sein, dass sie ausreichend robust, reproduzierbar und stabilitätsinduzierend sind (siehe Punkt 5 dieser Arbeitsanweisung).

Die beschriebenen Prüfungen (Validierungsparameter) sind eine Zusammenstellung möglicher Prüfungen, die durchgeführt werden können. Die Auswahl der im jeweiligen Validierungsfall sinnvollen Prüfungen (Validierungsparameter), deren Auswertung sowie die Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse obliegt der/den verantwortlichen Person/en mit ausreichendem pharmazeutischen Sachverstand.

2 Verfahren

Das Verfahren Dünnschichtchromatographie wird für qualitative Bestimmungen eingesetzt (Fingerprintanalytik).

3 Geräte und Anlagen

Verwendete Geräte und Anlagen müssen qualifiziert sein. Näheres wird über diesbezügliche SOPs geregelt.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 6 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	-------------------------------

4 Validierungsparameter

4.1 Stabilitätsprüfung des Analyten

4.1.1 Stabilität des Analyten vor der Chromatographie

Die Durchführung dieser Prüfung ist Voraussetzung für die Prüfung auf Selektivität.

Stabilität des Analyten vor der Chromatographie

Als Nachweis gilt die Stabilität in Lösung und auf der Platte.

Durchführung:

Die Probe wird zum Zeitpunkt Null gemäß zu validierender Prüfanweisung vorbereitet und direkt gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen auf Platte A aufgetragen (Untersuchungslösung 1). Untersuchungslösung 1 wird bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Probengläschen aufbewahrt.

Dieselbe Probe wird nach angemessener Zeit noch einmal gemäß zu validierender Prüfanweisung vorbereitet (Untersuchungslösung 2) und ebenfalls direkt auf Platte A neben Untersuchungslösung 1 aufgetragen.

Auf eine zweite Platte (B) werden die Untersuchungslösungen 1 und 2 nebeneinander aufgetragen.

Die Platten werden entwickelt, detektiert und dokumentiert gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen.

Auswertung:

Platte A zeigt die Stabilität des Analyten auf der Platte, Platte B die Stabilität des Analyten in Lösung.

Als Annahmekriterium für beide Platten gilt, dass die Fingerprints vergleichbar sind.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 7 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	-------------------------------

4.1.2 Stabilität des Analyten während der Chromatographie

Als Nachweis gilt eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie.

Durchführung:

Die Probe wird gemäß Arbeitsanweisung "Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen aufgearbeitet.

In der Regel werden 2 μ L der Probe punktförmig in der linken unteren Ecke einer 10 x 10 cm HPTLC-Platte aufgetragen. Die stationäre Phase wird gemäß der zu validierenden Prüfanweisung ausgewählt.

Bei der Auftragung ist der Abstand von 1 cm zum linken und 1 cm zum unteren Plattenrand einzuhalten.

Gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen wird die Platte 6 cm vom unteren Plattenrand aus entwickelt.

Die Platte wird getrocknet bis der Geruch des Fließmittels verschwunden ist.

Die Platte wird um 90° nach links gedreht und noch einmal gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen über eine Laufstrecke von 6 cm vom unteren Plattenrand aus entwickelt (frisches Fließmittel!).

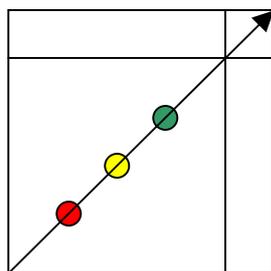


Abb. 1: Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Validierung der qualitativen Dünnschichtchromatographie	Seite 8 von 24 Version: 00
---------------	---	-------------------------------

Auswertung:

Die Zonen im Chromatogramm sollten auf einer Gerade zwischen der Auftrageposition und dem Schnittpunkt der Fließmittelfronten liegen.

4.2 Selektivitätsprüfungen der DC-Identitätsbestimmung einer Droge

4.2.1 Die Selektivität der DC-Identitätsprüfung einer Droge **mit anerkanntem/n Wirkprinzip/ien** wird beispielsweise nachgewiesen durch Chromatographie

- des authentischen Drogenmaterials und/oder
- der Referenzsubstanz (en) des Wirkstoffes/der Wirkstoffe und/oder
- Drogen anderer Taxa und/oder Chemotypen mit gleichem oder ähnlichem Inhaltsstoffmuster (Verfälschungen)
- im Vergleich mit der zu prüfenden Droge auf einer Platte.

4.2.2 Die Selektivität der DC-Identitätsprüfung einer Droge **ohne allgemein anerkanntem Wirkprinzip, aber mit charakteristischem/n bekanntem/n Inhaltsstoff/en** (Leitsubstanz/en) wird beispielsweise nachgewiesen durch Chromatographie

- des authentischen Drogenmaterials und/oder
- der Referenzsubstanz/en von Leitsubstanz/en und/oder
- Drogen anderer Taxa und/oder Chemotypen mit gleichem oder ähnlichem Inhaltsstoffmuster (Verfälschungen)
- im Vergleich mit der zu prüfenden Droge auf einer Platte.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 9 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	-------------------------------

4.2.3 Die Selektivität der DC-Identitätsprüfung einer **Droge ohne ein allgemein anerkanntes Wirkprinzip** wird beispielsweise nachgewiesen durch Chromatographie

- des authentischen Drogenmaterials und/oder
- der Referenzsubstanz/en von Leitsubstanz/en
- Drogen anderer Taxa und/oder Chemotypen mit gleichem oder ähnlichem Inhaltsstoffmuster (Verfälschungen)
- im Vergleich mit der zu prüfenden Droge auf einer Platte.

4.2.4 Durchführung

Von jeder der zu untersuchenden Drogen wird eine ausreichende Menge aufgearbeitet. Alle Proben werden gemäß der Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen vorbereitet.

Ggf. wird ca. 1 mg (je) Referenzsubstanz/en in (je) 10 mL eines geeigneten Lösungsmittels gelöst.

Alle Untersuchungslösungen werden nebeneinander auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen chromatographiert.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen Version: 00	Seite 10 von 24
---------------	--	--	-----------------

4.2.5 Auswertung und Annahmekriterien

a) Im Chromatogramm der zu prüfenden Droge muss die Zone der Referenzsubstanz (müssen die Zonen der Referenzsubstanzen) zu erkennen sein. Die Zonen müssen in Bezug auf Position und Farbe vergleichbar sein.

b) Die Fingerprints der zu prüfenden Droge und der Drogen anderer Taxa und/oder Chemotypen sollten voneinander zu unterscheiden sein.

Wird neben dem Probenmaterial der Droge auch Material der authentischen Droge für die Selektivitätsprüfung verwendet, so gelten die Punkte a und b entsprechend, zusätzlich gilt Punkt c.

c) Die Fingerprints der authentischen Droge und der zu prüfenden Droge müssen in den wesentlichen Zonen übereinstimmen. Position, Farbe und Intensität der Zonen müssen vergleichbar sein.

4.3 Selektivitätsprüfungen der DC-Identitätsbestimmung eines Extraktes

4.3.1 Die Selektivität der DC-Identitätsprüfung eines **Extraktes mit anerkanntem/n Wirkprinzip/ien** wird beispielsweise nachgewiesen durch Chromatographie

- des authentischen Extraktmaterials, falls dieses nicht vorhanden ist
- des authentischen Drogenmaterials und/oder
- der Referenzsubstanz/en der Wirksubstanz/en und
- der Hilfsstoffmischung (Stellmittel)
- im Vergleich mit dem zu prüfenden Extrakt auf einer Platte.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 11 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

4.3.2 Die Selektivität der DC-Identitätsprüfung eines Extraktes **ohne allgemein anerkanntem Wirkprinzip, aber mit charakteristischem/n, bekanntem/n Inhaltsstoff/en (Leitsubstanzen)** wird beispielsweise nachgewiesen durch Chromatographie

- des authentischen Extraktmaterials, falls dieses nicht vorhanden ist
- des authentischen Drogenmaterials und/oder
- der Referenzsubstanz/en von Leitsubstanz/en und
- der Hilfsstoffmischung (Stellmittel)
- im Vergleich mit dem zu prüfenden Extrakt auf einer Platte.

4.3.3 Die Selektivität der DC-Identitätsprüfung eines Extraktes **ohne ein allgemein anerkanntes Wirkprinzip** wird beispielsweise nachgewiesen durch Chromatographie

- des authentischen Extraktmaterials, falls dieses nicht vorhanden ist
- des authentischen Drogenmaterials und/oder
- der Referenzsubstanz/en der Leitsubstanz/en
- der Hilfsstoffmischung (Stellmittel)
- im Vergleich mit dem zu prüfenden Extrakt auf einer Platte.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 12 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

4.3.4 Durchführung

Die Menge Extrakt wird unter Berücksichtigung des DEV errechnet. Die Aufarbeitung aller Extraktproben erfolgt gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen.

Ca. 1 mg (je) Referenzsubstanz wird ggf. in (je) 10 mL eines geeigneten Lösungsmittels gelöst.

Die Menge Hilfsstoffmischung (Stellmittel), entsprechend der eingesetzten Menge Extrakt, wird aufgearbeitet gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen.

Alle Untersuchungslösungen werden nebeneinander auf die HPTLC-Platte aufgetragen und gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen chromatographiert.

4.3.5 Auswertung und Annahmekriterien

a) Im Chromatogramm des zu prüfenden Extraktes muss die Zone der Referenzsubstanz (müssen die Zonen der Referenzsubstanzen) zu erkennen sein. Die Zonen müssen in Bezug auf Position und Farbe vergleichbar sein.

b) Im Chromatogramm des zu prüfenden Extraktes müssen die Zonen der Wirksubstanz/en bzw. Leitsubstanz/en eindeutig sein; die Detektion darf nicht durch Hilfsstoffe (Stellmittel) gestört sein.

Wird neben dem zu prüfenden Extraktmaterial Probenmaterial des authentischen Extraktes und/oder der authentischen Droge für die Selektivitätsprüfung verwendet, so gelten zusätzlich die Punkte c und d.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 13 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

c) Die Fingerprints von authentischem Extrakt und authentischer Droge müssen vergleichbar sein.

d) Die Fingerprints des zu prüfenden Extraktes und des authentischen Extraktes und/oder der authentischen Droge müssen in den wesentlichen Zonen übereinstimmen. Position, Farbe und Intensität der Zonen müssen vergleichbar sein.

4.4 Selektivitätsprüfungen der DC-Identitätsbestimmung eines Fertigarzneimittels mit einem Extrakt als Wirkstoff (Monopräparat)

4.4.1 Die Selektivität der DC-Identitätsprüfung eines Extraktes **mit anerkanntem/n Wirkprinzip/ien** wird beispielsweise nachgewiesen durch Chromatographie

- des Fertigarzneimittels und
- des authentischen Extraktmaterials und/oder
- der Referenzsubstanz/en der Wirksubstanz/en und
- der Hilfsstoffmischung

auf einer Platte.

4.4.2 Die Selektivität der DC-Identitätsprüfung eines Extraktes **ohne anerkanntem Wirkprinzip, aber mit charakteristischem/n bekanntem/n Inhaltsstoff/en**

(Leitsubstanzen) wird beispielsweise nachgewiesen durch Chromatographie

- des Fertigarzneimittels und
- des authentischen Extraktmaterials und/oder
- der Referenzsubstanz/en von Leitsubstanz/en und
- der Hilfsstoffmischung

auf einer Platte.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Validierung der Dünnschichtchromatographie	qualitativen	Seite 14 von 24 Version: 00
---------------	--	--------------	--------------------------------

4.4.3 Die Selektivität der DC-Identitätsprüfung eines Extraktes **ohne ein allgemein anerkanntes Wirkprinzip** wird beispielsweise nachgewiesen durch Chromatographie

- des Fertigarzneimittels und
 - des authentischen Extraktmaterials und/oder
 - der Referenzsubstanz/en der Leitsubstanz/en und
 - der Hilfsstoffmischung
- auf einer Platte.

4.4.4 Durchführung

Die Aufarbeitung aller Proben des Fertigarzneimittels erfolgt gemäß der Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen.

Ggf. wird ca. 1 mg (je) Referenzsubstanz in (je) 10 mL eines geeigneten Lösungsmittels gelöst.

Die Menge Hilfsstoffmischung, die der eingesetzten Menge Fertigarzneimittel entspricht, wird ebenfalls gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen aufgearbeitet.

Alle Untersuchungslösungen werden nebeneinander auf die HPTLC-Platte aufgetragen und gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen chromatographiert.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 15 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

4.4.5 Auswertung und Annahmekriterien

- a) Im Chromatogramm des Fertigarzneimittels sind Wirksubstanz/en bzw. Leitsubstanz/en eindeutig zu identifizieren durch Vergleich mit dem Chromatogramm der Referenzsubstanz/en. Die Zonen stimmen überein in Bezug auf Position und Farbe.
- b) In den Chromatogrammen des Fertigarzneimittels und des Extraktes müssen die Zonen der Wirksubstanz/en bzw. Leitsubstanz/en eindeutig von den Zonen der Hilfsstoffe getrennt sein.
- c) Im Chromatogramm der Hilfsstoffmischung dürfen entweder gar keine Zonen zu sehen sein oder nur solche, die die Detektion der Zonen des Wirkstoffes bzw. der Leitsubstanz/en im Chromatogramm des Fertigarzneimittels nicht stören.

4.5 Selektivitätsprüfungen der DC-Identitätsbestimmung von Fertigarzneimitteln, die mehr als einen Extrakt als Wirkstoff enthalten (Kombinationspräparate).

Die Selektivitätsprüfungen der Identitätsprüfungen des Fertigarzneimittels unter 4.4 gelten entsprechend.

Zusätzlich wird ein Chromatogramm aller im Fertigarzneimittel enthaltenen Extrakte angefertigt. Die Chromatographie erfolgt nach der Arbeitsanweisung „Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen. Von jedem Wirkstoff wird die Menge eingesetzt, die dem Mischungsverhältnis im Fertigarzneimittel entspricht, die einzelnen Extrakte werden parallel auf einer Platte chromatographiert.

Die Fingerprints der Extrakte müssen eindeutig zu unterscheiden sein.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 16 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

5 Prüfungen zur Robustheit und Reproduzierbarkeit der Methode

In diesem Plan sind sechs Kriterien aufgeführt, die im Rahmen der Prüfung der Robustheit der Methode durchgeführt werden können. Die für die Ausführung verantwortliche Person muss mit pharmazeutischem Sachverstand beurteilen, welche Prüfungen im Einzelfall durchgeführt werden sollen, um die Robustheit der Methode sicher zu stellen. Die Robustheit der Methode zeichnet sich bereits im Rahmen der Entwicklung bzw. Optimierung der Methode ab.

Sofern unterschiedliche Personen an einer Methode arbeiten, können die erstellten Chromatogramme als Prüfung der Reproduzierbarkeit ausgewertet werden (Vergleich der Fingerprints, Vergleich der R_f -Werte einzelner Zonen).

5.1 Plattenmaterial

Die Robustheit der Methode bezüglich des Plattenmaterials ist besonders für die Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen wichtig, um sicher zu stellen, dass qualitativ vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

a) Chargenkonformität

Es kann geprüft werden, ob mit dem Material unterschiedlicher Hersteller qualitativ vergleichbare Ergebnisse erzielt werden, um eventuell auftretende Lieferengpässe des Hauptlieferanten überbrücken zu können. Da in den entsprechenden ICH-Richtlinien vorgeschrieben ist, Stabilitätsuntersuchungen über einen längeren Zeitraum durchzuführen, muss sichergestellt sein, dass unter Verwendung unterschiedlichen Chargen eines Herstellers qualitativ vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 17 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

Es werden beispielsweise 5 Platten unterschiedlicher Chargen geprüft.

Durchführung:

Die Platten werden im UV-Licht bei 254 nm auf Verunreinigungen und Verletzungen der Kieselgelschicht geprüft. Die Platten werden gemäß der Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" und darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen chromatographiert.

Annahmekriterien:

- Verunreinigungen und/oder Verletzungen der Kieselgelschicht sollten nicht auftreten.
- Die Chromatogramme der einzelnen Platten sollten vergleichbar sein in Bezug auf Lage und Farbe der Zonen, Farbe des Plattenhintergrundes und eventuell auftretende α und/oder β -Fronten.

Mit pharmazeutischem Sachverstand wird beurteilt, ob die Ergebnisse die Robustheit der Methode bezüglich des Plattenmaterials sicherstellen. Sind die einzelnen Fingerprints nicht miteinander vergleichbar, sollte festgelegt werden, dass Stabilitätsprüfungen ausschließlich mit dem Material einer Platten-Charge durchgeführt werden.

Sind die Fingerprints und die R_f -Werte einzelner Zonen der 5 Chromatogramme vergleichbar, so sind dies Kriterien für die Reproduzierbarkeit der Methode.

b) Plattenmaterial unterschiedlicher Hersteller

Es werden beispielsweise je 2 Platten von unterschiedlichen Herstellern geprüft.

Durchführung und Annahmekriterien gelten analog der Prüfung auf Chargenkonformität.

Sind die Fingerprints der Chromatogramme vergleichbar, ist es möglich, im Rahmen einer Stabilitätsprüfung Plattenmaterial unterschiedlicher Hersteller zu verwenden.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 18 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

5.2 Temperatur und Luftfeuchtigkeit

Wird die Chromatographie in nicht klimatisierten Labors durchgeführt, sollte sicher gestellt werden, dass die Methode unter Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen robust ist. Die Methode kann sonst nicht für Stabilitätstests eingesetzt werden.

In dem Labor, in dem die Dünnschichtchromatographie durchgeführt wird, herrschen im Sommer oft hohe Temperaturen und entsprechend schwankende Luftfeuchtigkeit. Die Prüfung der Robustheit der Methode erfolgt beispielsweise bei „normaler“ Temperatur (20-25°C) und bei Temperatur um 30°C gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" und darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen.

Annahmekriterien:

Die Chromatogramme entsprechen einander in Bezug auf die Lage (!), Farbe, und Anzahl der Zonen.

Verändern sich die Lage der Zonen oder andere Parameter in Abhängigkeit von Temperatur und Luftfeuchtigkeit, wird mit pharmazeutischen Sachverstand beurteilt, ob die Dünnschichtchromatographie unter klimatisierten Bedingungen durchgeführt werden soll, um die Robustheit der Methode zu gewährleisten.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 19 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

5.3 Kammersättigung und Kammertyp

Bei Nichteinhalten der Kammersättigung oder bei Verwendung unterschiedlicher Kammern kann die Lage der Zonen im Chromatogramm stark variieren. Die diesbezüglichen Bedingungen sollten bereits im Rahmen der Methodenentwicklung bzw. Optimierung festgelegt werden.

Dünnschichtchromatographie wird in der gesättigten Horizontal-Entwicklungskammer und in der gesättigten Doppeltrogkammer durchgeführt. Es wird geprüft, ob sich die Lage der Zonen ändert, wenn ohne Kammersättigung gearbeitet wird.

Durchführung:

- Je eine Platte wird in der gesättigten Horizontal-Entwicklungskammer und in der ungesättigten Horizontal-Entwicklungskammer chromatographiert gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" und darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen.
- Dieselbe Prüfung wird in der gesättigten und in der ungesättigten Doppeltrogkammer durchgeführt.

Annahmekriterien:

- Die Fingerprints der vier Chromatogramme sollten vergleichbar sein in Bezug auf die Lage der Zonen.

Treten in Bezug auf Lage, Farbe und Intensität der Zonen im Chromatogramm Unterschiede auf, sollte in die entsprechende Prüfanweisung ein Hinweis auf unbedingte Einhaltung der Vorgaben (Kammersättigung und Kammertyp) aufgenommen werden.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 20 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

5.4 Mobile Phase

Werden Fließmittelsysteme verwendet, bei denen Zersetzungen und/oder Umlagerungen möglich sind (beispielsweise Gemische von Estern und Alkoholen und/oder Säuren), wird die Stabilität dieser mobilen Phase über den gewünschten Stabilitäts-Zeitraum (z. B. 24 h) getestet.

Durchführung:

- Die entsprechende Menge Fließmittel für zwei Chromatographien wird hergestellt. Zu den Zeitpunkten t_0 und t_{24h} wird eine Platte gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" bzw. darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen chromatographiert.

Annahmekriterien:

- Die Chromatogramme stimmen überein in Bezug auf Lage, Farbe, Intensität und Anzahl der Zonen.

Sind die Fingerprints nicht miteinander vergleichbar, wird der Versuch wiederholt und die Abstände der Prüfzeitpunkte werden verringert. Auf diese Weise wird der Zeitraum ermittelt, über den das Fließmittel stabil ist. In den entsprechenden Prüfanweisungen ist die Haltbarkeit des Fließmittels zu vermerken.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 21 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

5.5 Trennstrecke

In der Routine im Labor kann es passieren, dass der richtige Zeitpunkt verpasst wird, die Platte aus der Kammer zu nehmen. Es wird überprüft, welche Auswirkungen eine längere Trennstrecke auf die Lage (R_f -Wert), Farbe, Intensität und Anzahl der Zonen hat.

Durchführung:

- Eine Platte wird gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" und darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen chromatographiert, die Trennstrecke wird um 2 cm verlängert. Die R_f -Werte, Farbe, Intensität und Anzahl der Zonen werden mit den R_f -Werten, Farbe, Intensität und Anzahl der Zonen eines Chromatogramms verglichen, das unter genauer Einhaltung der vorgeschriebenen Trennstrecke entwickelt wurde.

Annahmekriterien:

Die R_f -Werte, Farbe, Intensität und Anzahl der Zonen beider Chromatogramme müssen miteinander vergleichbar sein.

Stimmen die R_f -Werte, Farbe, Intensität und Anzahl der Zonen nicht überein bzw. sind die Fingerprints nicht miteinander vergleichbar, so sollte in der Prüfanweisung ein entsprechender Hinweis auf genaue Einhaltung der Trennstrecke aufgenommen werden.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung Validierung der Dünnschichtchromatographie	qualitativen	Seite 22 von 24 Version: 00
---------------	--	--------------	--------------------------------

5.6 Trockenzeiten

Es gibt Prüfanweisungen, die ein absolut genaues Einhalten der Trockenzeiten fordern, da sonst qualitativ unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden. Da in der Routine oft Versuche parallel durchgeführt werden, ist es nicht immer möglich, die vorgeschriebenen Trockenzeiten genau einzuhalten.

In der Regel sind die Trockenzeiten zwischen den einzelnen Schritten der Chromatographie (Auftragung, Entwicklung, Detektion, Dokumentation) auf 5 min festgelegt. Es wird geprüft, ob und wie sich die Chromatogramme verändern, wenn die Trockenzeiten auf 10 min verlängert werden.

Durchführung:

Drei Platten werden gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" und darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen chromatographiert. Folgende Zeiten werden von 5 min auf 10 min verlängert:

- Platte 1: Zeit zwischen Auftragung und Entwicklung
- Platte 2: Zeit zwischen Entwicklung und Detektion
- Platte 3: Zeit zwischen Detektion und Dokumentation.

Die Chromatogramme werden mit denen verglichen, die gemäß allgemeiner Arbeitsanweisung und darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen durchgeführt wurden.

Annahmekriterien:

- Die Chromatogramme stimmen überein in Bezug auf Lage, Farbe, Intensität und Anzahl der Zonen und die Farbe des Plattenhintergrundes ist vergleichbar.

Treten Veränderungen auf, die in Bezug auf die Robustheit der Methode nicht vertretbar sind, so wird in die entsprechenden Prüfanweisungen der Hinweis auf genaues Einhalten der vorgeschriebenen Zeiten aufgenommen.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 23 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

5.7 Derivatisierung

Es wird überprüft, inwieweit Änderungen der Temperatur (Plattenheizer, Trockenschrank) Auswirkungen auf die Derivatisierung haben.

Durchführung:

- Drei Platten werden gemäß Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie" und darauf aufbauender zu validierender Prüfanweisungen chromatographiert und bei unterschiedlichen Temperaturen nach der Derivatisierung erhitzt.

Annahmekriterien:

- Die Farben der Zonen in den Chromatogrammen und der Plattenhintergrund sind vergleichbar.

Treten Veränderungen auf, die in Bezug auf die Robustheit der Methode nicht vertretbar sind, so wird in die entsprechenden Prüfanweisungen der Hinweis auf genaues Einhalten der vorgeschriebenen Temperatur aufgenommen.

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

Firma: Muster	Allgemeine Arbeitsanweisung der Dünnschichtchromatographie	Validierung qualitativen	Seite 24 von 24 Version: 00
---------------	--	-----------------------------	--------------------------------

6 Dokumentation

Die Dokumentation der Validierung erfolgt in einem Validierungsbericht. Bei Firma Muster enthält dieser Bericht folgende Angaben:

- Datum, Projekt und Projektnummer
- Name der verantwortlichen und der ausführenden Person (Kürzel und Unterschrift)
- Prüfbedingungen
- Verwendete Geräte und Materialien; Verwendete Produkte, Matrix und Referenzstandards (Bezeichnung, Hersteller, Chargennummer)
- Genaue Beschreibung des Verfahrens und der Prüfbedingungen
- Chromatogramme, Darstellung der Ergebnisse (ggf. tabellarisch)
- Zusammenfassung
- Bewertung mit der Aussage, ob das geprüfte Verfahren/die Methode für seinen Bestimmungszweck valide ist.

7 Mitgeltende Unterlagen

- Bedienungsanleitungen Dokumentationssysteme
- Bedienungsanleitung Horizontal-Entwicklungskammer
- Bedienungsanleitungen Probeaufgabe-Systeme
- Bedienungsanleitungen von Sprüh- und Tauchvorrichtungen
- Bedienungsanleitung Plattenheizung
- SOP "Archivierung"
- SOP "Entsorgung von Abfällen im Laborbereich"
- Arbeitsanweisung "Allgemeine Arbeitsanweisung Dünnschichtchromatographie"

Ersetzt Version: 00	Vom:	Gültig ab:
---------------------	------	------------

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Selektivitätsdreieck	18
Abbildung 1-2: Prisma - Modell	19
Abbildung 1-3: Fließmittelloptimierungsschema nach CAMAG (Abkürzungen der reinen Lösungsmittel: Tertiär-Butylmethylether (BME), Diethylether (Et ₂ O), Ethanol (EtOH), Methanol (MeOH), Isopropanol (2PrOH), Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan CH ₂ Cl ₂), Ethylacetat (EtOAc), Acetonitril (ACN), Methylethylketon (MEK), Toluol (Toluen), Chloroform (CHCl ₃)).....	20
Abbildung 3-1: Fließmittelvergleich FM 1 und FM 2.....	66
Abbildung 3-2: Referenz- und Vergleichssubstanzen der Droge Bärentraubenblätter.	67
Abbildung 3-3: Vergleich unterschiedlicher Derivatisierungsreagenzien a) Dichlorchinonchlorimid-lösung, b) Dichlorchinonchlorimidreagenz Ph. Eur., c) Dichlorchinonchlorimidreagenz, d) Echt-blausalzreagenz, e) NBD-Clorid Reagenz, f) Dichlorchinonchlorimidlösung 1 % + Ammoniakdämpfe (10 %), g) Dichlorchinonchlorimidlösung 1 % + Ammoniakdämpfe (25 %)......	68
Abbildung 3-4: Vergleich von DC-Platten unterschiedlicher Hersteller.	69
Abbildung 3-5: Fingerprintvergleich nach Entwicklung der Chromatographie über unterschiedliche Trennstrecken.	70
Abbildung 3-6: Vergleich des Fingerprints der Droge Bärentraubenblätter, entwickelt in unterschiedlichen Kammern unter veränderten Konditionen; (a) gesättigte HDC, b) gesättigte TTC, c) HDC Sandwichkonfiguration, d) ungesättigte HDC, e) ungesättigte TTC.....	70
Abbildung 3-7: Dünnschichtchromatographischer Vergleich von Droge, Extrakt, Fertigarzneimittel und Placebomischung nach Probenaufarbeitung unter Anwendung von Hitze respektive bei Raumtemperatur; Droge bei RT aufgearbeitet (Bahn 2), Droge unter Hitze aufgearbeitet (Bahn 3), Extrakt bei RT	

aufgearbeitet (Bahn 5), Extrakt unter Hitze aufgearbeitet (Bahn 6), Fertigarzneimittel bei RT aufgearbeitet (Bahn 8), Fertigarzneimittel unter Hitze aufgearbeitet (Bahn 7), Hilfsstoffmischung bei RT aufgearbeitet (Bahn 11), Hilfsstoffmischung unter Hitze aufgearbeitet (Bahn 12), Hydrochinon (Bahn 1,4,7,10,13).	72
Abbildung 3-8: Selektivität eines Fertigarzneimittels, das Bärentraubenblätterextrakt als Wirkstoff enthält; Droge (Bahn 1), Extrakt (Bahn 2), Fertigarzneimittel (Bahn 3), Hilfsstoffmischung (Bahn 4), Referenzsubstanzen: Arbutin, Gallussäure, Hydrochinon nach aufsteigenden R_f -Werten (Bahn 5).	73
Abbildung 3-9: Stabilität eines Fertigarzneimittels, das Bärentraubenblätterextrakt enthält, während der Chromatographie.	74
Abbildung 3-10: Stabilität der Probe MA001-11-7, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 24 Monaten.	76
Abbildung 3-11: Stabilität der Probe MA001-11-8, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 24 Monaten.	76
Abbildung 3-12: Stabilität der Probe MA001-11-9, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 24 Monaten.	77
Abbildung 3-13: Stabilität der Probe MA001-11-7, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.	77
Abbildung 3-14: Stabilität der Probe MA001-11-8, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.	77
Abbildung 3-15: Stabilität der Probe MA001-11-9, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.	78
Abbildung 3-16: Stabilität der Probe MA001-11-7, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten.	78
Abbildung 3-17: Stabilität der Probe MA001-11-8, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten.	78

- Abbildung 3-18:** Stabilität der Probe MA001-11-9, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten..... 79
- Abbildung 4-1:** Extrakte aus der Droge Blätter mit Blüten; ethanolisch (40 %) (Bahn 1), acetonisch (Bahn 2), ethanolisch 70 % (Bahn 3), methanolisch (Bahn 4), ethylacetonisch (Bahn 5)..... 84
- Abbildung 4-2:** Probenaufarbeitung gemäß Wagner und Bladt (Wagner und Bladt 1996); OPC Fraktion des Blätter mit Blütenextrakts (Bahn 1), OPC Fraktion des Blattextrakts (Bahn 2), PPC Fraktion des Blätter mit Blütenextrakts (Bahn 3), PPC Fraktion des Fruchtextrakts (Bahn 4), Ethanolphase des Blätter mit Blütenextrakts (Bahn 5), Ethanolphase des Blattextrakts (Bahn 6), Referenzsubstanzen Epicatechin, Procyanidin A₂ und Procyanidin B₂ (Bahn 7). 86
- Abbildung 4-3:** Probenaufarbeitung gemäß Wagner und Bladt (Wagner und Bladt 1996) und Hölzl und Strauch (Hölzl und Strauch 1977); OPC Fraktion des Fruchtextrakts gemäß Hölzl und Strauch (Bahn 1), PPC Fraktion des Fruchtextrakts gemäß Hölzl und Strauch (Bahn 2), OPC Fraktion des Fruchtextrakts gemäß Wagner und Bladt (Bahn 3), PPC Fraktion des Fruchtextrakts gemäß Wagner und Bladt (Bahn 4), Referenzsubstanzen: Epicatechin, Procyanidin B₂, Procyanidin A₂ (Bahn 5), Referenzsubstanz: Epicatechin (Bahn 6), OPC Fraktion des Blattextrakts gemäß Hölzl und Strauch (Bahn 7), PPC Fraktion des Blattextrakts gemäß Hölzl und Strauch (Bahn 8), OPC Fraktion des Blattextrakts gemäß Wagner und Bladt (Bahn 9), PPC Fraktion des Blattextrakts gemäß Wagner und Bladt (Bahn 10)..... 87
- Abbildung 4-4:** Probenvergleich vor und nach der Aufkonzentrierung; OPC des Blattextrakts direkt nach der Festphasenextraktion (Bahn 1), PPC des Blattextrakts direkt nach der Festphasenextraktion (Bahn 2), Referenzsubstanzen: Epicatechin, Procyanidin B₂, Procyanidin A₂ (Bahn 3), Referenzsubstanz: Epicatechin (Bahn 4), OPC des Blattextrakts nach der Aufkonzentrierung (Bahn 5), PPC des Blattextrakts nach der Aufkonzentrierung (Bahn 6). 87
- Abbildung 4-5:** Flavonoidfraktion nach der Festphasenextraktion; Rutosid (Bahn 1), Chlorogensäure (Bahn 2), Hyperosid (Bahn 3), Fruchtextrakt (Bahn 4), Blattextrakt (Bahn 5), Epicatechin (Bahn 6), Vitexin (Bahn 7)..... 88

Abbildung 4-6: Fingerprints der OPC und PPC nach Trennung von 1 mL (OPC (Bahn 1), PPC (Bahn 2) und 2 mL Probenlösung durch Festphasenextraktion (OPC (Bahn 6), PPC (Bahn 7)).	89
Abbildung 4-7: Fingerprints der ersten und der letzten 10 mL jeder einzelnen Fraktion der Festphasenextraktion; Flavonoidfraktion die ersten 10 mL (Bahn 1), Flavonoidfraktion die letzten 10 mL (Bahn 2), Referenzsubstanzen Epicatechin, Rutosid (Bahn 3), Referenzsubstanz Procyanidin B ₂ (Bahn 4), OPC-Fraktion die ersten 10 mL (Bahn 5), OPC-Fraktion die letzten 10 mL (Bahn 6), PPC-Fraktion die ersten 10 mL (Bahn 7), PPC-Fraktion die letzten 10 mL (Bahn 8).	90
Abbildung 4-8: Gelchromatographie eines Extrakts der Droge Weißdornblätter mit Blüten über Sephadex G25.	90
Abbildung 4-9: Gelchromatographie eines Extrakts der Droge Weißdornblätter mit Blüten über Sephadex LH 20.	91
Abbildung 4-10: FM 4; Extrakt MA002-06 OPC Fraktion (Bahn 1), Extrakt MA002-06 PPC Fraktion (Bahn 2), Procyanidin A ₂ (Bahn 3), Procyanidin B ₂ (Bahn 4), Epicatechin (Bahn 5), Extrakt MA002-07, OPC Fraktion (Bahn 6), Extrakt MA002-07, PPC Fraktion (Bahn 7).	92
Abbildung 4-11: FM 5; Extrakt MA002-06 OPC Fraktion (Bahn 1), Extrakt MA002-06 PPC Fraktion (Bahn 2), Procyanidin A ₂ (Bahn 3), Procyanidin B ₂ (Bahn 4), Epicatechin (Bahn 5), Extrakt MA002-07 OPC Fraktion (Bahn 6), Extrakt MA002-07 PPC Fraktion (Bahn 7).	92
Abbildung 4-12: FM 6; Extrakt MA002-06 Flavonoidfraktion (Bahn 1), Extrakt MA002-06 OPC Fraktion (Bahn 2), Extrakt MA002-06 PPC Fraktion (Bahn 3), Extrakt MA002-07 Flavonoidfraktion (Bahn 4), Extrakt MA002-07 OPC Fraktion (Bahn 5), Extrakt MA002-07 PPC Fraktion (Bahn 6).	93
Abbildung 4-13: Derivatisierung einer HPTLC-Platte mit DMAZA-Reagenz.	94
Abbildung 4-14: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung der Flavonoide und Procyanidine in einem Fertigarzneimittel, das Extrakt aus Weißdornblättern mit Blüten als Wirkstoff enthält; Droge Flavonoidfraktion (Bahn 1), Extrakt	

Flavonoidfraktion (Bahn 2), Fertigarzneimittel Flavonoidfraktion (Bahn 3), Referenzsubstanzen: Rutosid, Hyperosid, Epicatechin nach aufsteigenden R_f -Werten (Bahn 4), Droge OPC-Fraktion (Bahn 5), Extrakt OPC-Fraktion (Bahn 6), Fertigarzneimittel OPC-Fraktion (Bahn 7), Referenzsubstanz Procyanidin B ₂ (Bahn 8), Droge PPC-Fraktion (Bahn 9), Extrakt PPC-Fraktion (Bahn 10), Fertigarzneimittel PPC-Fraktion (Bahn 11).....	96
Abbildung 4-15: Fingerprints von drei Fertigarzneimitteln (MA002-9, MA002-10, MA002-11) mit und ohne Filmüberzug ; die Fraktionen jedes Arzneimittels wurden in der Reihenfolge Flavonoide, OPC, PPC analysiert; MA002-9-A mit Filmüberzug (Bahn 1-3), MA002-10-A mit Filmüberzug (Bahn 4-6), MA002-11-A mit Filmüberzug (Bahn 7-9), Epicatechin (Bahn 10), Procyanidin B ₂ , Rutosid (Bahn 11), MA002-9-A ohne Filmüberzug (Bahn12-14), MA002-10-A ohne Filmüberzug (Bahn 15-17), MA002-11-A ohne Filmüberzug (Bahn 18-20).....	97
Abbildung 4-16: Fingerprints von drei Fertigarzneimitteln (MA002-12, MA002-13, MA002-14) mit und ohne Drageehülle ; die Fraktionen jedes Arzneimittels wurden in der Reihenfolge Flavonoide, OPC, PPC analysiert; MA002-12-A mit Drageehülle (Bahn 1-3), MA002-13-A mit Drageehülle (Bahn 4-6), MA002-14-A mit Drageehülle (Bahn 7-9), Epicatechin (Bahn 10), Procyanidin B ₂ , Rutosid (Bahn 11), MA002-12-A ohne Drageehülle (Bahn12-14), MA002-13-A ohne Drageehülle (Bahn 15-17), MA002-14-A ohne Drageehülle (Bahn 18-20).....	98
Abbildung 4-17: Fingerprints von zwei Fertigarzneimitteln (MA002-15, MA002-16) mit und ohne Filmüberzug ; die Fraktionen jedes Arzneimittels wurden in der Reihenfolge Flavonoide, OPC, PPC analysiert; MA002-15-A mit Filmüberzug (Bahn 1-3), MA002-16-A mit Filmüberzug (Bahn 4-6), Rutosid (Bahn 7), Procyanidin B ₂ , Epicatechin (Bahn 8), MA002-15-A ohne Filmüberzug (Bahn 9-11), MA002-16-A ohne Filmüberzug (Bahn 12-14).	98
Abbildung 4-18: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von zwei Chargen des Arzneimittels MA002-09; Flavonoidfraktion MA002-09-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-09-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-09-A (Bahn 3), Epicatechin, Rutosid (Bahn 4), Procyanidin B ₂ (Bahn 5), Flavonoidfraktion MA002-09-B (Bahn 6), OPC-Fraktion MA002-09-B (Bahn 7), PPC-Fraktion MA002-09-B (Bahn 8).....	100

Abbildung 4-19: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von vier Chargen des Arzneimittels MA002-10; Flavonoidfraktion MA002-10-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-10-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-10-A (Bahn 3), Flavonoidfraktion MA002-10-C (Bahn 4), OPC-Fraktion MA002-10-C (Bahn 5), PPC-Fraktion MA002-10-C (Bahn 6), Epicatechin, Rutosid (Bahn 7), Procyanidin B₂ (Bahn 8), Flavonoidfraktion MA002-10-D (Bahn 9), OPC-Fraktion MA002-10-D (Bahn 10), PPC-Fraktion MA002-10-D (Bahn 11), Flavonoidfraktion MA002-10-B (Bahn 12), OPC-Fraktion MA002-10-B (Bahn 13), PPC-Fraktion MA002-10-B (Bahn 14)..... 100

Abbildung 4-20: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von drei Chargen des Arzneimittels MA002-11; Flavonoidfraktion MA002-11-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-11-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-11-A (Bahn 3), Flavonoidfraktion MA002-11-B (Bahn 4), OPC-Fraktion MA002-11-B (Bahn 5), PPC-Fraktion MA002-11-B (Bahn 6), Epicatechin, Rutosid (Bahn 7), Procyanidin B₂ (Bahn 8), Flavonoidfraktion MA002-11-D (Bahn 9), OPC-Fraktion MA002-11-D (Bahn 10), PPC-Fraktion MA002-11-D (Bahn 11)..... 101

Abbildung 4-21: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von drei Chargen des Arzneimittels MA002-11; Flavonoidfraktion MA002-11-F (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-11-F (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-11-F (Bahn 3), Flavonoidfraktion MA002-11-C (Bahn 4), OPC-Fraktion MA002-11-C (Bahn 5), PPC-Fraktion MA002-11-C (Bahn 6), Epicatechin, Rutosid (Bahn 7), Procyanidin B₂ (Bahn 8), Flavonoidfraktion MA002-11-E (Bahn 9), OPC-Fraktion MA002-11-E (Bahn 10), PPC-Fraktion MA002-11-E (Bahn 11). 101

Abbildung 4-22: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von zwei Chargen des Arzneimittels MA002-12; Flavonoidfraktion MA002-12-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-12-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-12-A (Bahn 3), Epicatechin, Rutosid (Bahn 4), Procyanidin B₂ (Bahn 5), Flavonoidfraktion MA002-12-B (Bahn 6), OPC-Fraktion MA002-12-B (Bahn 7), PPC-Fraktion MA002-12-B (Bahn 8)..... 102

Abbildung 4-23: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von drei Chargen der Arzneimittels MA002-11, MA002-12, MA002-13; Flavonoidfraktion MA002-11-D (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-11-D (Bahn 2), PPC-Fraktion

MA002-11-D (Bahn 3), Flavonoidfraktion MA002-13 (Bahn 4), OPC-Fraktion MA002-13 (Bahn 5), PPC-Fraktion MA002-13 (Bahn 6), Epicatechin, Rutosid (Bahn 7), Procyanidin B ₂ (Bahn 8), Flavonoidfraktion MA002-12-A (Bahn 9), OPC-Fraktion MA002-12-A (Bahn 10), PPC-Fraktion MA002-12-A (Bahn 11).....	102
Abbildung 4-24: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von zwei Chargen des Arzneimittels MA002-14; Flavonoidfraktion MA002-14-B (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-14-B (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-14-B (Bahn 3), Epicatechin, Rutosid (Bahn 4), Procyanidin B ₂ (Bahn 5), Flavonoidfraktion MA002-14-A (Bahn 6), OPC-Fraktion MA002-14-A (Bahn 7), PPC-Fraktion MA002-14-A (Bahn 8).....	103
Abbildung 4-25: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von zwei Chargen des Arzneimittels MA002-15; Flavonoidfraktion MA002-15-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-15-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-15-A (Bahn 3), Epicatechin, Rutosid (Bahn 4), Procyanidin B ₂ (Bahn 5), Flavonoidfraktion MA002-15-B (Bahn 6), OPC-Fraktion MA002-15-B (Bahn 7), PPC-Fraktion MA002-15-B (Bahn 8).....	103
Abbildung 4-26: Fingerprints der drei Fraktionen Flavonoide, OPC und PPC von zwei Chargen des Arzneimittels MA002-16; Flavonoidfraktion MA002-16-A (Bahn 1), OPC-Fraktion MA002-16-A (Bahn 2), PPC-Fraktion MA002-16-A (Bahn 3), Epicatechin, Rutosid (Bahn 4), Procyanidin B ₂ (Bahn 5), Flavonoidfraktion MA002-16-B (Bahn 6), OPC-Fraktion MA002-16-B (Bahn 7), PPC-Fraktion MA002-16-B (Bahn 8).....	104
Abbildung 5-1: Fließmittelloptimierung; Trennung der Triterpenglykoside in der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock.....	108
Abbildung 5-2: Vergleich unterschiedlicher Derivatisierungsreagenzien, a) Schwefelsäure 10 % in Wasser, b) Schwefelsäure 19 % in Methanol, c) Manganchlorid-Reagenz, d) Tetrazolblau - Reagenz, e) Folins Reagenz, f) Anisaldehyd - Reagenz.....	109
Abbildung 5-3: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung der Droge Traubensilberkerzen-wurzelstock anhand der Triterpenglykoside; MA007-065	

(Bahn 1), MA007-067 (Bahn 2), MA007-068 (Bahn 3), MA007-113 (Bahn 4), Referenzlösung Actein (Bahn 5), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 6), MA007- 066 (Bahn 7), MA007-123 (Bahn 8), MA007-124 (Bahn 9), MA007-125 (Bahn 10).....	111
Abbildung 5-4: Analogkurvenvergleich der authentischen Droge MA007-066 (jeweils rote Kurve) mit den Drogen MA007-065, MA007-067, MA007-068, MA007-113 (jeweils grüne Kurve).....	112
Abbildung 5-5: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung des Extrakts der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock anhand der Triterpenglykoside; MA007-117 (Bahn 1), MA007-118 (Bahn 2), MA007-119 (Bahn 3), MA007-120 (Bahn 4), Referenzlösung Actein (Bahn 5), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 6), MA007- 121 (Bahn 7), MA007-122 (Bahn 8).....	113
Abbildung 5-6: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung eines Fertigarzneimittels, das Extrakt der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock enthält; Referenzlösung Actein (Bahn 1), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 2), MA007-131 (Bahn 3), MA007-126 (Bahn 4), MA007-130 (Bahn 5), Referenzlösung Actein (Bahn 6), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 7).....	114
Abbildung 5-7: Stabilität der Droge (MA007-066) in der Probenlösung und auf der Platte.	115
Abbildung 5-8: Stabilität der Extraktlösung während der Chromatographie.....	116
Abbildung 5-9: Darstellung von fünf Fingerprints, die unter dem Einfluss von Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen erstellt wurden und Veränderung der R_f -Werte von Actein und 27-Deoxyactein in Abhängigkeit von Temperatur und Luftfeuchtigkeit	117
Abbildung 5-10: Fingerprintvergleich nach Entwicklung in der gesättigten Doppeltrogkammer (a) und nach Entwicklung in der gesättigten Horizontal-Entwicklungskammer (b).	118
Abbildung 5-11: Fließmittelstabilität über 24 Stunden.....	119

Abbildung 5-12: Fingerprintvergleich unterschiedlich langer Laufstrecken.	119
Abbildung 5-13: Stabilität des Anisaldehyd-Reagenzes über einen Zeitraum von 90 Minuten. Referenzlösung Actein (Bahn 1), authentische Droge (MA007-066) (Bahn 2), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 3).....	120
Abbildung 5-14: Vergleich der Chromatogramme nach Derivatisierung auf dem Plattenheizer, Referenzlösung Actein (Bahn 1), authentische Droge (MA007-066) (Bahn 2), Referenzlösung 27-Deoxyactein (Bahn 3).....	121
Abbildung 5-15: Vergleich der Chromatogramme nach unterschiedlich langen Wartezeiten zwischen der Derivatisierung und der Dokumentation; Untersuchungssubstanz authentische Droge (MA007-066).....	121
Abbildung 5-16: R_f - Werte der Substanzen Actein und 27-Deoxyactein von 10 Chromatogrammen über einen Zeitraum von 5 Monaten.....	123
Abbildung 5-17: Stabilität der Probe MA007-127, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 18 Monaten.....	124
Abbildung 5-18: Stabilität der Probe MA007-128, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 18 Monaten.....	124
Abbildung 5-19: Stabilität der Probe MA007-129, eingelagert bei 25°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 18 Monaten.....	125
Abbildung 5-20: Stabilität der Probe MA007-127, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.....	125
Abbildung 5-21: Stabilität der Probe MA007-128, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.....	126
Abbildung 5-22: Stabilität der Probe MA007-129, eingelagert bei 30°C/60 % r. F. über einen Zeitraum von 12 Monaten.....	126
Abbildung 5-23: Stabilität der Probe MA007-127, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten.....	127

Abbildung 5-24: Stabilität der Probe MA007-128, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten..... 127

Abbildung 5-25: Stabilität der Probe MA007-129, eingelagert bei 40°C/75 % r. F. über einen Zeitraum von 6 Monaten..... 128

Abbildung 5-26: Authentische Droge MA007-066 (Bahn 1), Kaffeesäure (Bahn 2), Cimicifugasäure E, (Bahn 3), Cimicifugasäure B (Bahn 4), Cimicifugasäure A (Bahn 5), Fukolsäure (Bahn 6), isopropanolischer Extrakt MA007-131 (Bahn 7), Formononetin (Bahn 8), Isoferulasäure (Bahn 9), Ferulasäure (Bahn 10), Cimicifugasäure F (Bahn 11), Fertigarzneimittel MA007-126 (Bahn 12)..... 130

Abbildung 5-27: a) UV-Absorptionsspektren von Isoferulasäure (schwarze Kurve) und Formononetin (rote Kurve), b) UV-Spektren von Isoferulasäure (schwarze Kurve), sowie der auf gleicher Höhe liegenden Zonen in den Fingerprints der Droge, des Extrakts und des Fertigarzneimittels (grüne und blaue Kurven)..... 131

Abbildung 5-28: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock anhand der Hydroxymzimtsäurederivate; MA007-065 (Bahn 1), MA007-067 (Bahn 2), MA007-068 (Bahn 3), MA007-113 (Bahn 4), Referenzlösung Isoferulasäure (Bahn 5), Referenzlösung Kaffeesäure (Bahn 6), MA007-066 (Bahn 7), MA007-123 (Bahn 8), MA007-124 (Bahn 9), MA007-25 (Bahn 10)..... 132

Abbildung 5-29: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung des Extrakts der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock anhand der Hydroxymzimtsäurederivate; MA007-117 (Bahn 1), MA007-118 (Bahn 2), MA007-119 (Bahn 3), MA007-120 (Bahn 4), Referenzlösung Kaffeesäure (Bahn 5), MA007-121 (Bahn 6), MA007-122 (Bahn 7)..... 133

Abbildung 5-30: Selektivität des Verfahrens zur Identitätsbestimmung eines Fertigarzneimittels, das Extrakts der Droge Traubensilberkerzenwurzelstock enthält; Referenzlösung Isoferulasäure(Bahn 1), Referenzlösung Kaffeesäure (Bahn 2), MA007-131 (Bahn 3), MA007-126 (Bahn 4), MA007-130 (Bahn 5), Referenzlösung Isoferulasäure(Bahn 6), Referenzlösung Kaffeesäure (Bahn 7). 134

- Abbildung 6-1:** Dünnschichtchromatographie gemäß Monographievorschlag "Brennnesselblätter" der Pharmeuropa 14.1. (Bahn 1: Scopoletin, Bahn 2: β -Sitosterol, Bahn 3-6: *Urtica urens* unterschiedliche Chargen, Bahn 7-11: *Urticae folium* unterschiedliche Chargen, Bahn 12: *Lamium album*). 135
- Abbildung 6-2:** Fingerprintvergleich der Proben, die mit Wasser (a), Ethanol 70 % (b) und Isoprop-anol (c) extrahiert wurden..... 138
- Abbildung 6-3: Fließmittelvergleich a) FM 11, b) FM 8, c) FM 9. 138
- Abbildung 6-4:** Fingerprintvergleich nach Entwicklung über differierende Trennstrecken. 139
- Abbildung 6-5:** Drogenmaterial unterschiedlicher Herkunft; Albanien (Bahn 1); Ungarn (Bahn 2); Deutschland (Bahn 3 und 5), unterschiedliche Chargen; Bulgarien (Bahn 6); Polen (Bahn 7); Chlorogensäure, Kaffeoyläpfelsäure, Scopoletin (aufsteigende R_f -Werte) (Bahn 4); Rutosid, Hyperosid (aufsteigende R_f -Werte) (Bahn 8). 140
- Abbildung 6-6:** Fingerprintvergleich *L. album* (MA015-21) (Bahn 1) und *U. dioica* (MA015-10, MA015-10a, MA015-10b, MA015-11) (Bahn 3-6), Bahn 2: Chlorogensäure, Kaffeoyläpfelsäure, Scopoletin (aufsteigende R_f -Werte). 141
- Abbildung 6-7:** Selektivität eines ethanolischen und eine isopropanolischen Extakts; Referenz-lösungen Rutosid, Hyperosid, Quercetin (nach aufsteigenden R_f -Werten) (Bahn 1), Droge (MA015-09) (Bahn 2), Extrakt ethanolisch (MA015-15) (Bahn 3), Fertigarzneimittel (MA015-19) (Bahn 4), Referenzlösungen Chlorogensäure, Kaffeoyläpfelsäure, Scopoletin (nach aufsteigenden R_f -Werten) (Bahn 5), Droge (MA015-8) (Bahn 6), Extrakt isopropanolisch (MA015-16) (Bahn 7), Fertigarzneimittel (MA015-20) (Bahn 8). 142
- Abbildung 6-8:** Vergleich von vier Chargen *Urticae folium*. Bahn 1: Rutosid, Hyperosid (aufsteigende R_f -Werte), Bahn 2-5: Proben *Urticae folium* unterschiedlicher Chargen, Bahn 6: Chlorogensäure, Kaffeoyläpfelsäure, Scopoletin (aufsteigende R_f -Werte). 143

- Abbildung 6-9:** Stabilität während der Chromatographie a) Probenlösung der Droge (MA015-06) b) Kaffeoyläpfelsäure in Methanol. 144
- Abbildung 6-10:** Fließmittelstabilität über 18 Stunden (MA015-06). 144
- Abbildung 6-11:** Veränderung der Fluoreszenz innerhalb von 10 Minuten nach der Derivatisierung (MA015-06, MA015-07). 145
- Abbildung 6-12:** Fingerprintvergleich *U. urens* (Bahn 1 und 2, MA015-12, MA015-13) und *U. dioica* (Bahn 4 und 5, MA015-10, MA015-11), Bahn 3 und 6: Chlorogensäure, Kaffeoyläpfelsäure, Scopoletin (aufsteigende R_f -Werte). 146
- Abbildung 6-13:** Analogkurvenvergleich der Chromatogramme von *U. dioica* (grüne Kurve in Abbildung a) und *U. urens* (braune Kurve in Abbildung b), mit den Referenzsubstanzen, Chlorogensäure, Kaffeoyläpfelsäure und Scopoletin (jeweils rote Kurve). 146
- Abbildung 7-1:** Dünnschichtchromatographie verschiedener *Crataegus* species, Standards nach aufsteigenden R_f -Werten Rutin, Vitexin-2"-O-rhamnosid, Chlorogensäure, Hyperosid, Vitexin, Kaffeensäure (Bahnen 1, 7, 13), *Crataegus laevigata* (Bahnen 2,8,9), *Crataegus monogyna* (die Probe auf Bahn 5 wurde fermentiert) (Bahnen 3-6), *Crataegus macrocarpa* (Bahn 10), *Crataegus azarolus ssp. azarolus* (Bahn 11), *Crataegus pentagyna* (Bahn 12), (CAMAG Labor Muttenz, Schweiz). 158
- Abbildung 7-2:** Chromatogramm der Phenylpropanoide unterschiedlicher Echinacea-Arten; Bahn 1: Referenzlösungen Caftarinsäure, Cynarin, Cichoriensäure (in aufsteigender Reihenfolge), Bahn 2: *Echinaceae purpureae Radix*, Bahn 3: *Echinaceae pallidae Radix*, Bahn 4: *Echinaceae angustifoliae Radix*, Bahn 5: *Echinaceae tennesseensis Radix*, Bahn 6: *Echinaceae arrorubentis Radix*, Bahn 7: *Echinaceae purpureae Herba*, Bahn 8: *Echinaceae pallidae Herba*, Bahn 9: *Echinaceae angustifoliae Herba*, Bahn 10: Referenzlösungen Echinacosid, Chlorogensäure, Kaffeensäure (in aufsteigender Reihenfolge) (Reich et al. 2002). 160
- Abbildung 7-3:** Chromatogramm der Phenylpropanoide bekannter Verfälschungen von Echinacea; Bahn 1: Referenzlösungen Caftarinsäure, Cynarin, Cichoriensäure (in aufsteigender Reihenfolge), Bahn 2: *Parthenii integrifolii, Radix **, Bahn 3:

Parthenii integrifolii Radix *, Bahn 4: *Parthenii integrifolii Radix* *, Bahn 5: *Lespedezae Herba*, Bahn 6: *Chrysanthemii parthenii Herba*, Bahn 7: Echinacosid, Chlorogensäure, Kaffeesäure (in aufsteigender Reihenfolge) (Reich et al. 2002). 161

Abbildung 7-4: Fingerprintchromatogramme von Johanniskrautextrakt HPLC versus DC (Fa. Finzelberg GmbH & Co. KG). 170

Abbildung 10-1: Selektivitätsprüfung des Verfahrens zur quantitativen Hydrochinonbestimmung in Fertigarzneimitteln, die Bärentraubenblätterextrakt enthalten..... 200

Abbildung 10-2: UV-Spektren bei 288 nm der Extraktlösung (bahn 2), der Fertigarzneimittellösung (Bahn 4), der Placebolösung mit Hydrochinon versetzt (Bahn 8) und der reinen Hydrochinonlösung (Bahn 13). 200

Abbildung 10-3: Kalibriergerade Hydrochinon; a) und b) Polynominalfunktion, c) und d) lineare Funktion..... 201

Abbildung 10-4: Daten der polynominalen Kalibrierfunktion 202

Abbildung 10-5: Daten der linearen Kalibrierfunktion 202

Abbildung 10-6: Nachweisgrenze Hydrochinon, visuelle Auswertung. 202

Abbildung 10-7: ¹HNM-Spektrum der Kaffeoyläpfelsäure 247

Abbildung 10-8: ¹³CNMR-Spektrum der Kaffeoyläpfelsäure 248

Abbildung 10-9: FAB-MS-Spektren der Kaffeoyläpfelsäure 249

Abbildung 10-10: IR_Spektrum der Kaffeoyläpfelsäure 250

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Validierungsanforderungen nach ICH (Q2A)	5
Tabelle 1-2: Selektivitätsklassen nach SNYDER (vereinfacht) (Snyder 1978).....	18
Tabelle 2-1: Elutionsmittel für Festphasenextraktion I.....	34
Tabelle 2-2: Elutionsmittel für Festphasenextraktion II.....	34
Tabelle 5-1: R _f -Werte der Referenzsubstanzen Actein und 27-Deoxyactein sowie Temperatur und Luftfeuchtigkeit zum Zeitpunkt der Chromatographie.	117
Tabelle 5-2: Daten zur Reproduzierbarkeit des Verfahrens zur dünnschichtchromato- graphischen Bestimmung der Triterpenglykoside in Traubensilberkerzen- wurzelstock.....	122
Tabelle 5-3: R _f -Werte der Referenzsubstanzen Cimicifugasäure F, Cimicifugasäure E, Cimicifugasäure B, Cimicifugasäure A, Fukolsäure, Formononetin, Isoferulasäure, Ferulasäure, Kaffeesäure.	130
Tabelle 6-1: ¹ H- und ¹³ C-NMR Daten der Kaffeoyläpfelsäure:	136
Tabelle 6-2: FAB-MS Daten der Kaffeoyläpfelsäure:	137
Tabelle 10-1: Auswertung Ringversuch I.....	197
Tabelle 10-2: Auswertung Ringversuch II.....	198

13 Abkürzungsverzeichnis

AHP	America Herbal Pharmacopeia, Amerikanisches Arzneibuch
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CV	Variationskoeffizient
DC	Dünnschichtchromatographie
CDER	Center for Drug Evaluation and Research
CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
ESCO	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
FDA	Food and Drug Administration
GC	Gaschromatographie
GLP	Good Laboratory Practice
GMP	Good Manufacturing Practice
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin-Layer Chromatography
IR	Infrarot
min	Minute
ML	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
N	Normal
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PA	Polyamid
p. a.	Pro analysi
Ph. Eur.	Pharmacopeia Europea, Europäisches Arzneibuch
R _f	Retentionsfaktor
SOP	Standard Operating Procedure
UV	Ultraviolett
VK	Vergleichspräzision
VT	Volumenteile
z. B.	zum Beispiel

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Dissertation hat in gleicher oder ähnlicher Form zuvor keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

CURICULUM VITAE

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Kathrin Koll, geb. Thiekötter
Geburtstag: 24. Juni 1969
Geburtsort: Rheine
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG

1988 **Abitur**, Gymnasium Bördestraße, Bremen
1988 – 1991 Ausbildung zur Pharmazeutisch Technischen Assistentin, Bernd-Blindow-Schule, Osnabrück
1991-1997 Pharmaziestudium Universität Freiburg; praktische Ausbildung in der "Apotheke am alten Steinweg" und in der "Bonifatius-Apotheke", Münster.
Jan. 1997 **Approbation** als Apothekerin
1997 – 1999 Apothekerin in der "St. Gotthard Apotheke", Bremen
Nov. 1999 – Nov. 2003 **Promotion** bei Dr. habil Markus Veit
"Optimierung und Validierung dünnschichtchromatographischer Verfahren in der Qualitätsanalytik von Phytopharmaka"
Nov. 1999 – Nov. 2000 Fa. Finzelberg GmbH & Co.KG, Andernach
Dez. 2000 – Jan. 2001 Apothekerin in der "Brunnen Apotheke", Bad Neuenahr
Feb. 2001 – Okt. 2001 Fa. Camag, Muttenz Schweiz
Nov. 2001 – Dez. 2002 Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e. V., Sinzig
Jan. 2003 – Aug. 2003 Apothekerin in der " Brunnen Apotheke", Bad Neuenahr und in der "Schloß Apotheke", Sinzig
Seit Sep. 2003 Fa. Meckel-Spenglersan, Bühl, Baden-Baden
