

## Der Furocumarin-Gehalt in *Rutae herba* in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer der getrockneten Droge

*S. Amend und O. Schimmer*

Die oberirdischen Teile von *Ruta graveolens*, im folgenden als *Rutae herba* bezeichnet („Ruta-Tee“), enthalten unter anderem die Furocumarine Bergapten, Psoralen und Xanthotoxin (1, 2). In Untersuchungen an der Universität Kiel zeigte sich, daß die genannten Verbindungen am isolierten Froschnerv die Kaliumionen-Kanäle blockieren (3). Die Furocumarine werden deshalb als mögliche Wirkstoffe angesehen, die an den positiven Effekten des Ruta-Tees bei der Behandlung der Multiplen Sklerose Anteil haben. Die günstige Wirkung des Ruta-Tees bei Multipler Sklerose wird durch Patientenberichte aus Chile gestützt.

*Rutae herba* ist jedoch ein sehr komplexes Heilmittel. Das komplexe Inhaltsstoffmuster kann erheblichen Schwankungen unterliegen, so daß eine gleichmäßige Wirkung bestimmter Inhaltsstoffe nur über entsprechende Analysen kontrolliert und garantiert werden kann.

Wenn auch die Furocumarine nicht die einzigen kaliumkanalblockierenden Substanzen im Ruta-Tee sind (3), so ist die Furocumarinfraction doch besonders wichtig und sollte deshalb das erste Ziel einer genaueren Quantifizierung sein. Dafür mußte zunächst festgestellt werden, in welchem Konzentrationsbereich diese Furocumarine in den einzelnen Drogen-Herkünften enthalten sind, um dann die Charge auszuwählen, die für eine klinische Studie in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden konnte. Zu diesem Zweck wurde eine Extraktions- und Aufarbeitungsmethode entwickelt und mit einer HPLC-Methode kombiniert. Dadurch konnte der Gesamtgehalt und der absolute Gehalt der drei oben genannten wichtigen Furocumarine ermittelt werden. Voraussetzung war die Validierung der Methode nach den Anforderungen des BGA (4).

Die Ergebnisse der HPLC-Methode sollten mit denen einer DC-Methode (Quantifizierung mittels Scanner) verglichen werden. Die Trennung mit dieser Methode erwies sich jedoch als nicht befriedigend. Die Ergebnisse mit *Rutae herba* und den Tee-Zubereitungen beruhen deshalb alle auf der HPLC-Methode.

## Material und Methode

Rutae herba wurde in Form von Einzelproben von folgenden Firmen zur Verfügung gestellt: Martin Bauer (Vestenbergsgreuth), Caesar und Loretz (Hilden), Klenk (Schweinfurt) und Galke (Gittelde). Die Ware der Firma Galke war vermutlich *Ruta chalepensis*. Aus Kiel standen Proben einer *Ruta graveolens* und einer *Ruta chalepensis* zur Verfügung.

Extraktion, Aufarbeitung und HPLC-Analytik wurden in Abweichung der in der Literatur beschriebenen Methoden (5-9) modifiziert und wie folgt vorgenommen:

## Extraktion und Aufarbeitung

10,0 g pulverisierte Droge wurde mit 700 ml MeOH 24 Stunden im Soxhlet extrahiert, filtriert und im Vakuum auf 50 ml eingeeengt. Nach Zusatz von 50 ml Wasser wurde im Scheidetrichter mit Isooctan (3 x 20 ml) ausgeschüttelt, um die Chlorophylle zu entfernen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit Diethylether erschöpfend ausgeschüttelt. Die vereinigten Diethyletherphasen wurden mit KOH (0,5%) vom restlichen Chlorophyll und von Pflanzensäuren befreit. Nach Trocknung der organischen Phase mit Natriumsulfat wurde der Diethylether abrotiert und der Rückstand in 50,0 ml MeOH gelöst.

## Teezubereitung

5 g, 10 g oder 20 g gepulverte Droge wurden genau gewogen und in einen Cilia-Teebeutel gefüllt. Dieser wurde mit 250 ml kochendem Wasser übergossen und 10 min extrahiert. Dann wurde der Teebeutel entfernt und wie o.a. die weitere Aufarbeitung durchgeführt, wobei der Isooctan-Reinigungsschritt entfiel. Der Rückstand wurde jedoch nur in 25,0 ml MeOH gelöst.

## HPLC-Methode

Die Methode wurde entwickelt auf der Basis der entsprechenden Literaturdaten (5-9).

Anlage: Waters (Millipore)

Säule: Nova-Pak C 18 (Waters) 12,5 cm x 4 mm, Partikelgröße 4 µm.

Eluent: 21% Acetonitril in H<sub>2</sub>O (V/V)

Flußgeschwindigkeit: 1,6 ml/min

Detektion: Absorption im UV<sub>250</sub>  
 Injektionsmenge: 20 µl  
 Spektren und Peakreinheit: mittels Diodenarraydetektor (Pharmacia)

### Validierung der Methodik

Die Bewertung analytischer Daten erfordert eine Validierung der verwendeten Methode. Das BGA verlangt dafür die Bestimmung folgender Parameter: Präzision, Linearität, Richtigkeit, Selektivität.

#### Präzision

1. Bei wiederholter Injektion derselben Probe in die HPLC-Anlage (manuell) darf die Standardabweichung maximal 2% betragen.

Ergebnis aus 10 Injektionen:

Bergapten	11,64 µg/ml ± 0,15	(1,25%)
Psoralen	5,04 µg/ml ± 0,03	(0,55%)
Xanthotoxin	13,43 µg/ml ± 0,11	(0,81%)
Gesamt	30,11 µg/ml ± 0,28	(0,92%)

2. Genauigkeit der Aufarbeitung:

Die relative Standardabweichung sollte 5% nicht übersteigen.

Ergebnis aus 6 Aufarbeitungen:

Bergapten	7,6%
Psoralen	8,3%
Xanthotoxin	6,2%
durchschnittliche Standard- abweichung (gesamt):	7,2%

Die Forderung des BGA wird nur geringfügig überschritten.

3. Genauigkeit der Methode bei Aufarbeitung durch verschiedene Personen:

Auch in diesem Versuch lag die relative Standardabweichung etwas über 5% und betrug (gesamt) 7,62%.

#### Linearität

Im Konzentrationsbereich von 5 - 90 µg/ml erwies sich die Eichkurve als linear. Die Korrelationskoeffizienten waren  $> 0,9989$  für jede der drei Furocumarine.

### **Richtigkeit**

Diese kann mit einer zweiten, unabhängigen Methode bewiesen werden. Da dies in der Praxis meist nicht erreichbar ist, bestimmt man die Wiederfindungsrate mittels Standard-Addition. Man setzt der Analysenlösung eine definierte Menge der zu bestimmenden Substanz vor der Aufarbeitung der Probe zu.

Ergebnis: Die Wiederfindungsraten lagen bei 102,1 bis 105,4%.

Die Überprüfung der Richtigkeit mit einer quantitativen Methode, welche eine Abtrennung und Bestimmung mittels DC beinhaltete, war aufgrund mangelnder Selektivität (Peak-Überlagerungen) nicht möglich. Die DC-Methode eignet sich jedoch gut zur Unterscheidung von *Ruta graveolens* und *Ruta chalepensis*, was beim Vorliegen von flüssigen Zubereitungen (Extrakt, Tinkturen, Tee) von Vorteil ist. Für die Entwicklung der Methode wurden die in der Literatur angegebenen Methoden zugrunde gelegt (10-15).

### **Selektivität**

Die Messung der Absorptionsspektren (190 nm bis 370 nm) am Peakbeginn, in der Peakmitte und am Peakende zeigten für Probe und Referenzsubstanzen die Peakreinheit. Dies beweist, daß für die quantitative Bestimmung nur die Furocumarine erfaßt wurden.

### **Ergebnisse und Diskussion**

Zur Verfügung standen vier Drogenproben von Lieferanten und zwei Proben aus Kiel. Letztere kommen von der Firma Schwabe, Göppingen. Die Ware der Firma Klenk war bereits für eine klinische Studie verwendet worden. Eine dünnschichtchromatographische Analyse der Galke-Ware ergab Hinweise, daß es sich bei dieser Probe um *Ruta chalepensis* handelt.

Die Untersuchung dieser Proben ergab unterschiedliche Konzentrationen an Furocumarinen (Tab.1). Für *Ruta graveolens* lagen die Konzentrationen zwischen 1,3 und 3,3 mg/g Droge, *Ruta chalepensis* enthielt nur 0,63 bis 1,3 mg/g Droge. Die für *Ruta graveolens* gefundenen Werte lagen in einem

Konzentrationsbereich, der auch von anderen Untersuchern angegeben wird (2,3).

Für eine klinische Studie wurde die von der Firma Bauer angebotene Ware ausgewählt, von der genügend zur Verfügung stand und deren Bergapten: Xanthotoxin-Verhältnis uns günstiger erschien als bei der Probe der Firma Caesar und Loretz.

Tab. 1: Furocumaringehalte verschiedener Handelsware von *Rutae herba*

Pflanzenmaterial	Herkunft	Gesamtgehalt (µg/g Droge)	Bergapten	Psoralen	Xanthotoxin
<i>Ruta graveolens</i>	Firma M. Bauer	2135 ± 146 <sup>1</sup>	842 ± 64	267 ± 23	1026 ± 76
	Firma Caesar und Loretz	3300 <sup>2</sup>	956	828	1516
	Firma Klenk	1363 <sup>2</sup>	232	139	992
	Kieler Ernte	1287 <sup>2</sup>	663	268	356
<i>Ruta chalepensis</i>	Firma Galke	1313 <sup>2</sup>	751	505	57
	Kieler Ernte	632 <sup>2</sup>	224	382	26

<sup>1</sup> Mittelwert aus 12 Ansätzen ± S.D.

<sup>2</sup> Mittelwerte aus je 2 Ansätzen (Aufarbeitungen)

Der Furocumarin-Gehalt der Ware der Firma Bauer wurde dann im Abstand von vier bis sechs Wochen auf seine Stabilität überprüft. Dabei ergab sich, daß im Laufe der bisher überprüften acht Monate keine Veränderung im Gehalt der einzelnen Furocumarine erkennbar war (Tab.2).

Tab. 2: Furocumaringehalt der zur klinischen Prüfung verwendeten Handelsware von M. Bauer in Abhängigkeit von der Dauer der Lagerung

Datum der Prüfung	Gesamtgehalt <sup>1</sup> (µg / g Droge)	Bergapten	Psoralen	Xanthotoxin
09.11.1993	2132	787	296	1049
06.12.1993	2142	802	296	1044
31.01.1994	2450	959	299	1192
26.02.1994	2044	810	247	987
05.04.1994	2125	825	253	1047
16.06.1994	2070	853	263	954

<sup>1</sup> Mittelwerte aus je 2 Ansätzen (Aufarbeitungen)

Die Furocumarinmenge, die man aus der pulverisierten Droge mit organischen Lösemitteln extrahieren kann, ist nicht identisch mit jenem Anteil, der aus der Schnittdroge in einen Heißwasserauszug gelangt. Die Löslichkeit der

einzelnen Furocumarine im Wasser ist zwar bekannt (Bergapten 5 mg/L, Xanthotoxin 36 mg/L, Psoralen 35 mg/L) (16), doch sind in einem komplexen Substanzgemisch noch andere Parameter für die Menge der in Lösung gehenden Einzelsubstanzen wichtig.

Deshalb wurde untersucht, ob die Extraktionsdauer die Menge der in Lösung gegangenen Furocumarine beeinflusst. Wie Tabelle 3 zeigt, erwies sich eine 20-minütige Extraktion als Infus als ausreichend. Längere Extraktionen, vor allem ohne weitere Erwärmung, waren ungünstig. Sie sind auch wegen möglicher Kontamination abzulehnen. Die Abnahme der Furocumarine in der 24 h-Probe erklärt sich möglicherweise daraus, daß in der Kälte Furocumarine wieder ausfallen und an die Drogenteile adsorbiert werden. Dies betrifft offenbar vor allem Bergapten, was sich im Verschieben des Bergapten: Xanthotoxin-Verhältnisses zeigt. Bergapten ist jedoch die Substanz mit der stärksten kaliumkanalblockierenden Aktivität.

Tab. 3: Furocumaringehalt von Teezubereitungen aus *Rutae herba* in Abhängigkeit von der Extraktionsdauer; Ansatz: je 10 g geschnittene Droge in 250 ml Wasser; Ware: M. Bauer

Extraktionsdauer	Gesamtgehalt <sup>1</sup> (mg)	Bergapten	Psoralen	Xanthotoxin	Verhältnis Bergapten : Xanthotoxin	extrahierbarer Anteil (%)
10 min	9,31	3,36	1,61	4,34	0,77 : 1	43,6
20 min	10,61	3,87	1,80	4,94	0,78 : 1	49,6
30 min	10,57	3,85	1,83	4,89	0,79 : 1	49,5
24 Std.	9,72	2,91	1,54	5,27	0,55 : 1	45,5

<sup>1</sup> Mittelwerte aus je 2 Ansätzen

Die Furocumarinmenge, die sich bei der Infusbereitung im Tee nachweisen läßt, ist aber auch abhängig von der Drogenmenge, die mit einer definierten Wassermenge extrahiert wird. Hier zeigt sich, daß die Furocumarinmenge mit zunehmender Drogenmenge zwar absolut noch zunimmt, relativ jedoch abnimmt von ~70% (5 g) auf 32% (20 g) (Tab.4). Hierfür ist eindeutig die schlechte Wasserlöslichkeit verantwortlich. Daraus folgt, daß 10 g Einzeldosis (bei Verwendung von 250 ml Teezubereitung) nicht überschritten werden sollte. Diese liefern immerhin etwa 10 mg an Gesamtfurocumarinen. Bei Bedarf sollte man eine zweite Dosis des Tees verabreichen.

Tab. 4: Extrahierbarer Anteil an Furocumarinen in Teezubereitungen in Abhängigkeit von der Drogenmenge; Extraktionsdauer: 10 min; Ware: M. Bauer

Drogenansatz	Gehalt der Droge	Furocumarinmenge im Tee $\pm$ S.D. <sup>1</sup>	extrahierbarer Anteil in %
5g/250 ml	10,65 mg	7,4 mg $\pm$ 0,56	69,5
10g/250 ml	21,35 mg	10,9 mg $\pm$ 0,80	51,1

20g/250 ml	42,78 mg	13,2 mg $\pm$ 1,36	32,4
------------	----------	--------------------	------

<sup>1</sup> Die Standardabweichungen liegen zwischen 7,3 und 10,3% (je 2 Ansätze)

Schließlich ist es notwendig, die Schnittdroge entsprechend verpackt anzuwenden, d.h. im Teebeutel, um einmal die visuelle Unterscheidbarkeit von Ruta- und Placebo-Tee auszuschließen und zum anderen die genaue Dosierung sicherzustellen. Die Verpackung in Cilia-Teebeuteln warf jedoch die Frage auf, ob dadurch die Freisetzung der Furocumarine beeinflusst werden könnte. Auch war nicht auszuschließen, daß eine bestimmte Menge durch Adsorption an die Beutel gebunden werden kann.

Die Überprüfung ergab jedoch, daß der Einfluß der Verpackung unerheblich ist. Die dadurch gebundene Furocumarinmenge liegt nur bei 2% (Tab.5).

Tab. 5: Einfluß des verwendeten Teebeutels auf den Anteil an extrahierbaren Furocumarinen. Extraktionsdauer: 10 min; Ansatz: 10g Droge/ 250 ml Wasser; Ware: M. Bauer

Ansatz	Gesamt- gehalt <sup>1</sup> (mg)	Bergapte n	Psorale n	Xanthotox in	Verhältnis Bergapten: Xanthotoxin
Schnittdroge lose	10,82	3,48	1,60	5,74	0,61 : 1
Schnittdroge im Beutel	10,59 <sup>2</sup>	3,40	1,56	5,63	0,60 : 1
Schnittdroge lose + leerer Beutel	10,72	3,48	1,63	5,61	0,62 : 1

<sup>1</sup> Mittelwerte aus 2 Ansätzen

<sup>2</sup> Drogen im Beutel etwa 2% Verlust

## Placebo-Tee

Eine wichtige Vorbedingung, um eine placebokontrollierte Doppelblindstudie durchzuführen, war die Entwicklung eines geeigneten Placebo-Tees. Dieser sollte – zumindest geschmacklich – dem Ruta-Tee möglichst nahe kommen. Außerdem sollte dem Placebo-Tee eine Eigenwirkung möglichst fehlen. Dadurch schieden sehr viele pflanzliche Produkte aus. Wir wählten schließlich Erdbeerblätter als Grundlage mit einem Zusatz von 5% gepulverter Enzianwurzel, um den bitteren Geschmack des Ruta-Tees zu simulieren. Zur Überdeckung des Eigengeschmacks des Ruta-Tees wurde dieser und auch der Placebo-Tee mit Erdbeeraroma-Granulat aromatisiert. Durch uns getestete Kontrollen ergaben eine befriedigende Übereinstimmung von Verum und Placebo in geschmacklicher Hinsicht.

## Zusammenfassung

1. Die Trennung und Quantifizierung der Furocumarinfraktion gelingt mit einer ausgearbeiteten HPLC-Methode. Durch die Validierung wird ihre Brauchbarkeit bestätigt. Die einzelnen Drogenherkünfte unterscheiden sich wenig im Gesamtgehalt. Das Verhältnis Bergapten : Xanthotoxin : Psoralen ist sehr variabel.
2. Betrachtet man eine bestimmte Drogenherkunft, so gilt, daß über einen Zeitraum von 8 Monaten weder die Gesamtmenge noch die Menge der einzelnen Furocumarine signifikant zu- oder abnimmt.
3. Die drei Furocumarine lassen sich mit Wasser heiß extrahieren und im Tee nachweisen, wenn dieser als Infus bereitet wird. Verlängerung der Extraktion über 20 min hinaus verbessert die Extrahierbarkeit nicht. Hält man den Tee längere Zeit bei Zimmertemperatur, verringert sich die Konzentration an gelösten Furocumarinen.
4. Verwendung höherer Drogenmengen (20 g) führt nicht zu einem linearen Anstieg der Furocumarine im Tee. Es wird schnell eine Sättigung erreicht. Von der in der Droge enthaltenen Menge lassen sich maximal 70% extrahieren. Zweimalige Extraktion kleinerer Dosen (z.B. 5 g) ist somit effizienter als die Extraktion einer größeren Drogenmenge. Die Verpackung beeinflusst die Freisetzung der Wirkstoffe nicht.
5. Es wurde ein Placebo-Tee entwickelt, der geschmacklich weitgehend dem Ruta-Tee entspricht.

## Literatur

1. Von Brocke, W., Diss. Pharmazie, Tübingen (1972)
2. Klosa, R. und A. Zänglein, Zeitschr. f. Phytother. 8, 202-206 (1987)
3. Bautz, C., Diss. Pharmazie, Kiel (1994)
4. Abel, G., persönl. Mitteilung
5. Ivie, G.W. et. al., J. Agr. Food Chem. 30, 413-416 (1982)
6. Stermitz, F.R. and R.D. Thomas, J. Chromatogr. 77, 431-433 (1973)
7. Thompson, H.J. and S.A. Brown, J. Chromatogr. 314, 323-336 (1984)
8. Weigl, R., Diplomarbeit, Erlangen (1989)
9. Zobel, A.M. and S.A. Brown, Canad. J. Bot. 67, 915-921 (1989)
10. Glowniak, K. et. al., Chem. Anal. (Warsaw) 32, 797-811 (1987)
11. Makki, S. et. al., J. Planar Chromatogr. 4, 213 (1991)
12. Oertli, E.H. et al., Phytochem. 23, 439-441 (1984)
13. Swager, T.M. and J. H. Cardellina, Phytochem 24, 805-813 (1985)
14. Waksmundzka-Hajnos, M. and T. Wawrzynowicz, J. Planar Chromatogr. 3, 439 (1990)
15. Waksmundzka-Hajnos, M. and T. Wawrzynowicz, J. Planar Chromatogr. 5, 169 (1992)
16. Dall'Acqua, F. and Rodighiero, G., Lincei-Rend. Sc. fis. mat. e nat., Vol. XL, 411-422 (1966)

Stefanie Amend, Apothekerin, und Prof. Dr. Oskar Schimmer  
Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen-Nürnberg,  
Staudtstr. 5, 91058 Erlangen