

P 17 Stabilität von Herzglykosiden in wässrigen bzw. wässrig fermentierten Extrakten aus der Meerzwiebel (*Drimia maritima* (L.) Stearn)

*Stability of cardiac glycosides in aqueous and fermented aqueous extracts from sea squill (*Drimia maritima* L. Stearn)*

Diana N. Knittel, Florian C. Stintzing, Dietmar R. Kammerer*

WALA Heilmittel GmbH, Abteilung Analytische Entwicklung / Forschung,
Dorfstraße 1, 73087 Bad Boll, Deutschland
dietmar.kammerer@wala.de.



DOI 10.5073/jka.2014.446.047

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden ein rein wässriger Extrakt und ein wässrig fermentierter Extrakt, hergestellt nach dem Homöopathischem Arzneibuch (HAB), aus der Meerzwiebel (*Drimia maritima* (L.) Stearn) bei unterschiedlichen Temperatur- und Lichtbedingungen gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde die Stabilität der Herzglykoside in diesen Extrakten mittels HPLC-DAD-MSⁿ bewertet. Die geringsten Abbauraten der Einzelkomponenten wurden bei einer Lagerung im Dunkeln bei 5 °C ermittelt. Schon eine Temperaturerhöhung auf 20 °C beschleunigte den Abbau bzw. die Metabolisierung der Bufadienolide. Die geringste Stabilität wurde unter Belichtung bei 20 °C ermittelt. Außerdem war ein deutlicher Unterschied zwischen den auf unterschiedliche Weisen gewonnenen Extrakten beobachtbar. So wiesen die Herzglykoside im Extrakt, der nach HAB hergestellt wurde, eine deutliche höhere Stabilität unter allen Lagerbedingungen auf.

Stichwörter: Meerzwiebel, Herzglykoside, Stabilität, Belichtung, Pflanzenextrakt, *Drimia maritima* (L.) Stearn

Abstract

In the present study an aqueous and a fermented aqueous extract, obtained according to the German Homoeopathic Pharmacopoeia (GHP), from sea squill (*Drimia maritima* (L.) Stearn) were stored under different light and temperature conditions. Stability of cardiac glycosides in these extracts was evaluated periodically by HPLC-DAD-MS. Lowest degradation rates of individual compounds were observed upon storage at 5 °C in the dark. Increasing the temperature at 20 °C accelerated compound degradation and the formation of bufadienolide metabolites. Poorest stability was found upon storage at 20 °C with light exposure. Furthermore, clear-cut differences were observed between the extracts obtained according to different protocols. Stability of cardiac glycosides in the extract obtained according to the GHP was generally improved, irrespective of the storage conditions.

Keywords: sea squill, cardiac glycosides, stability, light exposure, plant extract, *Drimia maritima* (L.) Stearn

Einleitung

Die herzglykosidhaltige Meerzwiebel (*Drimia maritima* (L.) Stearn) wird als Arzneipflanze hauptsächlich in der homöopathischen und anthroposophischen Medizin eingesetzt. Hierzu werden u.a. wässrige Extrakte verwendet. Studien zur Stabilität von Herzglykosiden liegen bislang nahezu ausschließlich für ethanolische Digitalisauszüge oder getrocknete Digitalis-Blätter vor (MALINGRE, 1968; WICHTL, 1970) und können nur bedingt auf die o.g. Extrakte übertragen werden. Digitalis enthält im Unterschied zur Meerzwiebel Cardenolide als herzwirksame Substanzen, während für die Bufadienolide in *Drimia* bislang kaum Daten vorliegen. Lediglich die Stabilität von Bufadienolid-Aglykonen aus Krötengift, das in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) eingesetzt wird, wurde anhand von Reinsubstanzen im wässrigen Medium bewertet (WENG et al., 2010). Neuere Untersuchungen an *Drimia*-Extrakten zeigten ein komplexes Herzglykosidprofil auf (KNITTEL et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss das Herstellungsverfahren und die Lagerbedingungen auf die Stabilität von Bufadienoliden in wässriger Lösung haben.

Material und Methoden

Extraktherstellung

Aus zerkleinertem, frischem Pflanzenmaterial der Meerzwiebel (Herkunft: Sardinien) wurden zwei Extrakte hergestellt. Der wässrige Auszug wurde durch zweimalige Extraktion mit Wasser bei 5 °C gewonnen. Die vereinigten Fraktionen wurden zur Konservierung mit Sorbinsäure (500 mg/L) versetzt. Der wässrig fermentierte Extrakt wurde gemäß Vorschrift 33b des HAB (HAB, 2011) hergestellt und nach einer 12-monatigen Reifung filtriert.

Lagerung

Die Extrakte wurden aliquotiert und in Glasgefäßen unter folgenden Bedingungen gelagert:

- Lichtausschluss, 5 °C
- Lichtausschluss, 20 °C
- Tageslicht, 20 °C

Die Proben wurden in regelmäßigen zeitlichen Abständen mittels HPLC analysiert. Die maximale Lagerzeit betrug 180 Tage.

Charakterisierung und Quantifizierung der Bufadienolide

Die Extrakte wurden zentrifugiert und mittels HPLC-DAD-MSⁿ (KNITTEL et al., 2014) analysiert. Die Herzglykoside wurden anhand ihrer UV-Maxima bei $\lambda = 300$ nm und ihrer MS-Spektren charakterisiert. Eine semi-quantitative Beurteilung der Einzelkomponenten erfolgte über die Peakflächen. Die Stabilität der Einzelkomponenten wurde anhand der auf den zu Beginn der Lagerung bezogenen relativen Peakflächen bewertet.

Ergebnisse

Wässriger Extrakt

Der rein wässrige Extrakt wies acht Herzglykoside auf. Die geringste Stabilität der Einzelkomponenten war bei einer Lagerung bei 20 °C unter Lichteinfluss zu erkennen. Bereits nach sieben Tagen waren zwei Herzglykoside nicht mehr nachweisbar, vier Verbindungen waren nur noch zu 4-6 % und zwei noch zu 12 % ihres Anfangsgehalts nachweisbar. Nach 14 Tagen waren sämtliche Herzglykoside vollständig abgebaut. Eine wesentlich höhere Stabilität zeigte der unter Lichtausschluss gelagerte Extrakt. Bei einer Temperatur von 20 °C konnten nach 180 Tagen bei sechs der acht Herzglykoside noch 60-80 % der Anfangskonzentrationen ermittelt werden. Zwei Verbindungen wurden in diesem Zeitraum fast vollständig unter Freisetzung des korrespondierenden Aglykons hydrolysiert. Dagegen war der Abbau bei einer Temperatur von 5 °C deutlich verlangsamt. Am Ende der Lagerzeit wurden Gehalte zwischen 70-95 % der Anfangskonzentrationen ermittelt.

Wässrig fermentierter Extrakt

Im wässrig fermentierten Extrakt konnten zwölf Herzglykoside nachgewiesen werden. Auch hier veränderte sich der Gehalt der Einzelkomponenten am stärksten, wenn der Extrakt bei 20 °C unter Lichteinfluss gelagert wurde. Im Unterschied zum rein wässrigen Extrakt konnten noch nach 30 Tagen Lagerung neun Herzglykoside nachgewiesen werden. Die relative Abbaurate bei einer Lagerung bei 20 °C unter Lichtausschluss betrug nach 180 Tagen bei fünf Herzglykosiden um 20 % und bei weiteren fünf Verbindungen zwischen 35-45 %. Bei zwei Herzglykosiden war in diesem Zeitraum sogar eine Zunahme des Gehalts zu verzeichnen, was vermutlich auf eine Umlagerung strukturell verwandter Herzglykoside, etwa durch Desacetylierung, erklärt werden kann. Bei einer Lagertemperatur von 5 °C wurden erwartungsgemäß geringere Abbauraten der Herzglykoside beobachtet. Alle Verbindungen wiesen am Ende der Lagerzeit noch mindestens 90 % ihres

Anfangsgehalts auf. Wie auch bei der Lagerung bei 20 °C erhöhte sich der Gehalt einer Verbindung durch enzymatische oder chemische Umsetzung strukturverwandter Verbindungen.

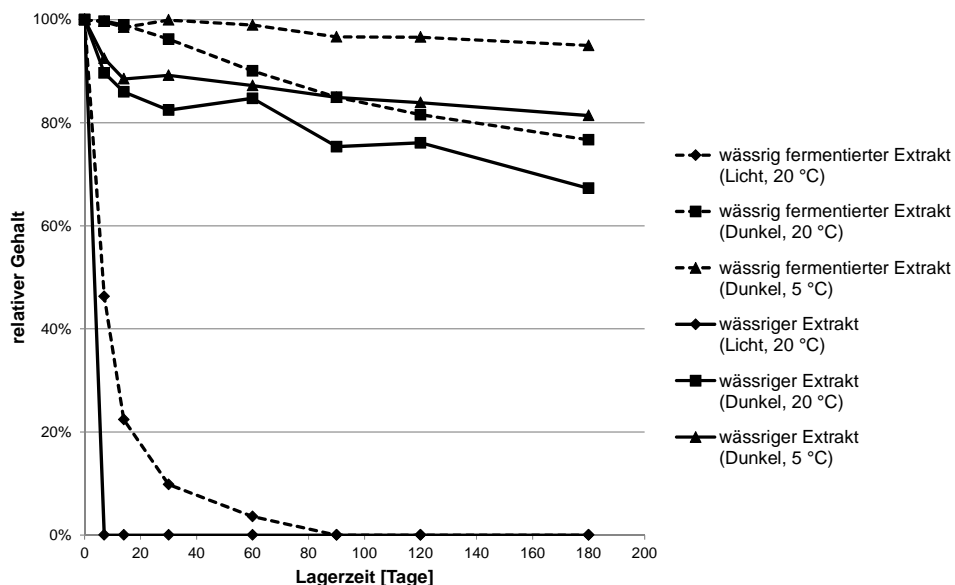


Abb. 1 Stabilität von Herzglykosiden im Verlauf der Lagerung über einen Zeitraum von 180 Tagen am Beispiel von Scillirosid (Scillirosidin-glucosid) in Meerzwiebelextrakten.

Fig. 1 Stability of cardiac glycosides upon storage for 180 days, exemplified for scilliroside (scillirosidin-glucoside) in sea squill extracts.

Die Daten zeigen, dass im wässrigen Milieu insbesondere Temperatur und Licht einen wesentlichen Einfluss auf die Lagerstabilität der Herzglykoside haben. Eine Lagerung sollte demnach bei möglichst niedrigen Temperaturen und unter Lichtausschluss erfolgen, da hierbei enzymatische und chemische Abbauprozesse deutlich verringert sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Extrakterstellung einen merklichen Einfluss auf die Stabilität der Herzglykoside hat. So zeigte sich, dass ein zusätzlicher Fermentationsschritt die Stabilität der Herzglykoside erhöht.

Literatur

- HAB - HOMÖOPATHISCHES ARZNEIBUCH, 2011: H 5.4.4 Spezielle Herstellvorschriften, Vorschrift 33-37. Govi-Verlag, Eschborn.
- KNITTEL, D. N., STINTZING, F. C. UND D. R. KAMMERER, 2014: Simultaneous determination of bufadienolides and phenolic compounds in sea squill (*Drimia maritima* (L.) Stearn) by HPLC-DAD-MSⁿ as a means to differentiate individual plant parts and developmental stages. *Anal Bioanal Chem*, eingereicht.
- MALINGRÉ, T., 1969: Die Stabilität von Pflanzenextrakten. *Pharm Ind* **31**, 15-20.
- WENG, Y., LI, F. MIAO, Y. UND X. TANG, 2010: Intravenous bufadienolides-loaded lipid microspheres for improving chemical stability. *Eur J Lipid Sci Tech* **112**, 1190-1198.
- WICHTL, M., 1970: Wirkstoffänderung bei der Drogenbereitung (Trocknung der Arzneipflanzen). *Pharmazie* **25**, 692-698.