

## **Kalmustinktur**

### **Calami tinctura**

#### *Tinctura Calami*

#### **Definition**

Kalmustinktur wird aus **Kalmuswurzelstock (Calami Rhizoma, Radix Calami, ÖAB)** hergestellt.

*Gehalt:* mindestens 0,3 Prozent ätherisches Öl.

#### **Herstellung**

Die Tinktur wird aus 20 Teilen Kalmuswurzel und 100 Teilen Ethanol 70 Prozent *R*, nach einem geeigneten Verfahren hergestellt.

#### **Eigenschaften**

*Beschreibung:*

Bräunlichgelbe Flüssigkeit

*Mischbarkeit:*

Kalmustinktur ist in verdünntem Alkohol oder der gleichen Menge Alkohol klar löslich; mit Wasser trüb mischbar.

#### **Prüfung auf Identität**

Dünnschichtchromatographie (Ph. Eur. 2.2.27)

*Untersuchungslösung:* Kalmustinktur

*Referenzlösung:* 20 mg Anethol *R* und 20 mg  $\beta$ -Asaron werden in 10 ml Methanol *R* gelöst.

*Platte:* DC-Platte mit Kieselgel F<sub>254</sub> *R* (5-40 $\mu$ m) [oder DC-Platte mit Kieselgel F<sub>254</sub> *R* (2-10 $\mu$ m)]

*Fließmittel:* Toluol *R*; Ethylacetat *R* (93:7; *V/V*)

*Auftragen:* 30  $\mu$ l [oder 15  $\mu$ l] Untersuchungslösung und 10  $\mu$ l [oder 5  $\mu$ l] Referenzlösung; bandförmig (10mm)

*Laufstrecke:* 15 cm [oder 8 cm]

*Trocknen:* an der Luft

*Detektion:* Die Platte wird mit Anisaldehyd-Reagenz *R* besprüht und 5-10 Minuten lang bei 105 °C erhitzt bis zur deutlichen Farbentwicklung. Die Auswertung erfolgt im Tageslicht.

*Ergebnis:* Die Zonenfolge in den Chromatogrammen ist aus nachstehender Abbildung ersichtlich.

<b>Oberer Plattenrand</b>	
Anethol: eine violette Zone	eine blauviolette Zone
	eine blauviolette Zone
	eine braunviolette Zone
β-Asaron: eine braunviolette Zone	eine braunviolette Zone (β-Asaron)
	eine violette Zone
<b>Referenzlösung</b>	<b>Untersuchungslösung</b>

### Prüfung auf Reinheit

*Relative Dichte:*  $\rho = 0,897 - 0,907$  (Ph. Eur. 2.2.5)

*Alkoholgehalt:* Mindestens 65,0 Vol. Prozent (Ph. Eur. 2.9.10)

*Methylalkohol/ iso-Propylalkohol:* höchstens 0,05 Prozent V/V Methanol und höchstens 0,05 Prozent V/V iso-Propylalkohol (Ph. Eur. 2.9.11)

*Trockenrückstand:* Mindestens 3,3 Prozent (Ph. Eur. 2.8.16)

*β-Asaron: Flüssigchromatographie:* Maximal 0,1 Prozent (Ph. Eur. 2.2.29)

*Untersuchungslösung:* 1,0 g Tinktur werden mit Methanol R auf 100,0 ml aufgefüllt.

*Referenzlösung a:* 10,0 mg β-Asaron R werden mit Methanol R zu 100,0 ml gelöst. 10,0 ml dieser Lösung werden mit Methanol R zu 100,0 ml ergänzt.

*Referenzlösung b:* 10,0 mg α-Asaron R werden mit Methanol R zu 100,0 ml gelöst. 2,0 ml dieser Lösung werden mit Referenzlösung a zu 20,0 ml ergänzt.

*Säule:*<sup>1</sup>

- Größe:  $l = 0,25$  m,  $\varnothing = 4,6$  mm

- Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R (5 μm)

*Mobile Phase:* Acetonitril R, Wasser R (50:50, V/V)

*Durchflussrate:*  $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

*Detektion:* Spektrometer bei 303 nm

*Einspritzen:* 20 μl

<sup>1</sup> Thermo-Hypersil BDS C18 ist geeignet

*Eignungsprüfung*: mindestens 1,2 zwischen den Peaks von  $\beta$ -Asaron und  $\alpha$ -Asaron  
Falls erforderlich wird der Anteil an Acetonitril in der mobilen Phase geändert.

Der Prozentgehalt an  $\beta$ -Asaron wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 10 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 100}$$

$A_1$  = Peakfläche von  $\beta$ -Asaron im Chromatogramm der Untersuchungslösung

$A_2$  = Peakfläche von  $\beta$ -Asaron im Chromatogramm der Referenzlösung

$m_1$  = Einwaage der Tinktur in der Untersuchungslösung in Gramm

$m_2$  = Einwaage von  $\beta$ -Asaron *R* in der Referenzlösung in Gramm

$p$  = Prozentgehalt an  $\beta$ -Asaron in  $\beta$ -Asaron *R*

### **Gehaltsbestimmung**

20,0 g Tinktur werden in einem 1000 ml Rundkolben mit 300 ml Wasser *R* versetzt und so lange destilliert, bis 200 ml Destillat in ein Auffanggefäß übergegangen sind. In einem Scheidetrichter werden 65 g Natriumchlorid *R* im Destillat gelöst. Die Lösung wird 3-mal mit je 30 ml Pentan *R* ausgeschüttelt, mit denen zuvor der bei der Destillation benutzte Kühler und das Auffanggefäß gespült wurden. Die vereinigten Pentanauszüge werden über 3 g wasserfreiem Natriumsulfat *R* getrocknet und in einen im Exsikkator 3 h lang getrockneten 100-ml-Rundkolben filtriert. Natriumsulfat und Filter werden 2-mal mit je 20 ml Pentan *R* gewaschen. Das Lösungsmittel wird in einem Wasserbad von 45 °C abdestilliert. Der letzte Rest Pentan wird durch einen Luftstrom 3 min lang abgeblasen. Der Kolben wird 3 h lang im Exsikkator getrocknet und anschließend gewogen. Das zurückbleibende Öl muss braun-orange sein.

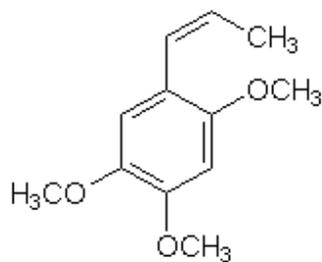
### **Lagerung**

Vor Licht geschützt, in dicht schließenden Gefäßen.

## ANHANG

### Reagentien

$\beta$ -Asaron<sup>2</sup>



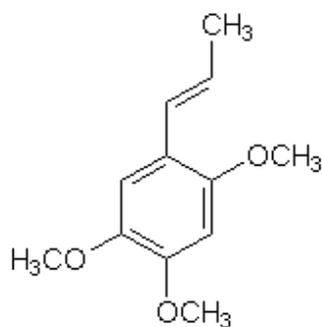
*cis*- $\beta$ -Asaron

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub> M<sub>r</sub>=208,26

CAS No. 5273-86-9

*cis*-1-Propenyl-2,4,5-trimethoxybenzol, 1,2,4-Trimethoxy-5-(*Z*)-1-propenylbenzol

$\alpha$ -Asaron<sup>3</sup>



*trans*- $\alpha$ -Asaron

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub> M<sub>r</sub>=208,26

CAS No. 2883-98-9

*trans*-1-Propenyl-2,4,5-trimethoxybenzol, 1,2,4-Trimethoxy-5-(*E*)-1-propenylbenzol

---

<sup>2</sup> Lieferant Phytolab ist geeignet

<sup>3</sup> Lieferant Fluka ist geeignet

Experimentell ermittelte Daten:

**Probenbezeichnung:**

Zur Überarbeitung der Monographie wurden folgende Materialien verwendet:

Probe Nr.	Firma	Chargen-/Kontrollnr.	Ablauf
1	Gatt Koller	2475/0609 2609	06/2012
2	Pharmonta	PH-177/09	04/2014
3	Kwizda	805328	01/2011

Weiters wurden aus folgenden Kalmuswurzelproben selbst Tinkturen hergestellt:

Probe Nr.	Firma	Chargen-/Kontrollnr.	Ablauf
4	Kottas	KLA90732	12/2011
5	Martin Bauer Group	386/10; 100047	-----

**Bestimmung der relativen Dichte:**

Die Bestimmung der relativen Dichte wurde nach der Methode Ph.Eur.2.2.5 durchgeführt.

Probennummer	Absolute Dichte	Relative Dichte
1a	0,8975	0,8990
1b	0,8975	0,8990
2a	0,8985	0,8995
2b	0,8990	0,9000
3a	0,8975	0,8990
3b	0,8980	0,8997
4a	0,9050	0,9067
4b	0,9080	0,9097
5a	0,9045	0,9060
5b	0,9095	0,9110

**Ergebnis:**

Die Dichtewerte entsprechen größtenteils den derzeit im ÖAB geforderten Werten (0,895 – 0,905). Die absolute Dichte der untersuchten Tinkturen bewegt sich zwischen 0,8975-0,9095, das entspricht umgerechnet in relative Dichte Werte von 0,8990 – 0,9110. Da in der Ph. Eur. nur mehr die relative Dichte bestimmt wird, schlagen wir für diese Kennzahl einen geforderten Bereich von 0,897 – 0,907 vor.

**Ethanolgehaltsbestimmung:**

Der Gehalt an Ethanol wurde nach der Methode 2.9.10. lt. Ph. Eur. bestimmt.

Probennummer	Ethanolgehalt in Prozent
1a	66,8
1b	66,8
2a	65,3
2b	65,0
3a	66,8
3b	66,5
4a	62,5

4b	62,2
5a	61,2
5b	60,7

#### Ergebnis:

Der geforderte Alkoholgehalt wird von dreien der untersuchten Tinkturen erfüllt. Tinktur 4 und 5, die selbst hergestellt wurden, weisen einen zu geringen Gehalt auf. Da die nicht selbst hergestellten Tinkturen der Forderung des ÖAB entsprechen, schlagen wir vor den minimalen Alkoholgehalt von 65% lt. derzeitiger Monographie des ÖAB beizubehalten.

#### Bestimmung des Gehalts an $\beta$ -Asaron mittels HPLC:

Die Bestimmung des  $\beta$ -Asaron-Gehalts wurde nach der Methode Flüssigchromatographie aus der Monographie Radix Calami lt. ÖAB durchgeführt.

Säule: Thermo-Hypersil BDS C18

- Größe:  $l = 0,25$  m,  $\varnothing = 4,6$  mm

- Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R (5  $\mu$ m)

Mobile Phase: Wasser R, Acetonitril R (50:50, V/V)

Durchflussrate:  $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Einspritzen: 20  $\mu$ l

Detektion: Spektrometer bei 303 nm

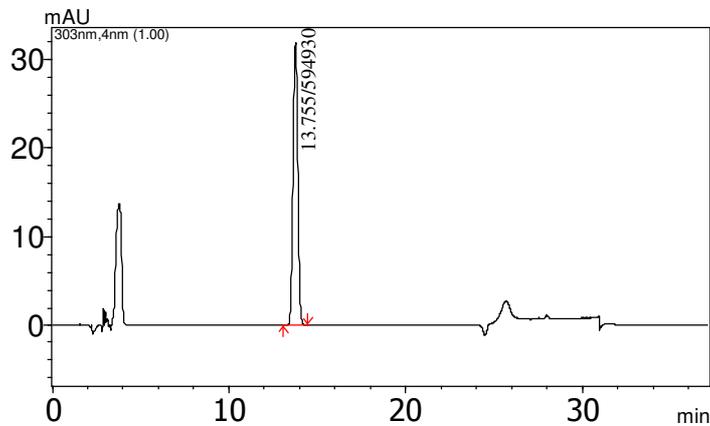
Probennummer	Gehalt an $\beta$ -Asaron in Prozent
Tinktur 1a	0,032
Tinktur 1b	0,031
Tinktur 2a	0,032
Tinktur 2b	0,032
Tinktur 3a	0,049
Tinktur 3b	0,049
Tinktur 4a	0,037
Tinktur 4b	0,036
Tinktur 5a	0,029
Tinktur 5b	0,028

#### Ergebnis:

Die Zusammensetzung der mobilen Phasen wurde von 60:40 in der Monographie Kalmuswurzel ÖAB auf 50:50 wegen unzureichender Basislinientrennung der Peaks von  $\beta$ -Asaron und anderen Begleitstoffen abgeändert.

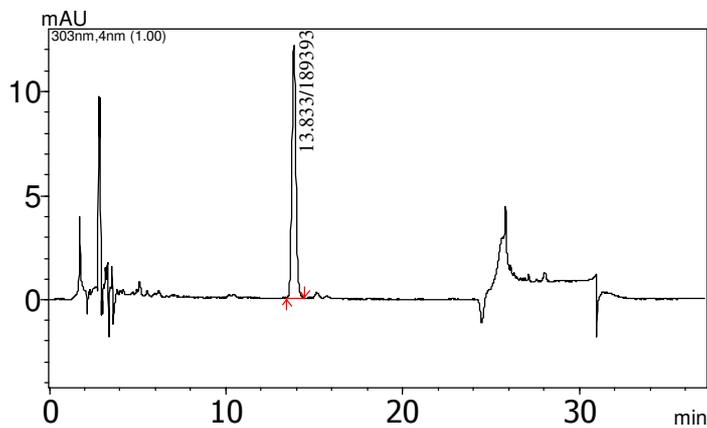
Der Gehalt an  $\beta$ -Asaron bewegt sich zwischen 0,028 und 0,049 Prozent. Wir schlagen daher einen Maximalgehalt von 0,1 Prozent vor, der sich auch rein rechnerisch aus dem Maximalgehalt der Kalmuswurzel von 0,5 Prozent  $\beta$ -Asaron und dem Ansatzverhältnis bei der Herstellung von Kalmustinktur von 1:5 ergibt.

### Chromatogramm Referenzlösung



Peak:  $R_t$  13,76;  $\beta$ -Asaron

### Chromatogramm Probe 1



Peak:  $R_t$  13,83;  $\beta$ -Asaron

### Gehaltsbestimmung mittels Wasserdampfdestillation:

In der aktuellen Monographie wurde die Bestimmung des  $\beta$ -Asaron-Gehalts, bei der es sich um eine Überprüfung der Reinheit handelt, unter dem Punkt Gehaltsbestimmung geführt. Diese soll in der neuen Monographie richtig eingeordnet werden, an ihre Stelle tritt als Gehaltsbestimmung die Bestimmung des ätherischen Öls in der Zubereitung.

Die Bestimmung des Gehalts an ätherischem Öl erfolgt nach der Methode aus der Monographie Kamillenfluidextrakt der Ph.Eur.(6.0/1544).

Probennummer	Gehalt an ÄÖ in Prozent
Tinktur 1a	0,576
Tinktur 1b	0,613
Tinktur 2a	0,552
Tinktur 2b	0,650
Tinktur 3a	0,711
Tinktur 3b	0,730
Tinktur 4a	0,660
Tinktur 4b	0,604

Tinktur 5a	0,635
Tinktur 5b	0,658

#### Ergebnis:

Der Gehalt an ätherischem Öl in der Tinktur liegt bei Werten von mindestens 0,552 Prozent und maximal 0,730 Prozent. Wir schlagen einen Mindestgehalt von 0,3 Prozent für die neue Monographie vor, da sich dieser rechnerisch aus dem geforderten Mindestgehalt an ätherischem Öl in der Wurzel Droge von 1,5 Prozent ergibt.

#### Identitätsprüfung mittels DC:

Zur Prüfung der Identität von Kalmustinktur wurde die DC-Methode aus der Monographie Radix Calami It. ÖAB herangezogen.

DC: Kieselgel Alufolie 60 F<sub>254</sub> R 20 x 20 cm; (5-40µm)

Fließmittel: Toluol R:Ethylacetat R (85:15; V/V)

Laufstrecke: 15 cm

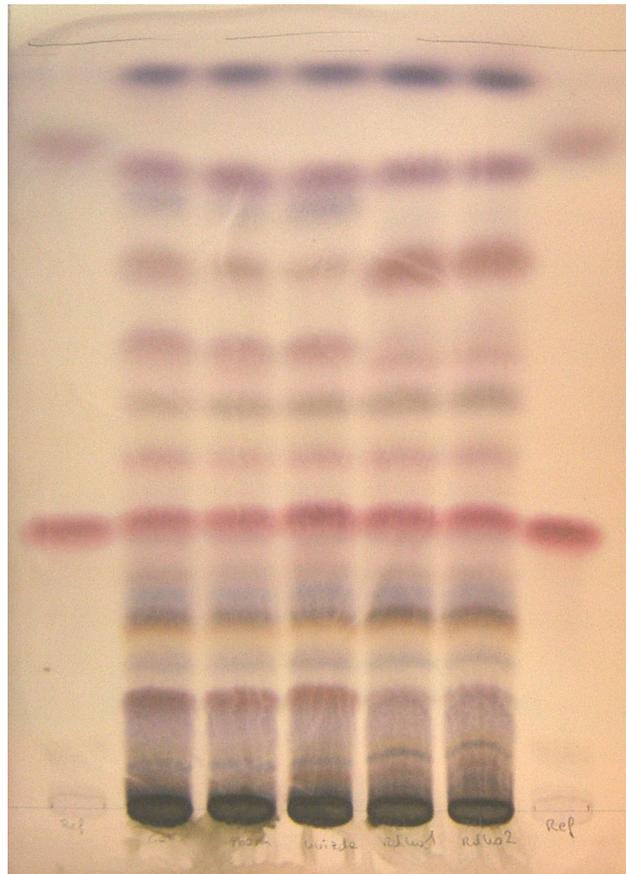
Auftragemenge: Tinktur 30 µl; bandförmig 10 mm

Referenzlösung 10 µl; bandförmig 10 mm

Detektion: Tageslicht, nach Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagens R

Bahn 2 - 6: Proben Nr. 1 - 5; 30 µl

Bahn 1 und 7: Referenzlösung je 20 mg Anethol R und β-Asaron R in 10 ml Methanol R; 10 µl



1 2 3 4 5 6 7

HPTLC Kieselgel-Fertigplatte 60 F<sub>254</sub> R 10 x 10 cm; (2-10µm)

Fließmittel: Toluol R:Ethylacetat R (85:15; V/V)

Laufstrecke: 8 cm

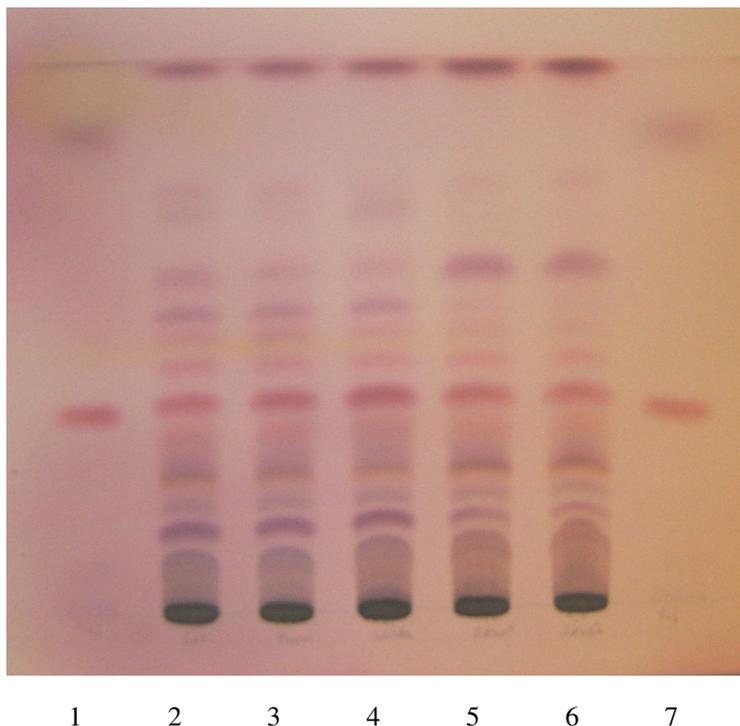
Auftragemenge: Tinktur 15 µl; bandförmig 10 mm

Referenzlösung 5 µl; bandförmig 10 mm

Detektion: Tageslicht, nach Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagens R

Bahn 2 - 6: Proben Nr. 1 - 5; 30 µl

Bahn 1 und 7: Referenzlösung je 20 mg Anethol R und β-Asaron R in 10 ml Methanol R; 10 µl



Ergebnis:

Wie in der Abbildung ersichtlich, ist das DC-System der Monographie Radix Calami ÖAB auch für die Zubereitung Tinctura Calami ÖAB, anwendbar.

Trockenrückstand:

Die Bestimmung des Trockenrückstandes erfolgte nach der Methode der Ph.Eur.2.8.16.

Probennummer	Trockenrückstand in Prozent
Tinktur 1a	3,36
Tinktur 1b	3,36
Tinktur 2a	3,68
Tinktur 2b	3,71
Tinktur 3a	3,70
Tinktur 3b	3,79
Tinktur 4a	2,84
Tinktur 4b	2,97
Tinktur 5a	5,03
Tinktur 5b	5,06

**Ergebnis:**

Die Werte rangieren zwischen 2,83 und 5,06 Prozent.

Bis auf eine der selbst hergestellten Tinkturen entsprechen alle Tinkturen dem im ÖAB geforderten derzeitigen Prozentsatz. Wir schlagen daher vor, den minimalen Trockenrückstand von 3,3 Prozent lt. derzeitiger Monographie des ÖAB beizubehalten.

**Referenzen:**

ÖAB 2009

Ph.Eur.6