

Pharmacognostical examination concerning the hemostyptic effect of *Achillea millefolium* Aggregat

U. Sellerberg¹ und H. Glasl*

Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie der Universität Münster,
Hittorfstr. 56, D-48149 Münster, Deutschland

(¹Part of the PhD thesis; *Reprint author)

Abstract: Yarrow (*Achillea millefolium* Aggregat) is traditionally used against bleeding. Aqueous hot extracts were turbid and shortened the recalcification time, a global test of the blood coagulation. The residue obtained by membrane filtration of these extracts was the active fraction. This residue is probably located mostly in the stem. By pressure obtained juice elongated the blood coagulation. Compared with non-flowering and withered material, the blooming herb showed best effects. The storage conditions had no effect on the activity of the herb.

Keywords: *Achillea millefolium*; blood coagulation; recalcification time; pharmacognosia

Einleitung

Die Schafgarbe, *Achillea millefolium* Aggregat (Asteraceae), wird volksheilkundlich seit Jahrhunderten zur Blutstillung verwendet [1]. Die hämostyptische Wirkung konnte 1939 an Hundeoxalatplasma belegt werden [2]. Miller et al. [3] postulierten 1954 das wasserlösliche Betain Betonicin als hämostyptische Wirksubstanz *in vivo*. In unseren Untersuchungen wurden Extrakte *in vitro* im Testsystem der Recalcifizierungszeit (RC-Zeit) unter Verwendung von Humanplasma untersucht [4,5].

Ergebnisse und Diskussion

Betonicin beeinflusste die RC-Zeit nicht. Wäßrige Heißextrakte der im Handel erhältlichen geschnittenen Krautdroge (= "Handelsdroge") von *A. millefolium* Aggregat verkürzten konzentrationsabhängig die RC-Zeit (s. Abb. 1). Als Referenz diente 0,9 %ige NaCl-Lösung. Der 5 %ige Extrakt zeigte die maximale Wirkung auf die RC-Zeit, er verkürzte sie auf $(42,5 \pm 2,1)$ % der Referenz. Dieser trübe Extrakt wurde durch Membranfiltration in ein Retentat und ein klares Filtrat

fraktioniert. Das Retentat war zu 0,6 % in der Droge enthalten. Das isolierte Retentat zeigte in einer Konzentration, die in etwa seinem Gehalt am Extrakt entsprach (0,25 mg/ml), vergleichbare Wirkung ($55,3 \pm 1,1\%$). Das Optimum der Verkürzung der RC-Zeit auf ($39,9 \pm 0,9\%$) der Referenz lag bei einer Konzentration von 0,75 mg/ml. Das klare Filtrat veränderte die RC-Zeit nicht. Daher ist das Retentat die aktive Fraktion. Das Retentat war in keinem üblichen Solvens löslich [6].

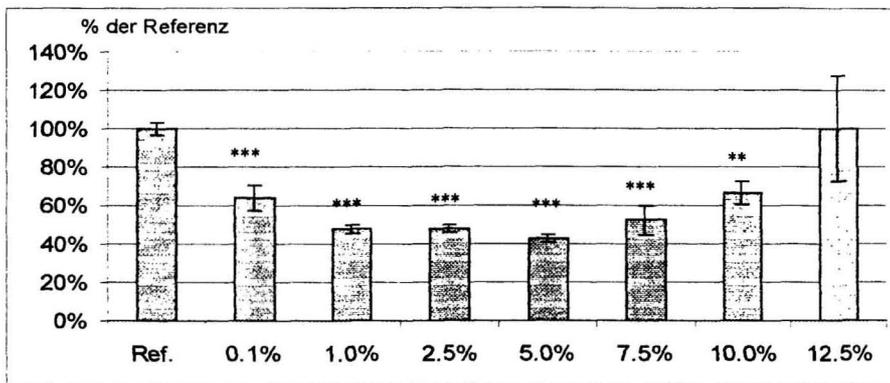


Abb. 1: Konzentrationsabhängige Beeinflussung der RC-Zeit durch wäßrige Heißextrakte aus Handelsdroge von *A. millefolium* Aggregat. Als Referenz (Ref.) diente eine 0,9 % ige NaCl-Lösung. MW und Standardabweichung aus jeweils 8 Bestimmungen. (** = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; Berechnung s. [10])

Fremdoberflächen können die Blutgerinnung aktivieren [7]. Um zu überprüfen, ob die Wirkung des Retentats aus *A. millefolium* Aggregat spezifisch ist, wurde eine Negativkontrolle gesucht. Das Kraut des Blutweiderichs, *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae), wird ebenfalls volksmedizinisch als Hämostyptikum verwendet [8]. Der 5 %ige wäßrige Heißextrakt hob die Blutgerinnung auf, wirkt also nicht hämostyptisch. Suspensionen (0,75 mg/ml bzw. 1,5 mg/ml) des aus diesem Extrakt durch Membranfiltration (s.o.) isolierten „Retentat Lythrum“ verlängerten die RC-Zeit auf ($152,3 \pm 6,3\%$ bzw. ($194,1 \pm 9,2\%$) der Referenz; es wurde deshalb bei den weiteren Untersuchungen als Negativkontrolle verwendet. Eine unspezifische Aktivierung der Blutgerinnung allein durch Anwesenheit einer Fremdoberfläche konnte daher als Wirkungsmechanismus des aus *A. millefolium* Aggregat isolierten Retentats ausgeschlossen werden. Es handelt sich demnach um eine spezifisch wirkende Substanz.

Überprüfung verschiedener Kleinarten und Bastarde

Zum *Achillea millefolium* Aggregat gehören verschiedene Kleinarten und Bastarde. Fünf verschiedene Proben aus dem *Achillea millefolium* Aggregat wurden aus Samen kultiviert. Untersucht wurden jeweils 5 %ige wäßrige Heißextrakte (5g der getrockneten Droge (Probendurchschnitt) auf 100 g Wasser). Die hämostyptischen Wirkungen aller untersuchten Proben waren mit der Handelsdroge vergleichbar und lagen bezogen auf die Referenz zwischen $(40,3 \pm 4,3) \%$ und $(57,2 \pm 5,1) \%$.

Auftrennung in Organe

Das frische Kraut einer der Proben des *A. millefolium* Aggregats wurde nach Organen getrennt und getrocknet gewogen. Es bestand zu 51 % aus Stengeln, zu 33 % aus Blütenständen und zu 16 % aus Blättern. Die Wirkung der wäßrigen Heißextrakte jedes Organs wurden in verschiedenen Konzentrationen untersucht (s. Abb. 2)

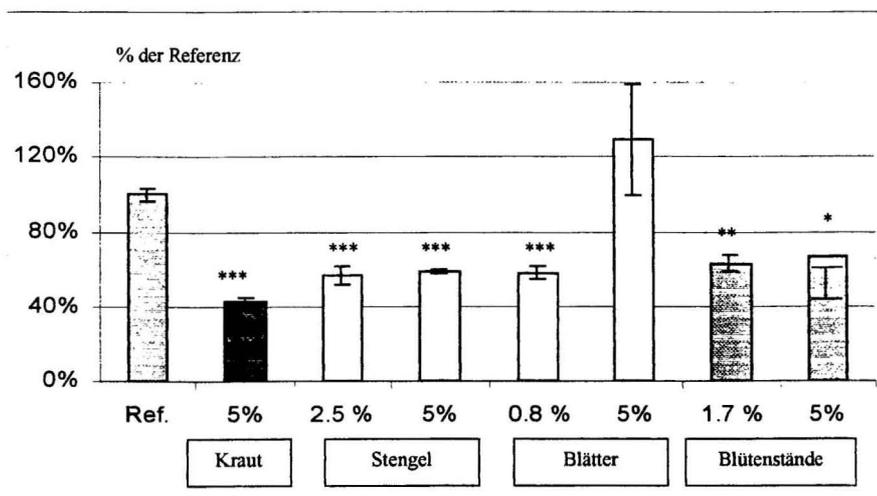


Abb. 2: Das Kraut einer Probe des *A. millefolium* Aggregats wurde nach Organen aufgetrennt. Von den Organen wurden 5 %ige und dem Anteil am 5 %igen Krautextrakt entsprechende Konzentrationen getestet. MW und Standardabweichung aus jeweils 8 Bestimmungen. (* = $p < 0,01$; ** = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; Berechnung s. [10])

In den Konzentrationen, die dem Anteil am Kraut entsprachen, hatten wäßrige Heißextrakte aus Stengeln und Blättern eine dem Kraut vergleichbare hämostyptische Wirkung. Diese Wirkung blieb bei den Stengelextrakten unabhängig von der Konzentration erhalten. Bei Konzentrationserhöhung

verloren die Blattextrakte hingegen ihre Wirkung. Es wurde gefolgert, daß das Retentat vor allem in den Stengeln lokalisiert ist.

Frischpflanzenpreßsaft

Volksmedizinisch wird der Frischpflanzenpreßsaft angewendet. Der Preßsaft einer der Proben aus dem *Achillea millefolium* Aggregat wurde auf seine hämostyptischen Wirkungen hin untersucht. Unverdünnt hob er die Blutgerinnung auf, verdünnt verlängerte er die RC-Zeit (s. Abb. 3). Der aus dem trüben Preßsaft durch Membranfiltration isolierte Rückstand verlängerte die RC-Zeit ebenso wie das Filtrat der Membranfiltration. Das wirksame Prinzip ist also nicht im Preßsaft enthalten.

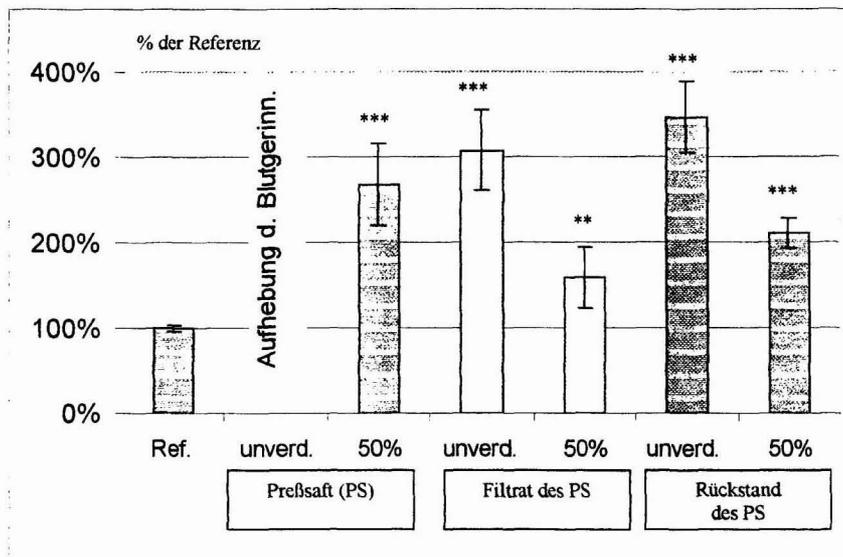


Abb. 3: Der Frischpflanzenpreßsaft aus einer der Proben des *A. millefolium* Aggregats wurde unverdünnt (unverd.) und auf 50 % verdünnt untersucht. Zusätzlich wurde er membranfiltriert und das Filtrat ebenfalls unverdünnt und auf 50 % verdünnt untersucht. Der Rückstand der Membranfiltration wurde in 0,9 %iger NaCl-Lösung suspendiert und in Konzentrationen getestet, die seinem Anteil im unverdünnten und auf 50 % verdünnten Preßsaft entsprachen. MW und Standardabweichung aus jeweils 8 Bestimmungen. (** = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; Berechnung s. [10])

Erntezeitpunkt und Lagerungsbedingungen

Das Kraut (untersucht an einer der Proben aus dem *A. millefolium* Aggregat) wirkte hämostyptisch, wenn es zur Blütezeit (Juli/August) geerntet wurde. Weder im rein vegetativen (Mai) noch im ver-

welkten Stadium (September) verkürzten wäßrige Heißextrakte die RC-Zeit. Die Trocknungs- und Lagerungsbedingungen hatten keinen signifikanten Einfluß auf die hämostyptische Wirkung.

Zusammenfassung

Wäßrige Heißextrakte aus dem Kraut von *A. millefolium* Aggregat beschleunigen *in vitro* im Testsystem der Recalzifizierungszeit hochsignifikant die Blutgerinnung von Humanplasma. Das aus den Extrakten durch Membranfiltration isolierte, unlösliche Retentat ist die Wirkfraktion.

Ein ähnliches Retentat ist z. B. für die hämostyptische Wirkung von *Capsella bursa-pastoris* (L.) MEDIK. verantwortlich [4]. Während jedoch bei der Gattung *Capsella* eine hämostyptische Wirkung nur bei der Art *C. bursa-pastoris* (L.) Medik. gefunden wurde [4], zeigen alle untersuchten Proben des *Achillea-millefolium* Aggregats vergleichbare Wirkungen. Die Stengel wiesen die stärkste Wirkung aller Organe auf. Der Frischpflanzenpreßsaft und seine Fraktionen waren unwirksam, sie verlängerten sogar die Blutgerinnung. Am stärksten wirksam waren Extrakte aus dem zur Blütezeit geernteten Kraut. Die Lagerungsbedingungen hatten keinen Einfluß auf die Wirkung. Dies steht wiederum im Gegensatz zu den Untersuchungen über *C. bursa-pastoris* (L.) MEDIK., da sich dessen hämostyptische Wirkung erst durch postmortale Lichtexposition entwickelt [4, 5].

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Handelsdrogen wurden von der Fa. Caelo (*A. millefolium* Aggregat Ch.-B.: 50874295; 50874275; 73917487; 73917487; *L. salicaria* L. Ch.-B.: 52592315) bezogen. Das im Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie der Universität Münster kultivierte Material wurde luftgetrocknet und kühl gelagert. Herbarbelege der einzelnen Proben sind im genannten Institut archiviert.

Recalzifizierungszeit

Das Blut wurde von gesunden, freiwilligen Probanden durch Venenpunktion unter entsprechenden Vorichtsmaßnahmen gewonnen und zu Citratplasma verarbeitet. Das Plasma wurde 15 min lang bei 2000 g zentrifugiert, gepoolt und bei -78 °C gelagert [4, 9].

Die Bestimmung der Gerinnungszeiten erfolgte in einem Häkchen-Koagulometer nach Schnittger und Groß. Das Koagulometer [Gerätebeschreibung in 4, 5] besaß vier Meßstellen, an jeder wurde zweimal die Referenz und zweimal die Probe vermessen (insgesamt 8 Meßwerte pro Probe und 8 Meßwerte für Referenz). Das Plasma wurde in einem auf 37 °C aufgewärmten Wasserbad 5,0 min lang (Stoppuhr) aufgetaut und anschließend 15 min lang (Stoppuhr) in Eis gekühlt. Es wurden 100,0 µl Citratplasma mit 100,0 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung als Referenz oder einer in diesem Medium gelösten/suspendierten Probe 60 s lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100,0 µl einer 0,025 mol/l CaCl₂-Lösung, die zuvor auf 37 °C temperiert worden war, zupipettiert und die Zeit bis zur Ausbildung eines Fibrinklumpens gemessen. Die für die Proben ermittelte Zeit wurde auf die jeweils gleichzeitig gemessene Referenz bezogen und in „% der Referenz“ angegeben. Damit sind mit unterschiedlichen Plasmapools erhaltene Ergebnisse vergleichbar [4]. Ebenfalls in [4]

sind ausführliche Untersuchungen zur Brauchbarkeit und Statistik der RC-Methode zu finden. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach Wilcoxon/Mann-Whitney [in 10].

Extraktion

Die Droge wurde in der entsprechenden Konzentration eingewogen und in Wasser 30 Minuten lang unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Der Extrakt wurde noch heiß über Filterpapier filtriert. Der entstandene trübe Extrakt wurde am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne eingengt und mit 0,9 % NaCl-Lösung wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Zur Gewinnung des Retentats wurde ein derart aufgearbeiteter 5 %iger wäßriger Heißextrakt unter Anlegen von Unterdruck über einen Membranfilter aus Celluloseacetat (Porengröße 0,45 µm (Fa. Sartorius, Göttingen)) in ein klares Filtrat und das Retentat fraktioniert.

Lagerung

Die Lagerungsversuche wurden mit luftgetrockneter Krautdroge durchgeführt. Dunkellagerung: Trockenschrank bei 17 °C unter Lichtausschluß. Lichtlagerung: Pflanzenwuchsschrank, Luftfeuchtigkeit 40-60 %, Temperatur 22 °C, 14 h /Tag 60 000 Lux (Hg-Hochdrucklampe). Die Droge wurde dreimal in der Woche gewendet. Die Lagerungsdauer betrug 12 Wochen, es wurden wiederholt Proben gezogen. Von jeder Probe wurden 5 %ige wäßrige Heißextrakte im RC-Test untersucht.

Preßsaft

Frisches Kraut einer Probe aus dem *A. millefolium* Aggregat wurde mit der Pflanzenpresse ausgepreßt. Der Preßsaft wurde unverdünnt und verdünnt im RC-Test untersucht. 20,0 ml des Preßsafts wurden zusätzlich über einen Membranfilter (Celluloseacetat Porengröße 0,45 µm) filtriert. Das Filtrat des Preßsaftes wurde unverdünnt und nach Verdünnung mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf 50 % getestet. Der Filtrierrückstand wurde in 20,0 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung suspendiert und getestet. Die Konzentration des Rückstands entsprach der Konzentration im unverdünnten Preßsaft. Außerdem wurde ein Aliquot dieser Suspension mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf 50 % verdünnt und getestet.

Vegetationszyklus

Jeweils am 15. der Monate Mai bis September wurde Kraut geerntet, luftgetrocknet, geschnitten und kühl gelagert. Herbarbelege sind im genannten Institut archiviert. Die Droge wurde als 5 %iger wäßriger Heißextrakt in der Rekalzifizierungszeit (s. o.) untersucht.

Literatur

- [1] Orth M., van den Berg T., Czygan F. C. (1994): *Z. Phytother.* 15: S. 176-182
- [2] von Brunn W. (1939): Dissertation der Universität Hamburg.
- [3] Miller F. M., Chow L. M. (1954): *J. Am. Chem. Soc.* 76 (6): S. 1353-1354
- [4] Vermathen M. (1995): Dissertation Universität Münster.
- [5] Sellerberg, U. (1999): Dissertation Universität Münster.
- [6] Sellerberg, U., H. Glasi (1997): 45th Annual Congress of the Society for Medical Plant Research, Sept. 7th-12th, Regensburg, Germany.
- [7] Thomas L. (1992): *Labor und Diagnose*. Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg.
- [8] Hegi G. (1906): *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Lehmann, München, Band V₂, S. 761.
- [9] Witt J., Beeser H., Müller-Berghaus G. (1995): *Lab. Med.* 19: S. 143-145
- [10] Sachs L. (1972): *Statistische Auswertungsmethoden*. Springer, Berlin, S. 172 und S. 232-235

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Prof. J. Saukel, Universität Wien, für wertvolle Hinweise zu den kultivierten Proben des *Achillea millefolium* Aggregats.

Eingelangt am 20. Juni 1999
Angenommen am 20. März 2000