

**Phytochemische Charakterisierung öligter Extrakte
aus pflanzlichen Drogen**

Effizienz und Qualität der Extraktion

DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades des Departments Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Michael Heldmaier
aus Böblingen

Hamburg 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Stahl-Biskup
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart

Tag der Disputation: 24.08.2007

Für Sandra

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2003 bis März 2007 am Institut für Pharmazie, Abteilung pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie, der Universität Hamburg unter der Leitung von

Frau Prof. Dr. Elisabeth Stahl-Biskup

Meiner Doktormutter danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung meiner Arbeit, die wertvollen Anregungen und die stets vertrauensvolle Zusammenarbeit über die letzten Jahre.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart, Institut für Lebensmittelchemie und Biochemie, danke ich für die Übernahme des Koreferates und die vielen unterhaltsamen Bus- und Zugfahrten.

Meiner Mitdotorandin Shirin Keyhanian möchte ich mich für dreieinhalb Jahre freundschaftliche Zusammenarbeit, zahlreiche fruchtbare Diskussionen sowie ihre moralische Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Meinen beiden Pharmaziepraktikantinnen Jenny Beyer-Koschitzke und Steffi Hamann habe ich sehr zu danken für die technische und arbeitsintensive Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Danke an alle Mitarbeiter des Instituts, die ich hier nicht alle namentlich erwähnen kann, für die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre sowie die Möglichkeit des fachlichen Austausches.

Ich danke der Firma Wala Heilmittel (Bad Boll), insbesondere Herrn Dr. Ulrich Meyer; Herrn Dr. Ulrich Riegert und Herrn Dr. Florian Stinzing für die konstruktive Beratung, für die finanzielle Unterstützung meiner Pharmaziepraktikantinnen und die freundliche Bereitstellung verschiedener Arzneidrogen.

Folgenden Firmen möchte ich für die freundliche Unterstützung dieser Arbeit danken: Der Firma Henry Lamotte (Bremen) danke ich für einen Teil des raffinierten Olivenöls, der Firma BLM-Pantos (Buchholz) für einen weiteren Teil des raffinierten Olivenöls und die vielen Küchenrollen, der Firma Werner & Co. Gewürze (Gelsenkirchen) für die Cayennepfefferfrüchte, der Firma Caesar & Lorenz (Hilden) für die Kamillenblüten, der Firma Kneipp-Werke (Würzburg) für die Arnikablüten.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
BAnz.	Bundesanzeiger
Bsp.	Beispiel
CE	Kapillarelektrophorese
D	Tag(e)
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (Verdampfungs-Lichtstreuungsdetektion)
ESCAP	European Scientific Cooperative On Phytotherapy
ESI	Electrospray Ionisation
FID	Flammenionisations-Detektor
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion
h	Stunde(n)
H 10%	Ölauszug nach Vorschrift HAB Nr. 12 d)
HAB	Homöopathisches Arzneibuch
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistung-Flüssigkeits-Chromatographie)
HSGC	Headspace-GC
ISTD	Interner Standard
Kap.	Kapitel
Konz.	Konzentration
LC	Flüssigkeits Chromatographie (liquid chromatography)
MEKC	micellar electrokinetic chromatography
MS	Massenspektrometrie
MSD	massenspektrometrischer Detektor
n	Anzahl der Bestimmungen
Nr.	Nummer
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
R	Korrelationskoeffizient
rel.	Relativ
RI	Refraktionsindex
RIC	Reconstructed Ion Chromatogram (Summe aller Ionenintensitäten in jedem Scan)
RP	Umkehrphase (reversed phase)
SFE	Extraktion mit überkritischen Flüssigkeiten (supercritical fluid extraction)
SPME	Solid-Phase-Micro-Extraction
STD	Standard
Tab.	Tabelle
TBME	tert-Butylmethylether
TIC	Total Ion Current
TMS	Trimethylsilyl-Rest
UV	Ultraviolett
UV/VIS	Ultraviolett / Visuell
VT	Volumenteile
W 10%	Ölauszug nach Vorschrift HAB Nr. 12 f)
z.B.	zum Beispiel

INHALTSVERZEICHNIS

A. ZIEL DER ARBEIT	1
B. EINLEITUNG	3
1. Extrakte pflanzlicher Drogen	3
2. Untersuchte Stoffklassen.....	7
2.1 Sesquiterpenlactone.....	7
2.2 Ätherisches Öl	9
2.3 Phenolcarbonsäure-Derivate.....	11
2.4 Cumarine	12
2.5 Flavonoide	13
2.6 Anthocyane.....	16
2.7 Carotinoide	18
2.8 Sterole	20
2.9 Triterpenalkohole	23
2.10 Capsaicinoide	27
2.11 Alkaloide	30
3. Beschreibung der Arzneidrogen	32
3.1 Arnikablüten – Arnicae flos.....	32
3.2 Kamillenblüten – Matricariae flos.....	33
3.3 Stockrosenblüten – Alceae flos	35
3.4 Ringelblumenblüten – Calendula flos	36
3.5 Cayennepfefferfrüchte – Capsici fructus	38
3.6 Berberitzenwurzelrinde – Berberidis radices cortex	40
4. Olivenöl.....	42
C. ERGEBNISSE.....	47
1. Sesquiterpenlactone aus Arnikablüten	47
1.1 Methodenentwicklung.....	47
1.2 Quantitative Bestimmung der Sesquiterpenlactone in der Droge	50
1.3 Übergangsrate der Sesquiterpenlactone in die Ölauszüge.....	51
2. Ätherisches Öl aus Kamillenblüten.....	53
2.1 Methodenentwicklung.....	53
2.2 Bestimmung des Gehalt an ätherischem Öl in der Droge.....	53
2.3 Übergangsrate des ätherischen Öls in die Ölauszüge.....	54
2.4 Zusammensetzung des ätherischen Öls	55
2.5 Verseifung des ätherischen Öls von Kamillenblüten	57
2.6 Zusammensetzung des ätherischen Öls in den Pressrückständen	59
2.7 Zusammensetzung des ätherischen Öls nach Verseifen der Ölauszüge	61
3. Phenolische Komponenten aus Kamillenblüten	63
3.1 Methodenentwicklung.....	63
3.2 Übergangsraten der phenolischen Komponenten in die Ölauszüge.....	67
4. Anthocyane aus Stockrosenblüten	69
4.1 Methodenentwicklung.....	69
4.2 Übergangsrate der Anthocyane aus der Droge in die Ölauszüge.....	70

5.	Carotinoide aus Ringelblumenblüten.....	71
5.1	Methodenentwicklung.....	71
5.2	Übergangsrate der Carotinoide in die Ölauszüge.....	71
6.	Sterole und Triterpenalkohole aus Ringelblumenblüten.....	73
6.1	Methodenentwicklung.....	73
6.2	Quantitative Bestimmung der Sterole und Triterpenalkohole im Olivenöl.....	76
6.3	Quantitative Bestimmung der Sterole und Triterpenalkohole in der Droge.....	77
6.4	Übergangsraten der Sterole und Triterpene in die Ölauszüge.....	78
7.	Capsaicinoide aus Cayennepfefferfrüchten.....	81
7.1	Methodenentwicklung.....	81
7.2	Quantitative Bestimmung der Capsaicinoide in der Droge.....	84
7.3	Übergangsraten der Capsaicinoide in die Ölauszüge.....	84
8.	Alkaloide aus Berberitzenwurzelrinde.....	86
8.1	Methodenentwicklung.....	86
8.2	Quantitative Bestimmung der Alkaloide in der Droge.....	88
8.3	Übergangsrate der Alkaloide in die Ölauszüge.....	89
9.	Variation der Herstellungsbedingungen der Ölauszüge.....	90
9.1	Beschaffenheit der Ölauszüge.....	91
9.2	Ätherisches Öl.....	91
9.3	Phenolischen Komponenten.....	97
9.4	Carotinoide.....	101
10.	Zusammenfassung der experimentellen Daten.....	102
10.1	Sesquiterpenlactone aus Arnikablüten.....	102
10.2	Ätherisches Öl aus Kamillenblüten.....	102
10.3	Phenolische Komponenten aus Kamillenblüten.....	103
10.4	Anthocyane aus Stockrosenblüten.....	103
10.5	Carotinoide aus Ringelblumenblüten.....	103
10.6	Sterole aus Ringelblumenblüten.....	103
10.7	Triterpenalkohole aus Ringelblumenblüten.....	104
10.8	Capsaicinoide aus Cayennepfefferfrüchten.....	104
10.9	Alkaloide aus Berberitzenwurzelrinde.....	104
D.	DISKUSSION.....	105
1.	Einflussfaktoren auf die Effizienz des Übergangs von Pflanzeninhaltsstoffen in die Ölauszüge.....	106
2.	Inhaltsstoffmuster der Ölauszüge.....	109
3.	Beurteilung der Extraktionsmethoden des HAB.....	113
E.	MATERIAL UND METHODEN.....	115
1.	Pflanzenmaterial.....	115
1.1	Drogen- und Pflanzenbezeichnungen.....	115
1.2	Vorbereitung der Drogen.....	116
2.	Herstellung der Ölauszüge.....	116
3.	Verwendetes Olivenöl.....	117
4.	Instrumentelle Analytik.....	118
4.1	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC).....	118
4.2	Gaschromatographie (GC).....	118
4.3	Spektralphotometrie.....	119

5.	Analytik der Sesquiterpenlactone	120
5.1	Isolierung der Sesquiterpenlactone aus der Droge und den Ölauszügen.....	120
5.2	LC-MS der Sesquiterpenlactone	120
5.3	HPLC-DAD der Sesquiterpenlactone	120
5.4	Wiederfindungsrate der Methode	121
6.	Analytik des ätherischen Öls	121
6.1	Quantitative Bestimmung des ätherischen Öls in der Droge und in den Pressrückständen 121	
6.2	Isolierung des ätherischen Öls aus den Ölauszügen	122
6.3	GC-MS des ätherischen Öls	122
6.4	GC-FID des ätherischen Öls	122
7.	Analytik der phenolischen Komponenten	122
7.1	Isolierung der phenolischen Komponenten aus der Droge und aus den Ölauszügen.....	122
7.2	LC-MS der phenolischen Komponenten	123
7.3	HPLC-DAD der phenolischen Komponenten	123
8.	Analytik der Anthocyane	123
9.	Analytik der Carotinoide	124
10.	Untersuchung der Sterole und Triterpenalkohole	125
10.1	Extraktion der Sterole und Triterpenalkohole aus Droge und Ölauszügen	125
10.2	GC-FID der Sterole und Triterpenalkohole.....	125
10.3	Wiederfindungsrate.....	125
11.	Untersuchung der Scharfstoffe	126
11.1	Isolierung der Scharfstoffe aus der Droge und den Ölauszügen	126
11.2	HPLC-DAD der Scharfstoffe	126
11.3	Wiederfindungsrate	127
12.	Untersuchung der Alkaloide	127
12.1	Isolierung der Alkaloide aus der Droge und aus den Ölauszügen	127
12.2	HPLC-DAD der Alkaloide	128
12.3	Wiederfindungsrate	128
F.	ZUSAMMENFASSUNG	129
G.	SUMMARY	133
H.	ANHANG.....	137
I.	LITERATURVERZEICHNIS	167

A. ZIEL DER ARBEIT

In der Phytotherapie werden ölige Extrakte aus pflanzlichen Drogen als Wirkstoffe in Salben, Cremes und Lotios eingearbeitet. In der Kosmetik kommen pflanzliche Ölauszüge in reiner Form als Massage- oder Körperöle zum Einsatz oder als Bestandteil anderer kosmetischer Formulierungen. In der anthroposophischen Komplementärmedizin finden sie im Rahmen einer ganzheitlichen Therapie in Form von Einreibungen und Öldispersionsbädern Verwendung. Aufgrund dieser therapeutischen Einsatzmöglichkeiten sind im Homöopathischen Arzneibuch (HAB 2006, Nr. 12 d bis g) vier unterschiedliche Herstellungsvorschriften solcher Ölauszüge beschrieben. Diese unterscheiden sich bezüglich ihres Droge-Extrakt-Verhältnisses (DEV), der Extraktionstemperatur, der Extraktionsdauer, der Vorbehandlung der pflanzlichen Droge und der Möglichkeit, Olivenöl, Erdnussöl oder Sesamöl zur Extraktion zu nutzen.

Trotz der breiten Anwendung ist das Wissen über die stoffliche Zusammensetzung dieser Ölauszüge und über die Qualität des Extraktionsverfahrens bislang gering. Ziel dieser Arbeit ist es, analytische Verfahren zu entwickeln, mit deren Hilfe die stoffliche Zusammensetzung der Ölauszüge und der Ausgangsdrogen charakterisiert und verglichen werden können. Mit diesem instrumentellen Rüstzeug soll die Effizienz des Übergangs und die quantitativen Unterschiede zwischen den Stoffmustern der Ausgangsdroge und den Ölauszügen folgender Pflanzeninhaltsstoffe beispielhaft untersucht werden:

Arnikablüten:	Sesquiterpenlactone
Kamillenblüten:	ätherisches Öl und phenolische Komponenten (Phenolcarbonsäure-Derivate, Flavonoide, Cumarine)
Stockrosenblüten:	Anthocyane
Ringelblumenblüten:	Carotinoide, Sterole und Triterpenalkohole
Cayennepfefferfrüchte:	Capsaicinoide
Berberitzenwurzelrinde:	Alkaloide

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen sollen die Voraussetzungen und die quantitativen Gesetzmäßigkeiten des Übergangs von Pflanzeninhaltsstoffen aus der Droge in das Öl, hier Olivenöl, herausgearbeitet werden.

Darüber hinaus soll der Einfluss der Extraktionsbedingungen und –methoden auf die Qualität der Extraktion mit Olivenöl untersucht werden, wobei als Qualitätsmaßstab in erster Linie die Effizienz der Extraktion (prozentuale Übergangsrate) sowie ein der Ausgangsdroge vergleichbares Inhaltsstoffmuster dienen sollen. Dazu werden zur Herstellung der Ölauszüge folgende Parameter variiert:

- Extraktionstemperatur**
- Extraktionsdauer**
- Rühren während der Extraktion**
- Vorbehandlung der Droge**

Die Untersuchungsergebnisse sollen die Gesetzmäßigkeiten, die den Übergang der Pflanzeninhaltsstoffe aus der Droge in das Olivenöl bestimmen, untermauern. Darüber hinaus soll die Effizienz und Qualität der Extraktionen nach den Vorschriften des HAB 2006 beleuchtet werden.

B. EINLEITUNG

1. EXTRAKTE PFLANZLICHER DROGEN

In der Phytotherapie sind heutzutage weniger die Arzneipflanzen bzw. Arzneipflanzenteile (Drogen) selbst in Gebrauch, z.B. in Form von Teeaufgüssen, sondern Anwendungsformen, bei denen die wirksamen Inhaltsstoffe angereichert sind. So findet man in Fertigarzneimitteln verschiedene Formen von Extrakten, wie Trockenextrakte, Flüssigextrakte (Fluidextrakte), Tinkturen und Dickextrakte (Spissumextrakte). Bei deren Herstellung geht man in der Regel von der Droge aus und extrahiert diese je nach gewünschten Inhaltsstoffen mit Ethanol bzw. Methanol oder mit Ethanol- bzw. Methanol-Wasser-Gemischen oder auch Aceton. Bei einigen Arzneipflanzen sind auch Frischpflanzenpresssäfte in Gebrauch, wie z.B. bei der Artischocke (*Cynara scolymus*) oder beim Sonnenhut (*Echinacea*-Arten). Selten kommen lipophile Lösungsmittel zum Einsatz, z.B. Dichlormethan zur Extraktion von Herbstzeitlosen-samen (*Colchicum autumnale*) oder Propylenglycol zur Extraktion von Thymian (*Thymus vulgaris*).

Bei der Extraktion von Drogen wird eine Vielzahl von Inhaltsstoffen aus dem pflanzlichen Material extrahiert. Insofern hat man es bei Extrakten mit sehr komplexen Stoffgemischen zu tun. Dabei unterteilt man die Extraktbestandteile formal in Hauptwirkstoffe und Begleitstoffe, wobei die Hauptwirkstoffe (= Effektoren) für die therapeutische Eigenschaft verantwortlich sind (FRANZ et al., 2001). Bei diesen unterscheidet man weiter zwischen wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen, die allein für die Wirksamkeit verantwortlich sind, den wirksamkeitsmitbestimmenden Inhaltsstoffen, die mit anderen Inhaltsstoffen zusammen an der Wirksamkeit beteiligt sind, und den Leitsubstanzen. Letztere dienen lediglich zur phytochemischen Identifizierung bzw. Charakterisierung eines Phytopharmakons. Den Begleitstoffen (= Coeffektoren) kommt eine vielfältige Bedeutung insofern zu, als sie die chemischen und physikalischen Eigenschaften eines Extrakts, das Lösungsverhalten der Hauptwirkstoffe und deren Resorption beeinflussen können. Gerüststoffe (Ballaststoffe), die für die Stabilität der pflanzlichen Zelle verantwortlich sind, sind in Extrakten unerwünscht.

Bei der Herstellung von Extrakten unterscheidet man im Prinzip zwischen Mazeration und Perkolation. Bei der Mazeration werden die Drogeninhaltsstoffe nicht erschöpfend extrahiert, sondern lediglich ein bestimmtes Verteilungsgleichgewicht zwischen Extraktmenge im Auszugsmittel (Menstruum) und Extraktmenge in der pflanzlichen Droge erreicht. Dies erfordert viel Zeit, wobei der Ansatz je nach Ausgangsmaterial unterschiedlich lange stehen gelassen wird (meist mehrere Tage). Erfolgt diese Extraktion unter Erwärmen, so nennt man das Verfahren Digestion. Der Extraktionsansatz muss in allen Fällen oft geschüttelt werden, um die gelösten Stoffe im Auszugsmittel gleichmäßig zu verteilen. Anschließend wird dekantiert, abgepresst und der Ölauszug, wenn erforderlich, koliert. Heutzutage sind vor allem im industriellen Maßstab Mazerationsverfahren wie Bewegungsmazerationen, Wirbel- und Ultraschallextraktionen verbreitet.

Die Extraktion durch Perkolation ist eine erschöpfende Extraktion. Die pflanzliche Droge wird dabei zunächst nur mit einem Teil des Menstruums befeuchtet und in einem Perkulator über mehrere Stunden zum Vorquellen stehen gelassen. Danach wird bei langsamer Abtropfgeschwindigkeit nach und nach frisches Auszugsmittel über das Drogenmaterial geleitet, sodass der Extraktionsvorgang nicht durch eine Gleichgewichtseinstellung zum Erliegen kommt. Angewandt werden heutzutage Verfahren wie Gegenstromperkolation, Evakolation (Perkolation im Vakuum), Diakolation (Perkolation unter Druck) sowie das Soxhlet-Verfahren.

Die Deklaration des Wirkstoffes auf den Fertigarzneimitteln erfolgt in unterschiedlicher Weise, je nachdem, ob der Wirkstoff bzw. die Wirkstoffgruppe der Droge bekannt ist oder nicht. Im ersten Fall wird der Extrakt auf den Gehalt an Effektoren eingestellt bzw. standardisiert, z.B. bei Capsicumzubereitungen. Sind diese dagegen nicht bekannt, so ist der gesamte Extrakt der Wirkstoff. Der Bezug zur Droge wird dadurch hergestellt, dass auf dem Fertigarzneimittel außer der Drogenbezeichnung auch das als Auszugsmittel verwendete Lösungsmittel und das Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV) angegeben werden. Dies bezeichnet das Verhältnis der Masse der eingesetzten Droge zur Masse der nach der Extraktion erhaltenen Drogenzubereitung, wobei letztere bei Trockenextrakten und Spissumextrakten grundsätzlich zu 1 gesetzt wird. Dies bedeutet, dass hohe DEV (z.B. 20:1) einer starken Aufkonzentrierung der Drogeninhaltsstoffe und niedrige DEV (z.B. 2:1) schwacher Aufkonzentrierung entsprechen. Bei Fluidextrakten und Tinkturen, deren Herstellung eher ein Verdünnungsvorgang der Inhaltsstoffe ist, wird die Masse der Droge im DEV zu 1 gesetzt (z.B. 1:10).

Auch in der kosmetischen Industrie wird eine Vielzahl von Pflanzenextrakten eingesetzt (BENDER, 2004). In kosmetischen Artikeln steht nicht der therapeutische, sondern der pflegende Aspekt der extrahierten Pflanzeninhaltsstoffe im Vordergrund. Die dabei verwendeten Pflanzen unterliegen meist einem modischen Zeitgeist, so sind momentan besonders Extrakte aus Aloe vera oder Traubenkernen gefragt (MARTINEZ und BUCHWALDWERNER, 2003). Daneben gibt es Extrakte von Pflanzen, die schon seit sehr langer Zeit in Kosmetika aller Art Verwendung finden (HANGYA und KELEN, 2001). Hierzu zählen vor allem Kamillen- und Ringelblumenblüten (ISAAC, 1992; SCHILCHER, 1987), die wegen ihrer

entzündungshemmenden, wundheilenden oder allgemein hautpflegenden Wirkung eingesetzt werden (Kap. B.3.2 und B.3.4).

Im Rahmen dieser Arbeit soll näher auf die Extraktion pflanzlicher Drogen mit fetten Ölen als Auszugsmittel eingegangen werden. Für diese Ölauszüge gibt es im Europäischen Arzneibuch zurzeit noch keine Definition und Herstellungsvorschrift. In Vorbereitung ist eine Definition einer als „Oleoresin“ bezeichneten Zubereitung (Pharmeuropa (2006) 18/3 S.432).

Herstellungsvorschriften für Ölauszüge finden sich im Homöopathischen Arzneibuch (HAB 2006) unter der Rubrik „Externa“. In Tab. B-1 sind die Verfahren zur Herstellung der Ölauszüge dargestellt, die sich in der Extraktionsdauer (168 h bzw. 4 h), der Extraktionstemperatur (37°C bzw. 60-70°C), dem DEV (1:10 bzw. 1:20) sowie der Vorbehandlung der Droge mit Ethanol unterscheiden. Die Deklarationen dieser Ölauszüge sind an die Extraktionsart angelehnt: „W“ steht für „warm“ (Mazeration) bzw. „H“ für „heiß“ (Digestion). Werden natives Olivenöl, Erdnussöl oder Sesamöl verwendet, ist keine besondere Kennzeichnung des verwendeten Öls erforderlich. Diese Arzneiöle sind nur zur äußerlichen Anwendung bestimmt. Ölauszüge aus Arnikablüten (*Arnica montana* e flore H 10%) haben als eigene Monographie Eingang ins HAB gefunden. Diese werden topisch angewandt, ebenso ölige Auszüge aus Johanniskraut oder Ringelblumenblüten (Kap. B.3.4 und Kap. B.3.1).

Tab. B-1 Pflanzliche flüssige Einreibungen (Externa) des HAB 2006

Vorschrift HAB	Kennzeichnung HAB	Extraktionsdauer	Extraktionstemperatur	DEV	Vorbehandlung Droge
12d	H 10%	4 h	60-70°C	1:10	Ethanol (94%)
12e	H 5%	4 h	60-70°C	1:20	Ethanol (94%)
12f	W 10%	7 d (= 168 h)	37°C	1:10	-
12g	W 5%	7 d (= 168 h)	37°C	1:20	-

In der Phytotherapie werden pflanzliche Ölauszüge als Wirkstoffe in Salben, Cremes und Lotios eingearbeitet (BEZBRADICA et al., 2005; GORA et al., 1980). In der anthroposophischen Komplementärmedizin finden sie im Rahmen einer ganzheitlichen Therapie in Form von Einreibungen und Öldispersionsbädern Verwendung (JUNGE et al., 1998; SOLDNER und SOLDNER, 1998). Daneben kommen pflanzliche Ölauszüge in der Kosmetik in reiner Form als Massage- oder Körperöle zum Einsatz oder als Bestandteil anderer kosmetischer Formulierungen (BENDER, 2004; HENRIQUE DOS SANTOS et al., 2005; ZEH, 2004).

Trotz der breiten Anwendung ist das Wissen über die stoffliche Zusammensetzung der Ölauszüge gering. Erste analytische Untersuchungen zu pflanzlichen Ölauszügen stammen von RUECKER (1970), der die stoffliche Zusammensetzung eines nicht näher definierten Auszugs aus Arnikablüten mit Sojaöl untersuchte. Nach säulenchromatographischer Auftrennung des Arnika-Ölauszugs wurden verschiedene Carotinoide identifiziert, die Wasser-

dampfdestillation lieferte mit Thymol und Thymolmethylether Bestandteile des ätherischen Öls und im unverseifbaren Anteil wurden neben den Sterolen des Sojaöls auch Triterpenalkohole nachgewiesen. Darüber hinaus konnte der Autor in einem wässrigen Extrakt aus dem Arnikaölauszug Kaffeesäure bestimmen.

Quantitative Untersuchungen von lipophilen Extrakten pflanzlicher Drogen stammen von GORA et al. (1980). Dabei wurden jedoch keine Ölauszüge analysiert, sondern Extrakte aus Arnika- und Ringelblumenblüten mit Isopropylmyristat und Propylenglycol. Unter welchen Bedingungen diese Extrakte hergestellt wurden, wird nicht detailliert dargestellt. Die Autoren konnten in diesen Extrakten Zucker, Carotinoide, Flavonoide, Phenolcarbonsäuren, Sterole und ätherisches Öl in unterschiedlichen Konzentrationen ermitteln. Da jedoch keine analysierten Werte der Ausgangsdrogen ermittelt wurden, kann im Nachhinein keine Aussage über die prozentualen Übergangsraten der untersuchten Stoffgruppen gemacht werden.

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Effizienz von Extraktionsverfahren (Perkolation, Mazeration und Turboextraktion) im Zusammenhang mit den verwendeten lipophilen Lösungsmitteln (Propylenglycol, Glycerin, Diethylenglycol und PEG 400). Dazu wurden aus Hamamelisblättern bzw. Ringelblumenblüten Flüssigextrakte hergestellt und deren Gesamtmenge der phenolischen Komponenten über den Zeitraum der Extraktion hinweg spektralphotometrisch untersucht (DIEMUNSCH und MATHIS, 1980). Die Vor- und Nachteile der verwendeten Extraktionsverfahren bzw. der lipophilen Auszugsmittel werden anhand dieser Gesamtmenge an eher polaren Substanzen diskutiert.

Vor kurzem wurde von BEZBRADICA et al. (2005) die Stabilität von Auszügen aus Ringelblumenblüten mit Myritol 312, Paraffin, Erdnuss-, Oliven-, Sonnenblumen-, Traubenkern- und Sojaöl in Bezug auf den Gesamtgehalt an Carotinoiden untersucht. Dazu wurden die Ölauszüge durch Digestion (70°C, 10h, DEV 6:1) hergestellt und dann lediglich der Abbau der Carotinoide über einen Zeitraum von 100 bis 150 Tagen spektralphotometrisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass der Abbau der Carotinoide bei der Lagerung abhängig ist vom Öl, das zur Extraktion der Droge verwendet wurde. Die Autoren wiesen damit einen direkten Einfluss der Fettsäurezusammensetzung des Pflanzenöls und deren Lipidperoxidation auf die Abbauraten der Carotinoide nach.

2. UNTERSUCHTE STOFFKLASSEN

2.1 Sesquiterpenlactone

2.1.1 Chemie und Eigenschaften

Sesquiterpenlactone sind Sesquiterpene mit bitterem Geschmack, die als gemeinsames Strukturmerkmal einen γ -Lacton-Ring aufweisen. Sie sind in der Familie der Korbblütler (Asteraceae) weit verbreitet, kommen aber auch sporadisch in anderen Pflanzenfamilien vor. In Blütendrogen sind die Sesquiterpenlactone häufig in Drüsenhaaren auf der Epidermis lokalisiert oder überziehen die Oberfläche damit als Exsudate, so dass sie bei Berührung der Pflanze leicht auf die Haut oder Schleimhaut gelangen (TEUSCHER et al., 2004). Sesquiterpenlactone leiten sich vom Germacran (Germacranolide), Pseudoguajan (Pseudoguajanolide) oder Eudesman (Eudesmanolide) ab. Am häufigsten ist der Guajanolid-Typ verbreitet (z.B. Matricin aus Kamillenblüten; Kap. B.2.2.2). Die Guajanolide lagern sich oft zu den blau gefärbten Azulenen um (z.B. Chamazulen). Trägt die Lacton-Gruppierung eine exocyclische Doppelbindung (α -Methylen- γ -butyrolactone), so sind die Verbindungen cytotoxisch und besitzen allergene Eigenschaften (z.B. Helenalin aus Arnikablüten) (WILLUHN, 1986). Damit besitzt $11\alpha,13$ -Dihydro-helenalinmethacrylat (Abb. B-1), ein wichtiges Sesquiterpenlacton der spanischen Arnikablüten, keine allergene Wirkung. Die kontaktallergene Wirkung geht dann eher von der Enon-Gruppe aus, die ebenfalls mit Hautproteinen kovalente Bindungen eingehen kann (MERFORT, 2001).

2.1.2 Sesquiterpenlactone in Arnikablüten

Die Sesquiterpenlactone der Arnikablüte (*Arnica montana* L., *Arnicae flos*, Ph. Eur.) gehören zum Pseudoguajanolid-Typ. Dabei handelt es sich vornehmlich um Helenalin und $11\alpha,13$ -Dihydrohelenalin, die mit kurzkettigen aliphatischen Säuren (Essig-, Isobutter-, 2-Methylbutter-, Isovalerian-, Methacryl-, Tiglin-, Angelica- und Seneciosäure) verestert sind (Abb. B-1). Die Blüten von *Arnica chamissonis* enthalten darüber hinaus noch Arnifolin und Chamissonolid sowie deren Ester (WILLUHN et al., 1983; WILLUHN, 1991; WILLUHN, 1998). Erst vor kurzem haben KOS et al. (2005) aus Arnikablüten verschiedene 2β -ethoxy-Derivate des $2,3$ -Dihydrohelenalins isoliert.

Der Sesquiterpenlacton-Gehalt in Arnikablüten schwankt zwischen 0,3 und 1,0 g/100 g (WILLUHN, 1991; WILLUHN et al., 1994). Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 5.0 „*Arnicae flos*“, Nr. 1391) fordert für Arnikablüten einen Gesamtsesquiterpenlacton-Gehalt von mindestens 0,4 g/100 g berechnet als Dihydrohelenalintiglat. Je nach Herkunft der Arnikablüten kann man zwischen zwei Chemotypen unterscheiden, die sich in ihrer Sesquiterpenlacton-Zusammensetzung deutlich voneinander unterscheiden: die Blüten Mitteleuropäischer Vorkommen, z.B. aus den Alpen, den Vogesen oder der Eifel enthalten vorwiegend Helenalinester; in Blüten spanischer Herkunft dominieren Dihydrohelenalinester (WILLUHN et al., 1994).

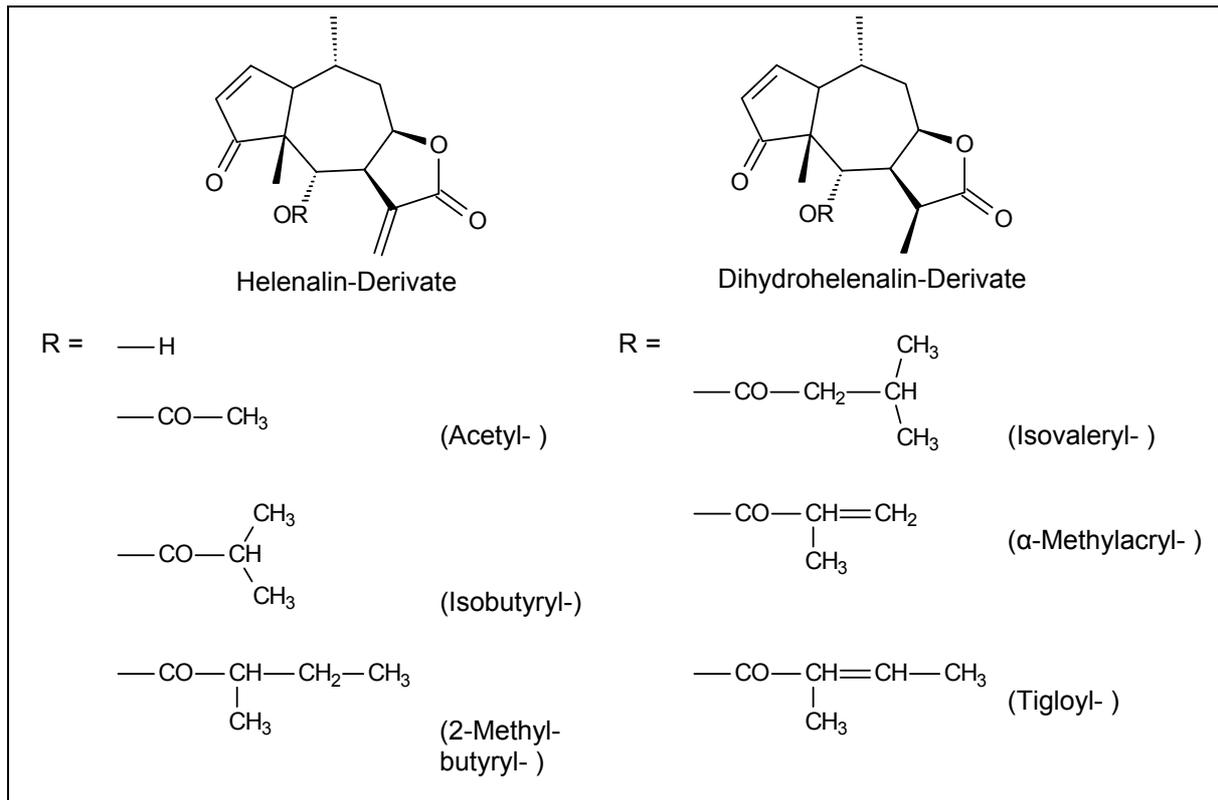


Abb. B-1 Sesquiterpenlactone der Arnikablüten

Da Sesquiterpenlactone schwerflüchtig und meist auch thermolabil sind, stellt heute die HPLC an RP-Phasen die analytische Methode der Wahl zur Identifizierung und Quantifizierung dar (LEVEN und WILLUHN, 1987; WEIDENHAMER et al., 1990; WILLUHN und LEVEN, 1991). Die Detektion erfolgt photometrisch entweder bei einer Wellenlänge von 225 nm (DOUGLAS et al., 2004; WILLUHN und LEVEN, 1991) oder nach Derivatisierung mit 9-Thiomethylantracen bei einer Wellenlänge von 369 nm (DOLMAN et al., 1992). Diese Derivatisierung erhöht die Empfindlichkeit, allerdings nur der Sesquiterpenlactone mit einer α-Methylenbutyrolacton-Gruppierung (DOLMAN et al., 1992) und ist somit nur für die Helenaline, nicht aber für die 11α,13-Dihydrohelenalin sinnvoll. Eine hohe Empfindlichkeit ist auch durch den Einsatz von RI-Detektoren oder als neueste Entwicklung durch ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) (BICCHI und RUBIOLO, 1996) sowie durch MS-Detektoren mit unterschiedlichen Ionisierungstechniken erreichbar (MERFORT, 2002). Eine weitere analytische Methode, die nachweislich vergleichbare Ergebnisse liefert wie die HPLC, ist die MEKC (micellar electrokinetic chromatography) (MERFORT et al., 1997; PIETTA et al., 1994). Auch die GC spielt mit und ohne Derivatisierung der Sesquiterpenlactone zu Trimethylsilylethern eine gewisse Rolle (KOS et al., 2005; LEVEN und WILLUHN, 1987; MERFORT, 2002). Die Detektion erfolgt dabei entweder durch einen FID (LEVEN und WILLUHN, 1987) oder mit Hilfe eines MSD (SCHMIDT und WILLUHN, 2000).

2.2 Ätherisches Öl

2.2.1 Chemie und Eigenschaften

Ätherische Öle sind komplex zusammengesetzte Stoffgemische flüchtiger, geruchsintensiver und lipophiler Verbindungen. Sie liegen in Pflanzen in speziellen anatomischen Strukturen vor, die entweder im Gewebe (Ölzellen, Ölkanäle, Ölbehälter) oder auf der Epidermis liegen, wobei das ätherische Öl bei letztem unter die Kutikula sezerniert wird (Drüsenhaare oder Drüsenschuppen). Durch die umgebende Cutinmembran ist das ätherische Öl dann weitgehend vor Verdunstung und Oxidation geschützt, wird jedoch bei leichter Berührung und damit verbundener Zerstörung der Membran freigesetzt. Die Gewinnung der ätherischen Öle aus Pflanzen erfolgt meist durch Wasserdampfdestillation. Ätherische Öle bestehen aus Mono- und Sesquiterpenen mit acyclischen, monocyclischen bzw. bicyclischen Grundkörpern und/oder aus Phenylpropanderivaten. Seltener in ätherischen Ölen enthalten sind nicht-terpenoide aliphatische Verbindungen, C6-C1-Körper und Phthalide. Sehr viele Terpene sind chiral, wobei meist ein Enantiomer überwiegt, das dann für den Drehwert eines ätherischen Öls verantwortlich ist.

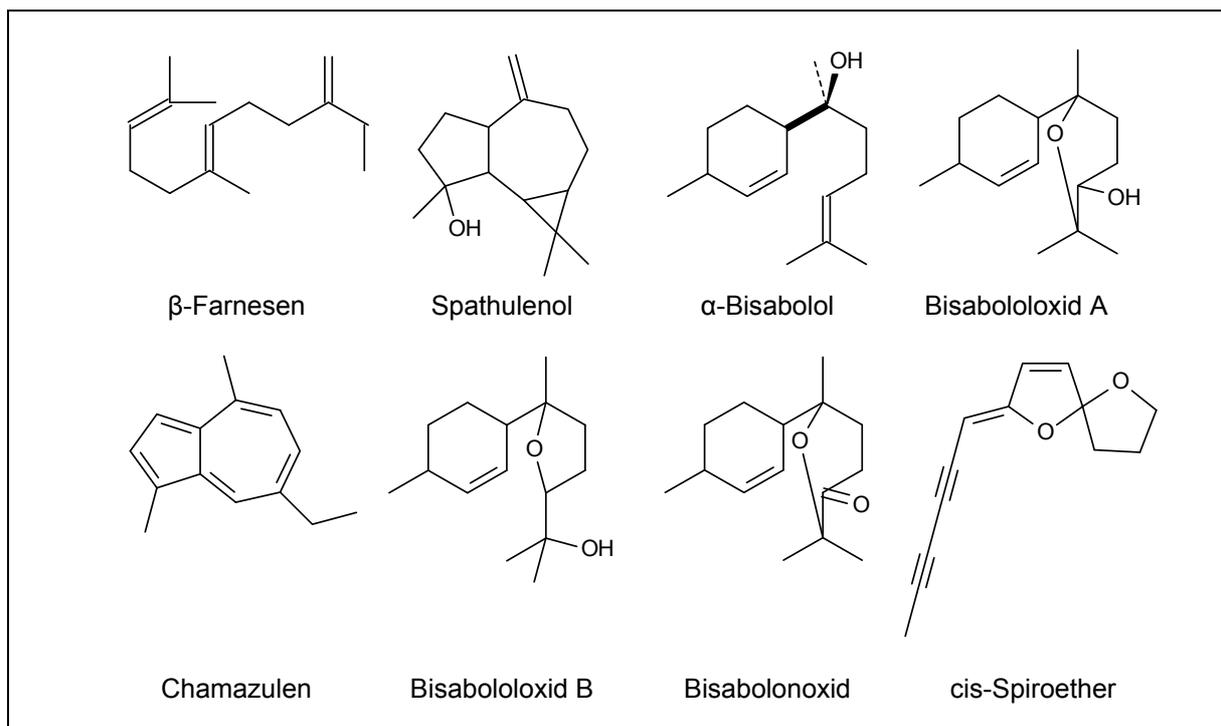


Abb. B-2 Komponenten des ätherischen Öls von Kamillenblüten

2.2.2 Ätherisches Öl in Kamillenblüten

Kamillenblüten enthalten zwischen 3,0 und 15,0 mL/kg ätherisches Öl; das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 5.1 „*Matricariae Flos*“, Nr. 0404) fordert einen Ölgehalt von mindestens 4 mL/kg. Die Bestimmung des ätherischen Ölgehalts erfolgt gemäß der Vorschrift des Europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur. 5.0 „Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls in Drogen“, Nr. 2.8.12) in einer Rundlaufwasserdampfdestillations-Apparatur, basierend auf den von SCHILCHER (1972) optimierten Destillationsbedingungen.

Das ätherische Öl der Kamille besteht überwiegend aus Sesquiterpenen, deren Hauptvertreter in Abb. B-2 dargestellt sind. Sehr charakteristisch sind die En-In-Dicycloether (Abb. B-2). Man unterscheidet verschiedene Chemodeme, die in unterschiedlichen Gegenden wachsen (Tab. B-2). Erwähnenswert ist noch die Tatsache, dass das blaue Chamazulen im ätherischen Öl während der Wasserdampfdestillation aus Matricin, einem Sesquiterpenlacton, entsteht.

Neueste chromatographische Entwicklungen zielen heute nicht mehr auf eine weitere Optimierung der Trennleistung, als vielmehr auf kürzere Analysenzeiten hin (BICCHI et al., 2001; CARTONI et al., 1990; MAGNI et al., 2004). Die GC bietet die Möglichkeit der Kopplung mit einem MSD (CARLE et al., 1987; MAGIATIS et al., 2001; PINO et al., 2002). Auch die HPLC, gekoppelt an einen DAD (REPCAk et al., 1999a; SCHMIDT et al., 1991) oder einen MSD (PERBELLINI et al., 2004) kann zur Analyse ätherischer Öle eingesetzt werden. Besonders zur Trennung der Isomeren cis- und trans-Spiroether (SCHULZ, 1992) sowie zur enantioselektiven Trennung und semipräparativen Isolierung der verschiedenen Bisabolole ist die HPLC sehr gut geeignet (SCHILCHER et al., 2005b).

Aber nicht nur die Trennung hat sich in den letzten Jahren weiterentwickelt, auch die Art der Probenvorbereitung bzw. der Probeninjektion. Headspace-GC (HSGC) als elegante und schnelle Variante hat sich ebenso etabliert (STUPPNER et al., 1993) wie die Solid-Phase-Micro-Extraction (SPME) (RUBIOLO et al., 2006). Eine andere Möglichkeit der schnellen und sehr effektiven Probenvorbereitung stellt die Mikrodestillation der Kamillenblüten dar (GIESSELMANN und MÜLLER, 2001).

Tab. B-2 Einteilung der Handelskamillen und Kamillenprovenienzen in Chemodeme nach (SCHILCHER, 2004)

Chemische Charakteristika	Endemische Herkunft (Handelskamille)
Bisabololoxid A-Typ	Ägypten, Tschechien, Böhmen, Ungarn
Bisabololoxid B-Typ	Argentinien
Bisabolol-Typ	Spanien (Degumille®)
Bisabolonoxid A-Typ	Türkei, Bulgarien
Matricinfreier bzw. -armer Typ sog. „Uniforme Type“ ähnlich Mengen an Bisabololoxid A und B sowie Bisabolol	Ägypten, Türkei eher Variationen lokaler Mischpopulationen

2.3 Phenolcarbonsäure-Derivate

2.3.1 Chemie und Eigenschaften

Phenolcarbonsäuren sind im Pflanzenreich weit verbreitet. In vielen Obst- und Gemüsearten sind sie an den Prozessen der enzymatischen Bräunung beteiligt. Phenolcarbonsäuren sind Derivate der Hydroxyzimtsäure (Abb. B-3) und der Hydroxybenzoesäure (Abb. B-4). Sie liegen frei, als Ester oder Glykoside vor. Pharmazeutisch wichtige Vertreter sind die Kaffeesäureester, z.B. die Chlorogensäure (5-O-Caffeoylchinasäuren) oder die Rosmarinsäure (2-O-Caffeylester der 2-Hydroxy-2,3-dihydrokaffeesäure). Phenolcarbonsäuren, vor allem Kaffeesäure-Derivate, wirken aufgrund ihres o-Diphenol-Restes reduzierend und radikalfangend und zeigen daher konservierende und antioxidative Wirkung.

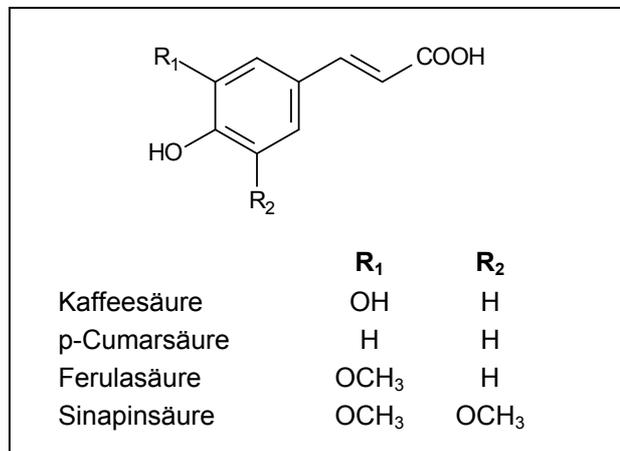


Abb. B-3 Hydroxyzimtsäuren

2.3.2 Phenolcarbonsäure-Derivate in Kamillenblüten

Die Gruppe der Phenolcarbonsäuren in Kamillenblüten ist nur sporadisch untersucht. So haben REICHLING et al. (1979b) in Kamillenblüten neben Kaffeesäure auch Syringa-, Vanillin- und Anissäure gefunden, wobei in den meisten untersuchten Kamillenproben die Anissäure mengenmäßig dominierte. Die Untersuchung erfolgte mittels DC durch Vergleich mit Standardsubstanzen. Quantitative Angaben wurden nicht gemacht.

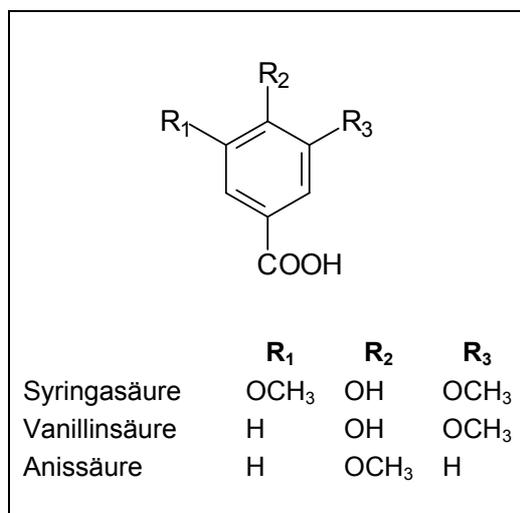


Abb. B-4 Hydroxybenzoesäure-Derivate in Kamillenblüten nach REICHLING et al. (1979a)

Phenolcarbonsäuren können photometrisch nach der Methode von Folin und Ciocalteu (FOLIN und DENIS, 1915) bestimmt werden. Dabei handelt es sich um eine unselektive Methode, die auch andere phenolische Verbindungen, wie z.B. Cumarine und Flavonoide sowie weitere oxidierende Verbindungen miterfasst. Heutzutage wird zur Analytik die HPLC eingesetzt, wobei die einzelnen Phenolcarbonsäure-Derivate getrennt, identifiziert und quantifiziert werden. Bei ihren Untersuchungen von Kamillenblütenextrakten haben MULINACCI et al. (2000) neben den Flavonoiden auch die Phenolcarbonsäuren und Caffeoylchinasäuren mittels HPLC-DAD und HPLC-MS charakterisiert (Abb. B-5). Angaben zu den Gehalten in den Kamillenblüten fehlen.

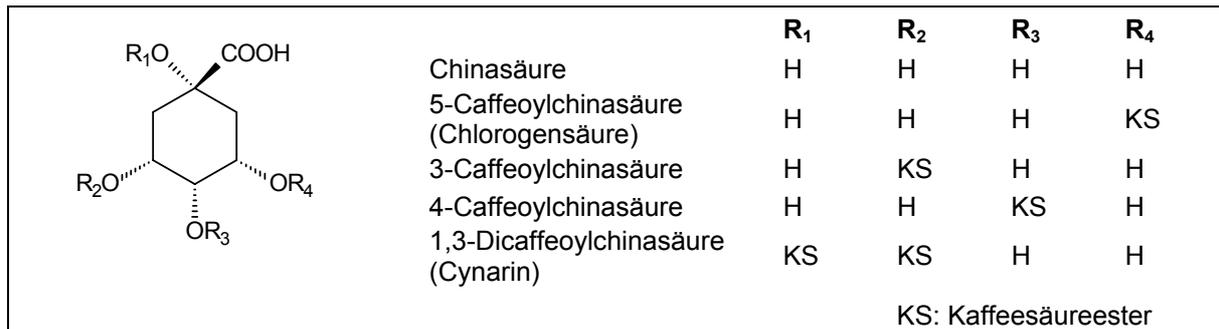


Abb. B-5 Caffeoylchinasäuren der Kamillenblüten nach MULINACCI et al. (2000)

2.4 Cumarine

2.4.1 Chemie und Eigenschaften

Cumarine sind formal Lactone von o-Hydroxycarbonsäuren. Namensgebend ist die Tonkabohne, die Frucht von *Dipteryx odorata* [AUBL.] WILLD. (Fabaceae), aus der das Cumarin 1820 von Vogel zuerst isoliert wurde. Er benannte die isolierte Substanz nach dem karibischen Wort „Coumarou“, der Beschreibung für den Tonka Baum. Aufgrund weiterer chemischer Strukturmerkmale lassen sie sich einteilen in einfache Cumarine (einziger Vertreter das flüchtige Cumarin), Hydroxycumarine (z.B. Herniarin und Umbelliferon), Pyranocumarine und Furanocumarine (auch Furocumarine) mit anelliertem Pyran- bzw. Furanring. Durch Methoxylierung oder C-Prenylierung kann der Grundkörper weiter modifiziert werden. Die nicht an der Lactonbildung beteiligten OH-Gruppen können methyliert, verestert oder glykosidiert sein. Glykoside der Hydroxycumarine sind deutlich hydrophiler als die nicht glykosidierten Cumarine. Besonders lipophil sind Cumarine, deren Grundgerüst zusätzlich mit terpenoiden Resten substituiert sind (HÄNSEL und STICHER, 2007). Hydrophile Cumarin-Glykoside kommen meist in den Blüten und Blättern von vielen Gras- bzw. Kleearten vor, z.B. im Steinklee (Melilotus-Arten) und im Waldmeister (*Galium odoratum* (L.) Scop.).

2.4.2 Cumarine in Kamillenblüten

In Kamillenblüten sind die Cumarine Herniarin und Umbelliferon (Abb. B-6) zu 37 bis 99 mg/100 g bzw. 6 bis 18 mg/100 g enthalten (SCHILCHER et al., 2005a). Beide Cumarine konnten sowohl in den Zungen- als auch in den Röhrenblüten der Kamille nachgewiesen werden, wobei der Gehalt in den Zungenblüten deutlich höher liegt (SCHILCHER, 1987). Eine einfache und schnelle Trennung und Identifizierung kann mittels DC erfolgen (SCHILCHER et al., 2005b). Die Bestimmung der Cumarine in Kamillenblüten kann mittels HPLC (CESKA et al., 1992; REDAELLI et al., 1981b; SCHULZ, 1992; SCHULZ und ALBROSCHKEIT, 1988) oder mittels Kapillarelektrophorese (FONSECA et al., 2001) mit photometrischer oder massenspektrometrischer Detektion erfolgen.

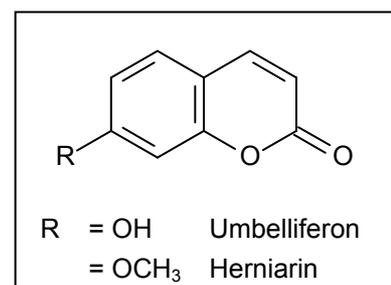


Abb. B-6 Cumarine der Kamillenblüten (R=H : Cumarin)

2.5 Flavonoide

2.5.1 Chemie und Eigenschaften

Der Name Flavonoid stammt aus dem lateinischen (flavus = gelb). Sie kommen in allen höheren Pflanzen vor. Formal handelt es sich um 2-Phenyl-chromane, bei denen zwei aromatische Ringe über eine C3-Brücke miteinander verbunden sind. Diese weist unterschiedliche Oxidationsgrade auf und lässt die einzelnen in Abb. B-7 dargestellten Unterklassen der Flavonoide voneinander unterscheiden: Flavanone (4-Oxo-flavane), Flavone (4-Oxo-flav-2-ene), Flavanonole (3-Hydroxy-4-oxo-flavane) und Flavonole (3-Hydroxy-4-oxo-flav-2-ene). Die Vertreter dieser Flavonoid-Klassen unterscheiden sich durch das Substitutionsmuster (Hydroxy- und Methoxy-Substituenten). Insgesamt sind mehr als 5.000 Strukturen bekannt (HARBORNE und WILLIAMS, 2000; HARBORNE und WILLIAMS, 2001).

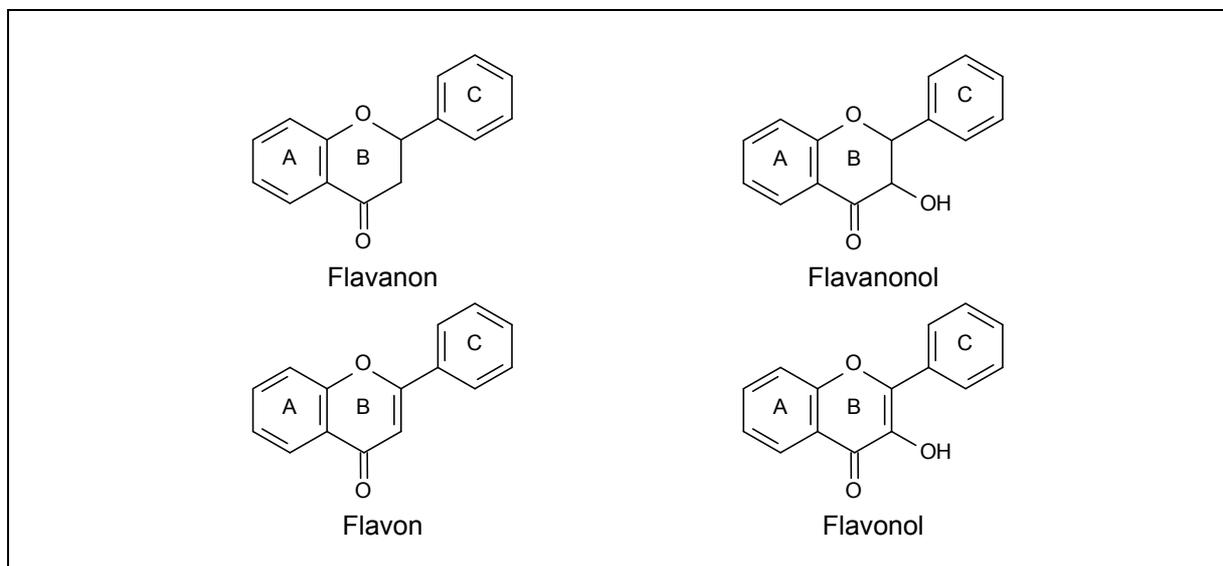


Abb. B-7 Flavonoidgrundstrukturen nach TEUSCHER et al. (2004)

In den Pflanzen liegen Flavonoide vorwiegend in Form ihrer Glykoside in den Vakuolen vor und sind manchmal auch mit aliphatischen und/oder aromatischen Säuren verestert, z.B. mit Malon-, Kaffee- oder Essigsäure. Nicht-glykosidierte lipophile Flavonoide können von der Epidermis auf die Blattoberfläche ausgeschieden werden (HAAS et al., 2003), auch kommen sie akkumuliert im Holzparenchym bestimmter Pflanzen vor (z.B. Farbhölzer).

2.5.2 Flavonoide in Kamillenblüten

In den Kamillenblüten sind vor allem Flavonoidmonoglykoside und deren Aglyka sowie am Zucker acetylierte Derivate von Bedeutung. Damit ist ein breites Löslichkeitsspektrum abgedeckt. Dies bewegte KUNDE und ISAAC (1979) dazu, die Flavonoide aus Kamillenblüten entsprechend ihrer Polaritätsunterschiede in fünf Gruppen einzuteilen (Abb. B-8). Die Polaritätsabschätzung der Autoren basiert auf dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der Kamillenblüten. Bei den acetylierten Flavonmonoglucosiden können anstelle des Acetylrestes auch andere Säurereste stehen, wie z.B. Malon- und Kaffeesäure.

Der Gesamtgehalt an Flavonoiden in Kamillenblüten schwankt zwischen 1,0 und 2,6 g/100 g (SCHILCHER et al., 2005a). Die Zungenblüten führen bis zu 5 g/100 g Apigenin-7-glucosid (REDAELLI et al., 1981a). Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 5.1 „Matricariae Flos“, Nr. 0404) fordert einen Mindestgehalt an Apigenin-7-glucosid von 0,25 g/100 g in der getrockneten Droge, bestimmt mittels HPLC. Untersuchungen an verschiedenen Chemotypen ergab, dass zwar immer die gleichen Flavonoide enthalten sind, deren Verhältnis zueinander jedoch stark schwankt (REICHLING et al., 1979b). Freies Apigenin entsteht nach der Ernte durch enzymatische Spaltung und ist in schonend getrockneten Drogen und Kamillenextrakten nur in geringer Konzentration enthalten (CARLE, 2004). Nach Hydrolyse wurden außer Luteolin und Quercetin 11 teilweise höher methoxylierte Flavonaglyka, wie z. B. Chryso-splenetin, Jaceidin und Chryso-splenol, nachgewiesen (CARLE und ISAAC, 1985; REICHLING et al., 1979b). Eine Zusammenstellung der bislang in Kamillenblüten identifizierten Flavonoide ist in Abb. B-9 dargestellt.

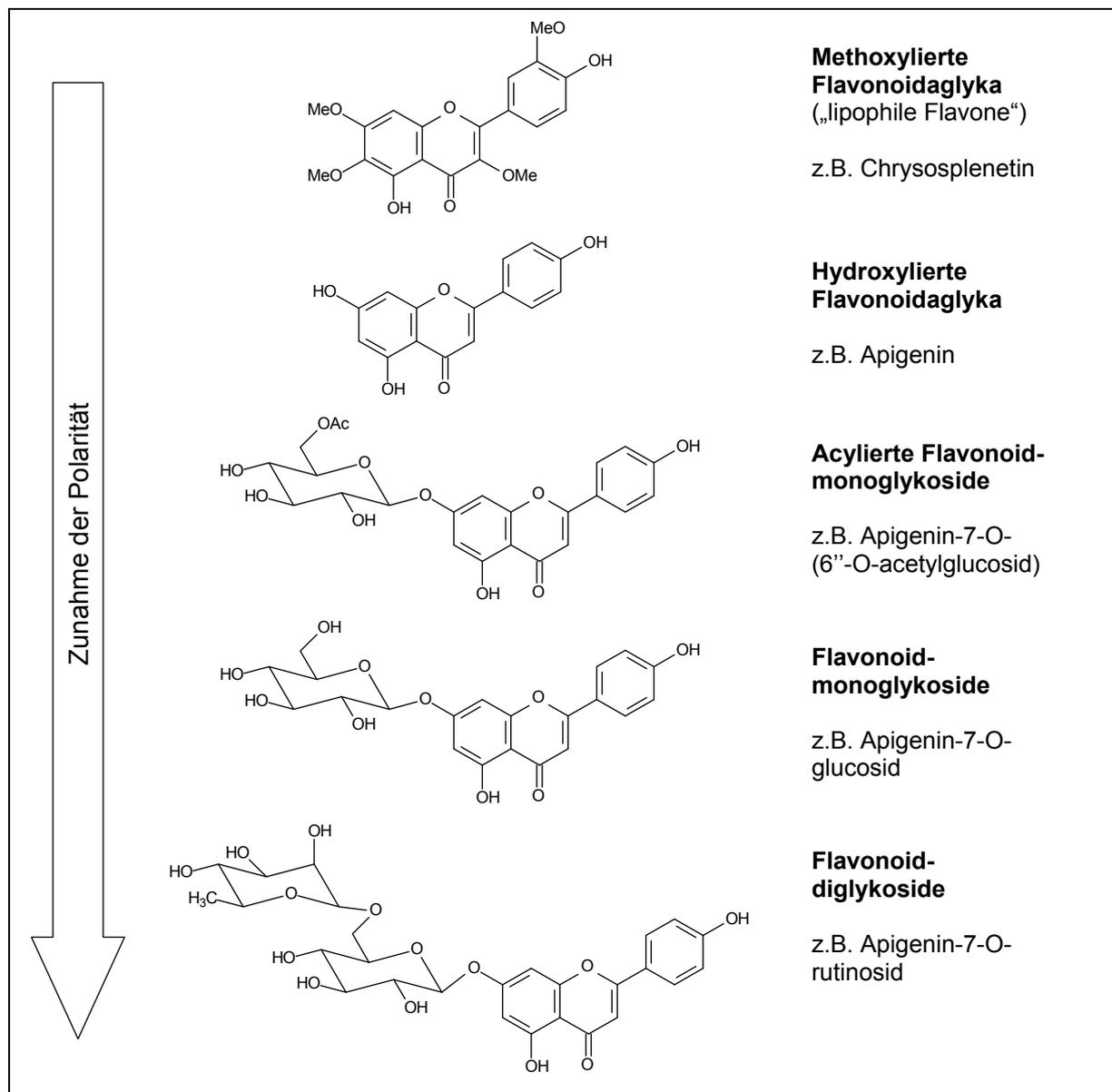
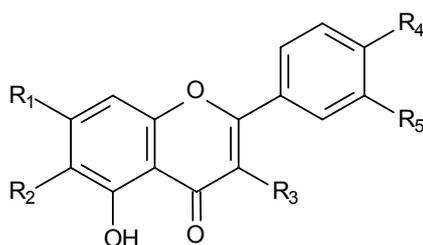


Abb. B-8 Einteilung der Flavonoide aus Kamillenblüten entsprechend ihrer Polarität nach KUNDE und ISAAC (1979)



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Luteolin	H	H	H	OH	OH
Luteolin-7-O-β-glucosid	O-Glc	H	H	OH	OH
Luteolin-4'-O-β-glucosid	H	H	H	O-Glc	OH
Luteolin-7-O-β-rutinosid	O-Glc-Rham	H	H	OH	OH
6-Hydroxy-luteolin-7-glucosid	O-Glc	H	OH	OH	OH
Chrysoeriol	OH	H	H	OH	OCH ₃
Chrysoeriol-7-O-β-glucosid	O-Glc	H	H	OH	OCH ₃
Apigenin	OH	H	H	OH	H
Apigenin-7-O-β-glucosid	O-Glc	H	H	OH	H
Apigenin-7-(6''-O-acetyl)-glucosid	O-Glc-ac	H	H	OH	H
Apigenin-7-(4''-O-acetyl)-glucosid	O-Glc-ac	H	H	OH	H
Apigenin-7-(3''-O-acetyl)-glucosid	O-Glc-ac	H	H	OH	H
Apigenin-7-(2''-O-acetyl)-glucosid	O-Glc-ac	H	H	OH	H
Apigenin-7-(2'', 3''-O-diacetyl)-glucosid	O-Glc-di-ac	H	H	OH	H
Apigenin-7-(3'', 4''-O-diacetyl)-glucosid	O-Glc-di-ac	H	H	OH	H
Apigenin-7-(4'', 6''-O-diacetyl)-glucosid	O-Glc-di-ac	H	H	OH	H
Apigenin-7-(6''-O-malonyl)-glucosid	O-Glc-mal	H	H	OH	H
Apigenin-7-(6''-O-caffeoyl)-glucosid	O-Glc-caf	H	H	OH	H
Apigenin-7-(4''-O-acetyl, 6''malonyl)-glucosid	O-Glc-(ac-mal)	H	H	OH	H
Apigenin-7-(6''-O-apiosyl)-glucosid	O-Glc-Apio	H	H	OH	H
Apigenin-7-rutinosid	O-Glc-Rham	H	H	OH	H
Quercetin	OH	H	OH	OH	OH
Quercetin-7-O-β-glucosid	O-Glc	H	OH	OH	OH
Quercetin-3-O-β-rutinosid	OH	H	O-Glc-Rha	OH	OH
Quercetin-7-O-β-galactosid	OH	H	O-Gal	OH	OH
Isorhamnetin	OH	H	OH	OH	OCH ₃
Isorhamnetin-7-O-β-glucosid	O-Glc	H	OH	OH	OCH ₃
6-Methoxy-kämpferol	OH	OCH ₃	OH	OH	H
Eupaletin	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	H
Patuletin	OH	OCH ₃	OH	OH	OH
Patuletin-7-O-β-glucosid	O-Glc	OCH ₃	OH	OH	OH
Axillarin	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
Spinacetin	OH	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃
Eupatoletin	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OH
Chrysosplenol	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
Chrysosplenetin	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
Jaceidin	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
Astragalin	OH	H	O-Glc	OH	OH

Abb. B-9 Flavonoidglyka und -glykoside aus Kamillenblüten (Zusammenstellung in Anlehnung an SCHILCHER et al. [2005a], MULINACCI et al. [2000] und SVEHLIKOVA et al. [2004])

Die Flavonoide in Kamillenblüten können als Summenparameter spektralphotometrisch bestimmt werden. Dazu haben drei unterschiedliche Konventionen Eingang ins Europäische Arzneibuch gefunden. Die Methode nach Folin und Ciocalteu erfasst alle Verbindungen mit einer freien phenolischen Hydroxygruppe (FOLIN und DENIS, 1915); im Rahmen der pharmakognostischen Drogenanalyse dient diese Methode zur Bestimmung des Gerbstoffgehalts (Ph. Eur. 5.0 „Bestimmung des Gerbstoffgehalts pflanzlicher Drogen“ Nr. 2.8.14). Eine spektralphotometrische Quantifizierungsmöglichkeit zur Bestimmung der Flavonoid-O-Glykoside in Form eines Aluminium-Chelatkomplexes ist in der Monographie für Birkenblätter niedergelegt (Ph. Eur. 5.0 „Birkenblätter“ Nr. 1147), die Bestimmung in Form eines Borinsäurekomplexes in der Monographie für Weißdornblätter (Ph. Eur. 5.0 „Weißdornblätter mit Blüten“ Nr. 1432) erfasst auch Flavonoid-C-Glykoside.

Die Methode der Wahl zur Untersuchung von Flavonoiden stellt heutzutage die HPLC dar. REDAELLI et al. (1981a) entwickelten die erste Methode an einer RP-Phase und einem Acetonitril/Wasser-Elutionsgemisch, die heute noch Anwendung findet (MULINACCI et al., 2000); daneben werden heute auch andere stationäre Phasen zur Trennung verwendet, wie z.B. Cyano-Phasen (SCALIA et al., 1999). Die Detektion der Flavonoide erfolgt spektralphotometrisch bei den für Flavonoiden charakteristischen Maxima im UV/VIS-Spektrum bei 240 bzw. 340 nm. Beim Einsatz eines DAD kann das gesamte Spektrum zur Auswertung herangezogen werden (SCALIA et al., 1999). Massenspektrometrisch können, je nach Ionisierungsart, neben den Molmassen der einzelnen Substanzen über das Fragmentierungsmuster auch auf die Struktur und das Substitutionsmuster geschlossen werden (MULINACCI et al., 2000; SVEHLIKOVA et al., 2004). Neben der HPLC hat sich auch die CE als neue Trenntechnik etabliert (FONSECA und TAVARES, 2004).

Im Vergleich zu gängigen Extraktionspraktiken, wie Perkolation, Mazeration oder Soxhlet-Extraktion stehen heutzutage in Form der Extraktion mit überkritischen Flüssigkeiten (SFE) oder ultraschallunterstützter Extraktion schnellere und effizientere Isolierungsmöglichkeiten zur Verfügung (SCALIA et al., 1999).

2.6 Anthocyane

2.6.1 Chemie und Eigenschaften

Anthocyane sind für die intensiven Farben von rot-violett bis blau oder gar blauschwarz von Blüten, Blättern und Früchten verantwortlich (TIMBERLAKE und BRIDLE, 1975). Sie sind Glykoside der Anthocyanidine, die die eigentlichen Chromophore darstellen. Diese besitzen als Grundgerüst ein Flavylum-Kation (Abb. B-10), in C-4' Position tragen sie eine Hydroxygruppe. Der einfachste Vertreter der Anthocyane ist das Pelargonidin, das in seinem Hydroxylierungsmuster dem Flavonoid Kämpferol entspricht. Weitere mögliche Substitutionsmuster (Hydroxyl- oder Methoxygruppen) sind in Abb. B-10 dargestellt. Als Zuckerkomponenten treten häufig Glucose, Galactose und Rhamnose, seltener Xylose und Arabinose auf.

Diese Zuckerreste sind prinzipiell an die 3-OH-Gruppe des B-Rings gebunden; es kommen jedoch auch Diglykoside vor, die noch einen weiteren Zucker, z.B. am C-5 des A-Rings, tragen. Zusätzlich können diese Zuckermoleküle acyliert mit aliphatischen (z.B. Essigsäure oder Malonsäure) oder aromatischen Säuren (z.B. Phenolcarbonsäuren) vorliegen (HARBORNE, 1986).

Abhängig vom pH-Wert liegen die Anthocyanidine in wässriger Lösung als chinoide Basen, Carbinol- oder Chalkon-Pseudobasen vor und zeigen dabei charakteristische Änderungen ihrer Farben: im saurem Milieu rot, im schwach alkalischen violett oder blau. Oxidationsmittel entfärben die Anthocyanidine, mit Aluminium- oder Eisen(III)-ionen bilden sie tiefviolette gefärbte chelatartige Komplexe.

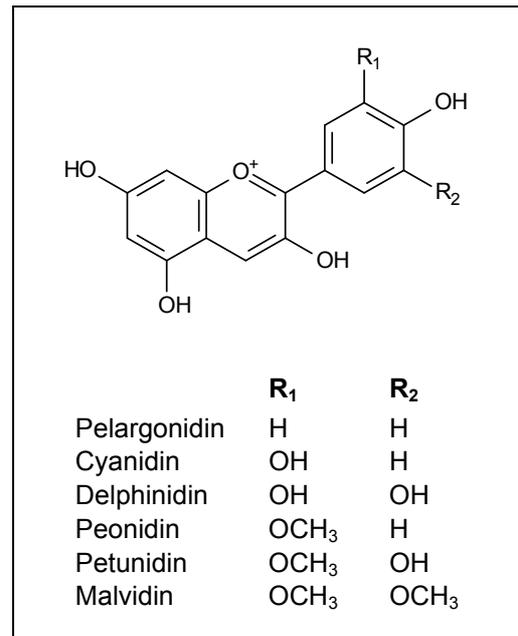


Abb. B-10 Substitutionsmuster der Anthocyanidine aus Stockrosenblüten

2.6.2 Anthocyane in Stockrosenblüten

Der Anthocyangehalt der Blütendroge liegt bei 0,1 bis 0,2 g/100 g (BLASCHEK, 2004). Neuere Untersuchungen an den Petalen belegen einen Gehalt an Anthocyanidinen von bis zu 2,1 g/100 g für rote Blütenvarietäten und bis zu 2,3 g/100 g für die schwarzen Varietäten (OTAKULOV et al., 1989). In Stockrosenblüten dominieren die 3-O-Monoglucoside des Delphinidins und des Malvidins, begleitet von weiteren Glykosiden von Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Petunidin, Pellargonin und Peonidin (AFIFI und KARAWYA, 1988; BLASCHEK, 2004; KOHLMÜNZER et al., 1983). Zum Glykosylierungsmuster der Anthocyane in Stockrosenblüten gibt es widersprüchliche Ergebnisse.

Anthocyane werden in der Regel mit Methanol extrahiert, das zum Zweck der besseren Extraktion der Anthocyane angesäuert wird. So empfehlen TIMBERLAKE und BRIDLE (1975) salzsaures Methanol, wohl wissend, dass einige Anthocyane durch die Mineralsäure zerfallen könnten. RAKHIMKHANOV et al. (1983) nutzen zur Isolierung der Anthocyane 1,5%ige Citronensäure bei einer Temperatur von ca. 70°C über 2h. Zum Schutz vor Oxidation wurde mit Schwefeldioxid begast.

Die Trennung der Anthocyane erfolgte ursprünglich mittels DC, heutzutage durch die HPLC bzw. LC-MS (FENG et al., 2005b). Der Anthocyangehalt kann spektralphotometrisch bestimmt werden oder nach Trennung mittels HPLC (BONERZ et al., 2006). Dabei werden die Anthocyane als solche vermessen oder die Anthocyanidine nach saurer, alkalischer oder enzymatischer Abspaltung der Zuckerreste.

2.7 Carotinoide

2.7.1 Chemie und Eigenschaften

Der Begriff Carotinoide umfasst eine Gruppe von gelben, orangefarbenen bis roten Pigmenten terpenoiden Ursprungs (Tetraterpene), die im Pflanzenreich als Farbe von Blüten und Früchten verbreitet ist. Die Stoffgruppe beinhaltet Carotine und Xanthophylle. Bei ersteren handelt es sich um hoch ungesättigte aliphatische und alicyclische Kohlenwasserstoffe (z.B. β -Carotin in Abb. B-11), mit meist eher rötlicher Farbe (ISAAC, 1992). Xanthophylle sind die sauerstoffhaltigen Derivate der Carotine (z.B. Lutein in Abb. B-11). Sie zeichnen sich durch gelbe Farbtöne aus und kommen vorwiegend in grünen Pflanzenteilen vor, werden hier aber vom Chlorophyll überdeckt. Die Farbigkeit der Carotinoide beruht auf ihrer Polyen-Struktur mit elf konjugierten Doppelbindungen. Bekannt sind auch Apo-, Nor- bzw. Seco-Carotinoide, die durch Ringöffnung oder verkürzte Ketten charakterisiert sind, sowie die Retro-Carotinoide, bei denen die Doppelbindungen verschoben sind. Carotinoide liegen überwiegend als all-trans-Isomere vor; nur sehr wenige natürliche Carotinoide weisen eine cis-Konfiguration auf (LADISLAV et al., 2005). Die sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen der Xanthophylle sitzen immer am Ende und nie innerhalb der hochkonjugierten Kette.

Heute kennt man weit über 700 verschiedene natürlich vorkommende Carotinoide (LADISLAV et al., 2005). Außer der Farbgebung haben sie eine Funktion als akzessorische Pigmente bei der Photosynthese. Auch dienen sie als Schutzpigment vor oxidativen Prozessen.

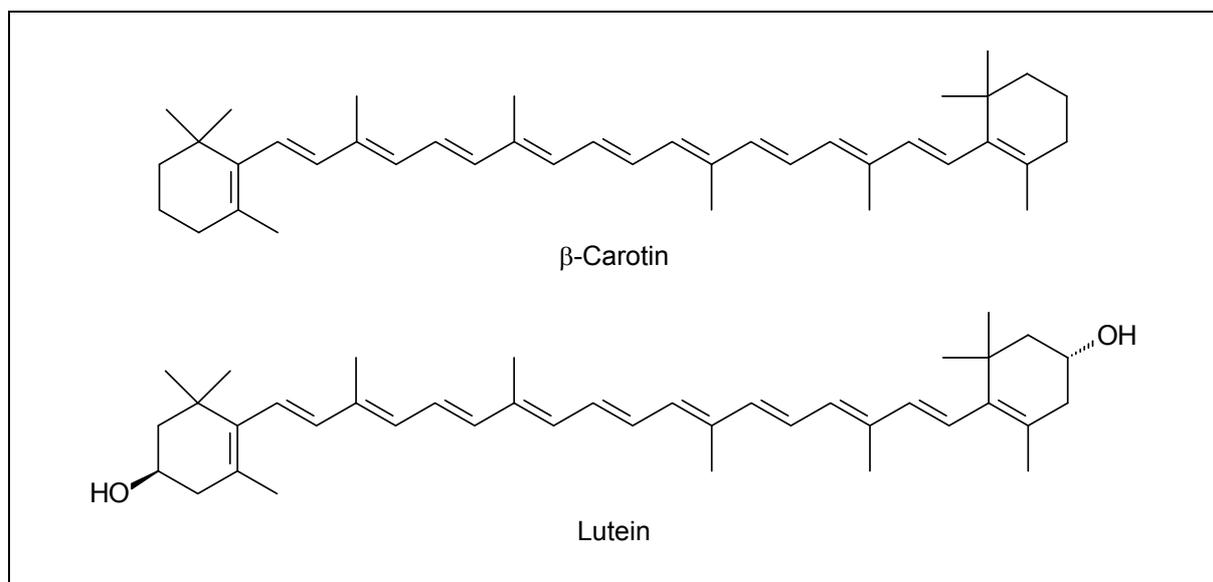


Abb. B-11 Hauptcarotinoide aus Ringelblumenblüten: das Carotin β -Carotin und das Xanthophyll Lutein

2.7.2 Carotinoide in Ringelblumenblüten

Bei Ringelblumenblüten unterscheidet man zwischen den Gelb- und den Orangeblühenden. Die höchsten Gehalte an Carotinoiden wurden in den orangeblühenden Sorten gefunden. So haben BOMME et al. (1990) in ihren spektrometrischen Untersuchungen von orange-farbenen Blüten durchschnittliche Werte von 0,03 bis 0,14 g/100 g (berechnet als β -Carotin) ermittelt. In ihren Studien haben BAKO et al. (2002) Werte zwischen 0,01 g/100 g für gelbe und 0,04 g/100 g für orangefarbene Blüten bezogen auf die gesamte Droge ermittelt, mit deutlich höheren Werten (bis zu 0,8 g/100 g) in den Petalen. Die wichtigsten Vertreter der Carotinoide in Ringelblumenblüten sind neben Lutein mit einem Anteil von 15 bis 25%, 13/13'-Lutein, β -Carotin und Z- β -Carotin (BAKO et al., 2002). Der Hauptunterschied zwischen den gelb und den orange blühenden Sorten macht das intensiv rotfärbende, acyclische Carotinoid Lycopin aus, das in den gelben Varietäten ganz fehlt. Darüber hinaus wurden in Ringelblumenblüten noch folgende Carotinoide nachgewiesen: Antheraxanthin, Auroxanthin, γ -Carotin, ξ -Carotin, Chrysanthemaxanthin, Citroxanthin, Flavochrom, Flavoxanthin, Luteinepoxid, Luteoxanthin, Mutatoxanthin, Rubixanthin, Violaxanthin und Zeaxanthin. 86% der Carotinoide sind in den Chromoplasten lokalisiert, der Rest verteilt sich auf die Mikrosomen und das Cytosol (ADLER und KASPRZYK, 1976).

Für die Isolierung der Carotine sind unpolare Lösungsmittel wie Hexan, Heptan oder Isooctan gut geeignet, wohingegen für Xanthophylle polarere Lösungsmittel, wie Aceton, Methanol oder Ethanol, zweckdienlicher sind (SU et al., 2002b). Sinnvoll ist daher eine Isolierung in zwei Schritten (BAKO et al., 2002): zuerst Extraktion der Xanthophylle mit Methanol, dann mit Diethylether die Carotine. Andere Autoren extrahieren in einem Schritt mit Methanol und Chloroform (2+1 VT) (BOMME et al., 1990) oder mit reinem Aceton (PICCAGLIA et al., 1997). Wegen der Empfindlichkeit der Carotinoide gegenüber Licht und Sauerstoff muss auf einen Ausschluss von Licht und Sauerstoff geachtet werden, sowie die Temperatur der Extraktionen auf maximal 30°C beschränkt werden.

Die Carotinoide lassen sich spektralphotometrisch bei einer charakteristischen Wellenlänge von 450 nm vermessen (BEZBRADICA et al., 2005; BOMME et al., 1990; GORA et al., 1980). Trennungen gelingen mittels DC oder HPLC unter Verwendung von RP-Trennsäulen sowohl isokratisch als auch unter Gradientenbedingungen. Die Detektion erfolgt spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm (BAKO et al., 2002; PICCAGLIA und VENTURI, 1998; PICCAGLIA et al., 1997).

2.8 Sterole

2.8.1 Chemie und Eigenschaften

Sterole (oft auch Sterine) werden nach ihrer Herkunft aus dem Tier-, Pilz- oder Pflanzenreich als Zoo-, Myko- oder Phytosterole bezeichnet. Diese Einteilung ist heute genau genommen nicht mehr ganz korrekt, da sich die unterschiedlichen Vertreter in allen Reichen gleichermaßen nachweisen lassen. Sterole besitzen ein 17 C-Atome umfassendes, tetracyclisches Ringsystem (Steran-Struktur), das am C10 und C13 je eine β -Methylgruppe trägt (Androstan-Struktur). Je nach Verknüpfung der Ringe im Androstan unterscheidet man aufgrund der unterschiedlichen Stereometrie am C5 die 5α - bzw. die 5β -Reihe (Abb. B-12). Darüber hinaus ist allen Sterolen gemein, dass sie in 3β -Position eine Hydroxy-Gruppe und am C17 in β -Position eine aliphatische Seitenkette mit 8 bis 10 C-Atomen tragen. Sterole, die am C4-Atom nicht methyliert sind (z.B. Cholesterol) bezeichnet man als Desmethylsterole. Sterole, die am C4-Atom eine α -ständige oder gar zwei Methylgruppe(n) tragen, bezeichnet man als Methyl- bzw. Dimethylsterole. Den Stanolen, die eine Untergruppe der Sterole darstellen, fehlt die Doppelbindung zwischen dem C5- und C6-Atom.

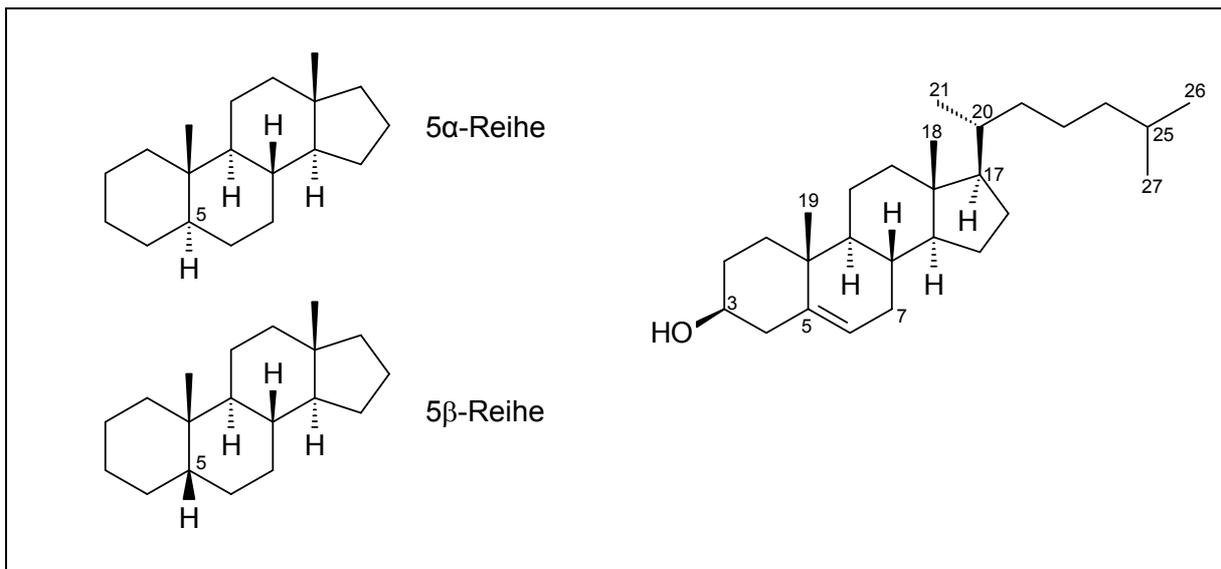
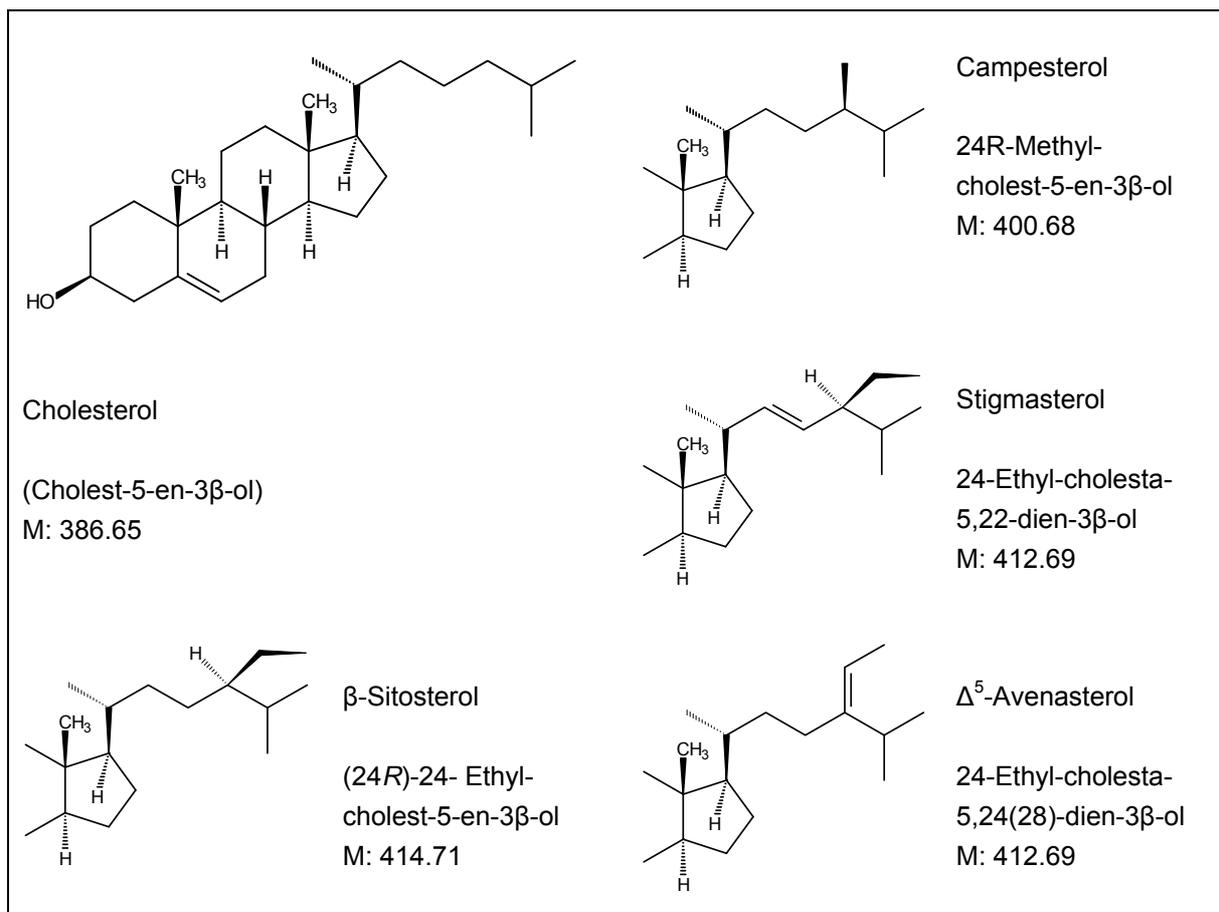


Abb. B-12 Strukturmerkmale der Sterole insbesondere am Beispiel von Cholesterol

Die wichtigsten Sterole des Pflanzenreichs sind β -Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol, die im Vergleich zum Cholesterol durch eine längere Seitenkette am C17-Atom gekennzeichnet sind (Abb. B-13). Sie wurden bislang aus allen Pflanzenorganen und -geweben isoliert, wobei sie vorwiegend in den Plasmamembranen lokalisiert sind. Hier treten sie entweder in freier Form, meist jedoch als Fettsäureester auf; auch glykosidisch gebundene Sterole wurden nachgewiesen.

2.8.2 Sterole in Ringelblumenblüten

Der Sterolgehalt getrockneter Ringelblumenblüten beträgt nach WILKOMIRSKI und KASPRZYK (1979) zwischen 0,06 und 0,08 g/100 g, wobei in den Zungenblüten die höchsten Gehalte von bis zu 0,13 g/100 g ermittelt wurden. Die Sterole treten dabei zum Großteil als freie Alkohole, aber auch als Sterylester auf; auch Glykoside und acylierte Glykoside wurden nachgewiesen (HEISIG, 1991). Die Sterylester machen etwa 20% des Gesamtsterolgehaltes der Blüten aus und verteilen sich zu 77% auf β -Sitosterol und zu 23% auf Stigmasterol (WOJCIECHOWSKI et al., 1972). Die freien Sterole verteilen sich auf 49% Stigmasterol, 21% β -Sitosterol, 7% Campesterol und 1% Cholesterol (WILKOMIRSKI und KASPRZYK, 1979). Darüber hinaus wurden in Ringelblumenblüten noch die Sterole 28-Isoufosterol (= Δ^5 -Avenasterol), 24-Methylencholesterol (= 24-Methylcholesta-5,24(28)-dien-3 β -ol), Stigmast-3 β -ol (= β -Sitostanol), Stigmast-7-en-3 β -ol und Ergost-7-en-3 β -ol (= Δ^7 -Campesterol) nachgewiesen (HEISIG, 1991; SLIWOWSKI und KASPRZYK, 1974; WOJCIECHOWSKI et al., 1972).

Abb. B-13 Desmethylsterole – Δ^5 -Sterole aus Ringelblumenblüten

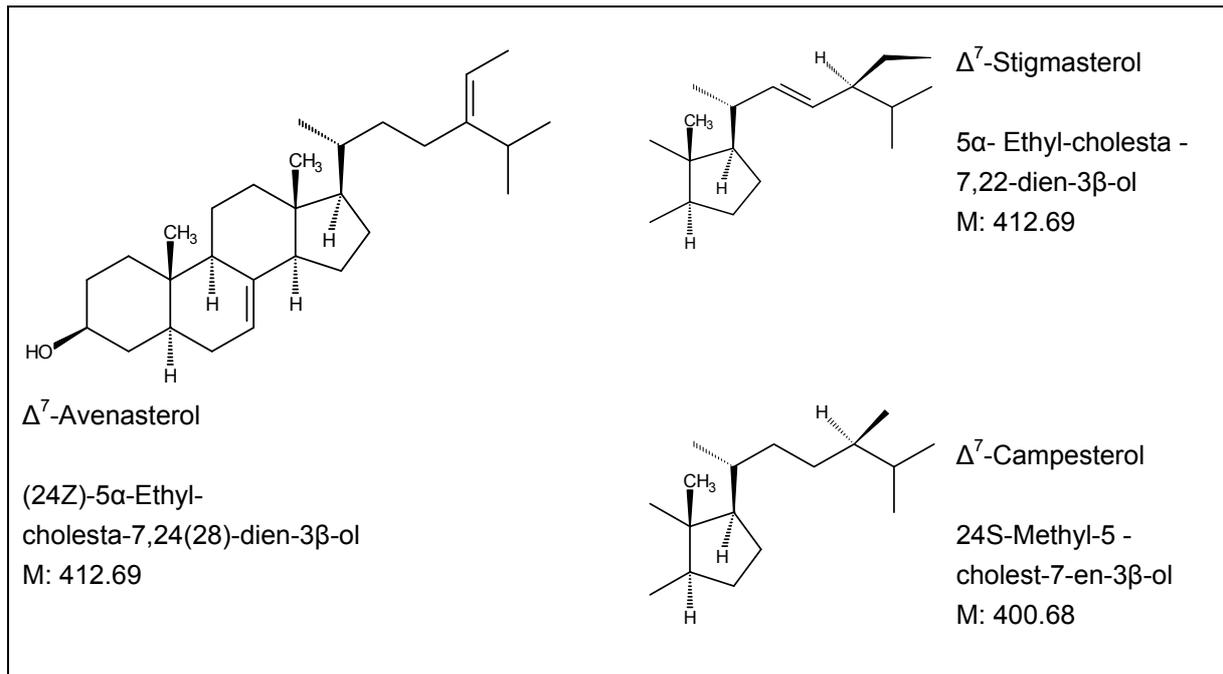


Abb. B-14 Desmethylsterole – Δ^7 -Sterole aus Ringelblumenblüten

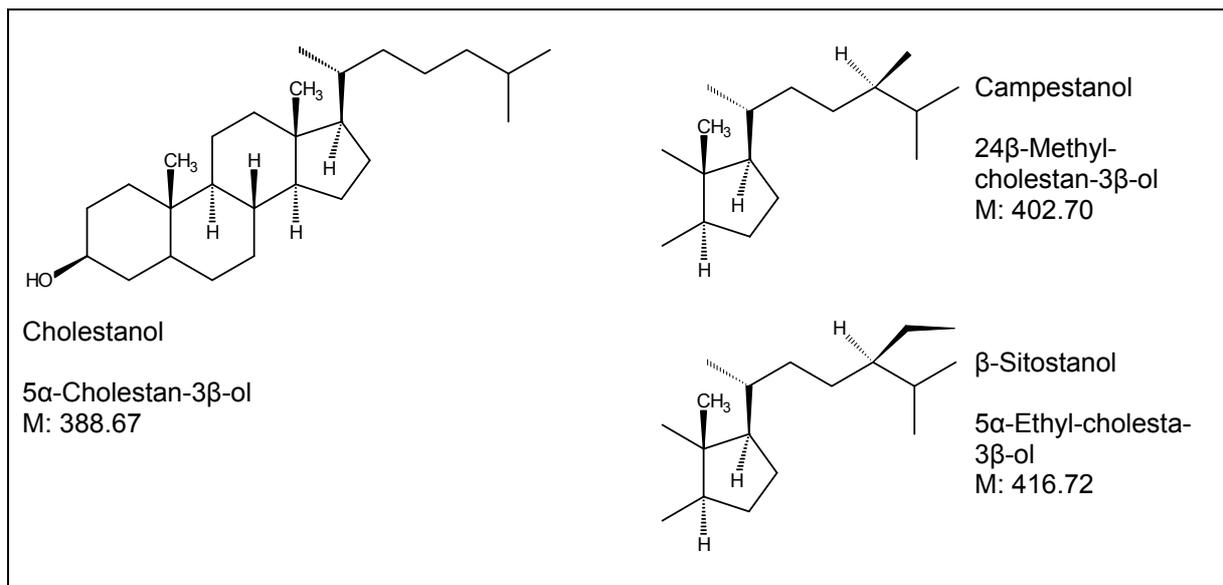


Abb. B-15 Stanole aus Ringelblumenblüten

Die Isolierung der Sterole aus Ringelblumenblüten erfolgt nach zwei Methoden: Entweder wird die Droge zunächst einer Soxhlett-Extraktion z.B. mit Diethylether oder Petrolether unterworfen, und anschließend der lipophile Extrakt verseift (JANISZOWSKA und KASPRZYK, 1977; KASPRZYK et al., 1965; KASPRZYK und PYREK, 1967; WILKOMIRSKI und KASPRZYK, 1976), oder die Droge wird direkt einer Hydrolyse mit alkoholischer Kalilauge unterworfen (KASPRZYK und KOZIEROWSKA, 1966; WOJCIECHOWSKI et al., 1972). Nach der Verseifung kann die Isolierung des Unverseifbaren entweder durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether (KASPRZYK et al., 1965), oder durch eine Extraktion mittels präparativer Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (ADLER und KASPRZYK, 1975; JANISZOWSKA und KASPRZYK, 1977) oder durch säulenchromatographische Auftrennung

an Aluminiumoxid erfolgen (KASPRZYK et al., 1967; WOJCIECHOWSKI et al., 1972). Eine Trennung mit gleichzeitiger Quantifizierung der einzelnen Sterole erfolgt heutzutage mittels GC. Nach Isolierung und anschließender Derivatisierung zu Trimethylsilylethern oder zu Acetatester werden die Sterole ausschließlich auf unpolaren Kapillarsäulen chromatographiert (GERST et al., 1997). Zur Detektion werden MSD eingesetzt (ADLER und KASPRZYK, 1975), gängig sind auch FID (GERST et al., 1997; JANISZOWSKA und KASPRZYK, 1977). Eine schnelle Methode zur Quantifizierung der gesamten Sterolfraction stellt die Photometrie dar nach Umsetzung der isolierten Sterole mit Liebermann-Burchard-Reagenz oder mit CoCl_2 (KASPRZYK et al., 1968; WOJCIECHOWSKI et al., 1972).

2.9 Triterpenalkohole

2.9.1 Chemie und Eigenschaften

Triterpenalkohole sind pentacyclische Triterpene. Man unterscheidet anhand des terpenoiden Gerüsts verschiedene Grundtypen: Oleanan-Typ (z.B. β -Amyrin), Ursen-Typ (z.B. α -Amyrin), Lupen-Typ (z.B. Lupeol), Taraxen-Typ (z.B. Taraxasterol) und ψ -Taraxen-Typ (z.B. ψ -Taraxasterol) (Abb. B-16). Triterpenalkohole sind Bestandteile pflanzlicher Wachse, deren Struktur sie festigen und dadurch die pflanzlichen Oberflächen vor dem Austrocknen und dem Befall durch Mikroorganismen schützen. Des Weiteren kommen die Triterpenalkohole verestert mit kurz- und langkettigen Fettsäuren, assoziiert mit Carotinoiden, in den Chromoplasten der Pflanzen vor (WILKOMIRSKI und KASPRZYK, 1979).

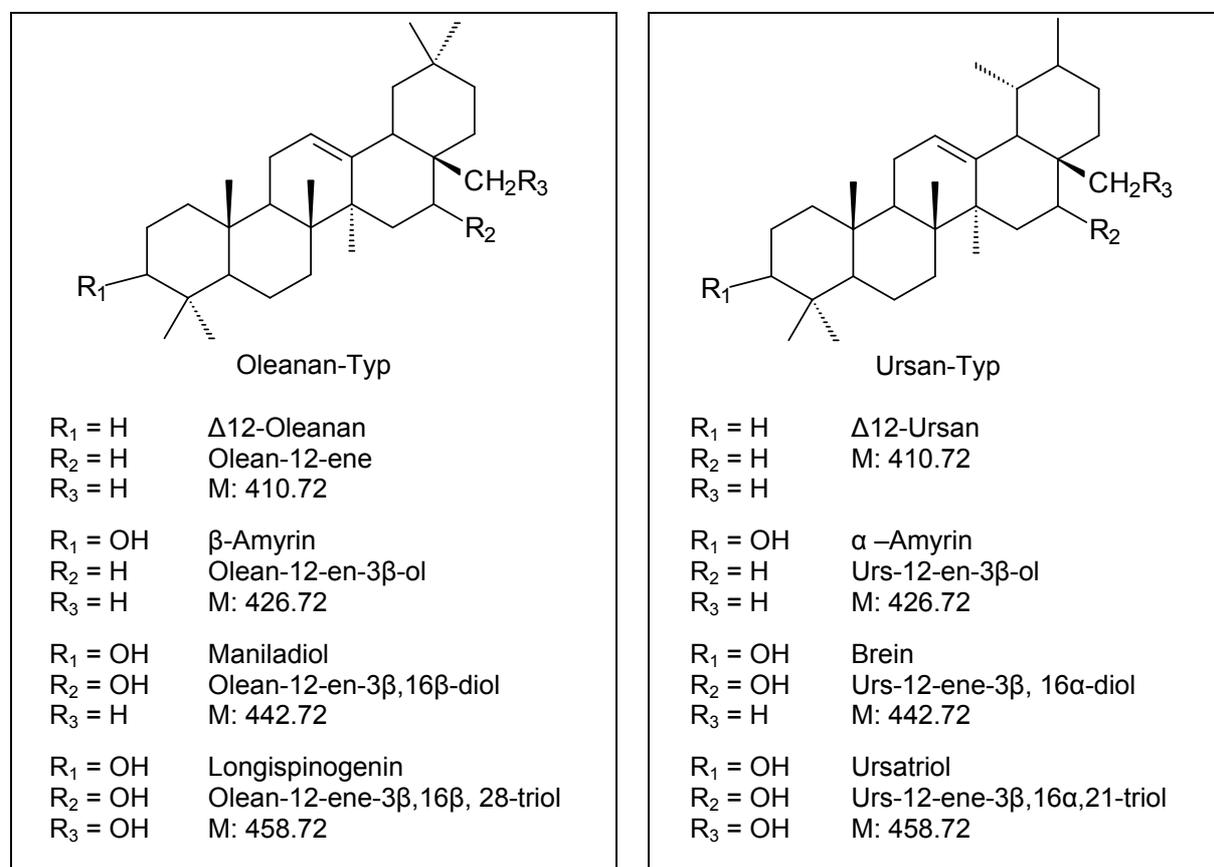


Abb. B-16 Triterpenalkohole und deren terpenoide Grundstruktur aus Ringelblumenblüten

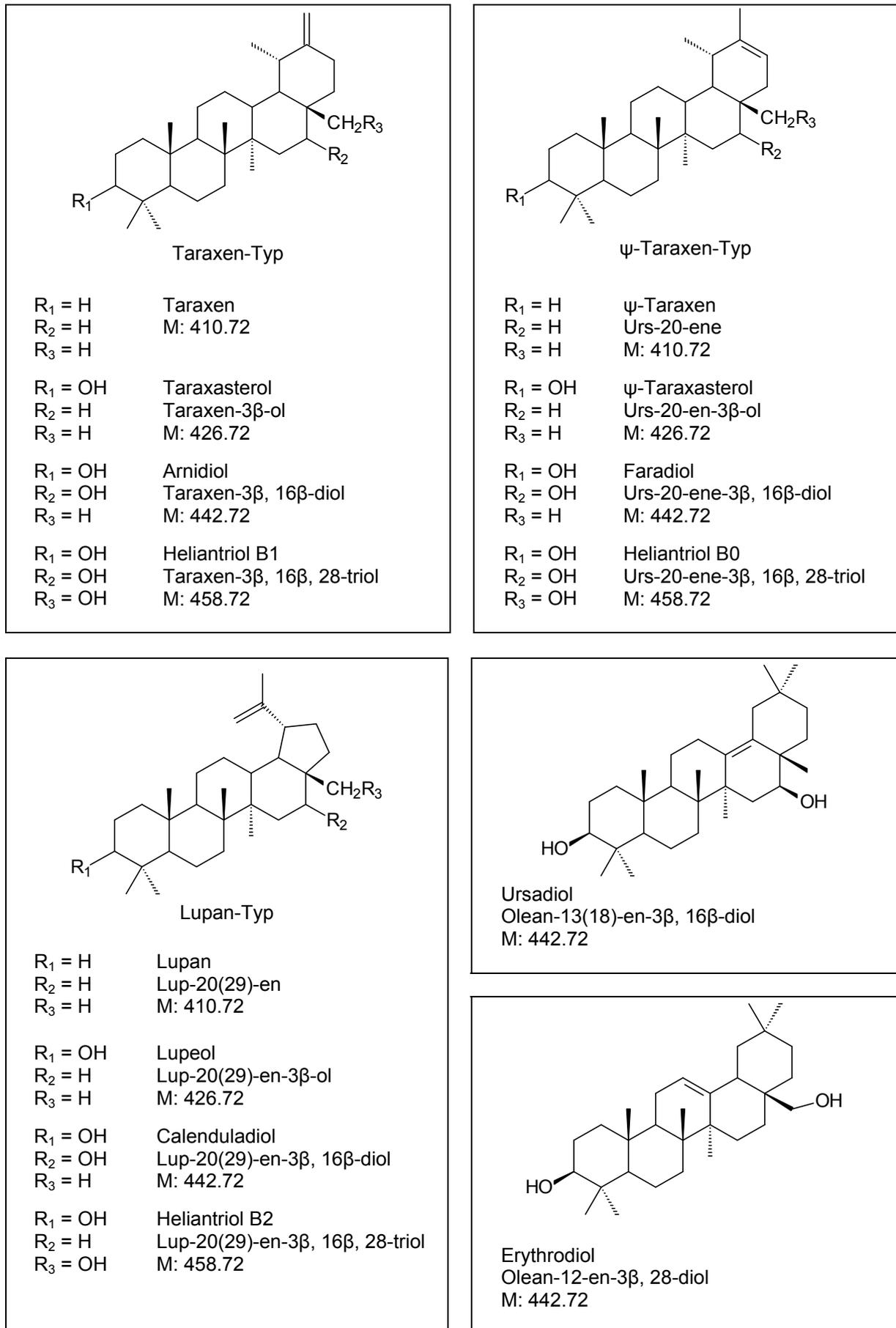


Abb. B-16 Triterpenalkohole und deren terpenoide Grundstruktur aus Ringelblumenblüten (Fortsetzung)

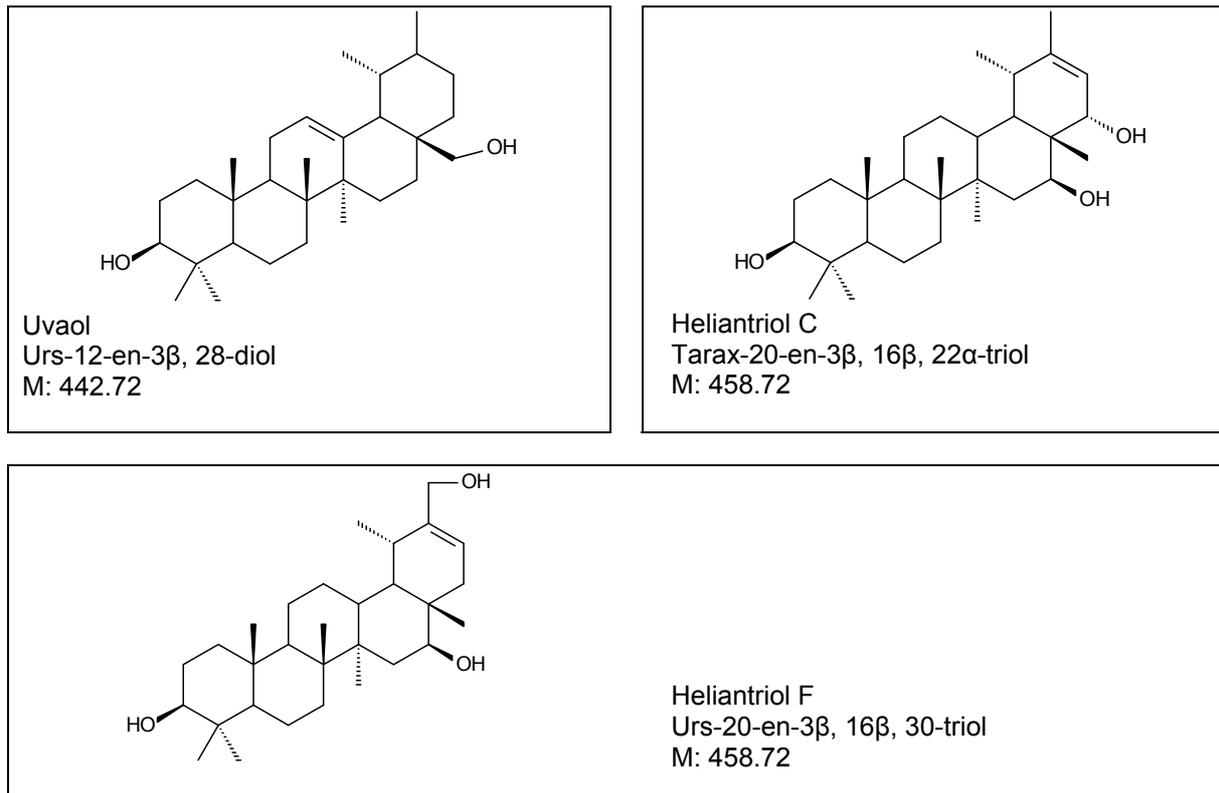


Abb. B-16 Triterpenalkohole und deren terpenoide Grundstruktur aus Ringelblumenblüten (Fortsetzung)

2.9.2 Triterpenalkohole in Ringelblumenblüten

In den Ringelblumenblüten ist eine Vielzahl von Triterpenalkoholen bekannt, mit denen sich vor allem die Arbeitsgruppe um Frau Zofia Kasprzyk detailliert beschäftigte (ADLER und KASPRZYK, 1976; KASPRZYK und PYREK, 1968; WILKOMIRSKI und KASPRZYK, 1979; WOJCIECHOWSKI et al., 1972). Als Mono-, Di- und Triole leiten sich die Triterpenalkohole der Ringelblumenblüten von allen fünf Grundstrukturen ab, die in Abb. B-16 dargestellt sind und kommen sowohl verestert als auch frei vor. 10% der Monoole und 98% der Diole sind verestert, die Monoole mit Essigsäure, die Diole hauptsächlich mit Laurinsäure, Myristicinsäure und Palmitinsäure. 98% der Diole liegen als 3-Monoester vor, nur 2% als Diester. Das Veresterungsmuster der Triole entspricht dem der Triterpendiole. Dabei wurden große Gehaltsunterschiede in den unterschiedlichsten subzellulären Kompartimenten der Ringelblumenblüten festgestellt. Die Monoole sind nur zu zwei Dritteln innerhalb der Chromoplasten lokalisiert. Die Triterpendiole ebenso wie die Triole sind fast ausschließlich in den Chromoplasten lokalisiert (WILKOMIRSKI, 1985a).

Der Monoolgehalt der getrockneten Blüten beträgt 0,8 g/100 g, davon sind 14% α -Amyrin, 4% β -Amyrin, 27% Lupeol, 20% Taraxasterol und 35% ψ -Taraxasterol (STEVENSON, 1961). An 3-Monoestern der Triterpendiole enthalten die getrockneten Blüten ca. 4,00 g/100 g. Diese setzen sich zusammen aus ca. 75% Faradiol- und Arnidiol-Estern, 9,8% Calenduladiol-Estern, 8,6% Brein-Estern und 6,1% Ursadiol-Estern. Der Rest besteht aus Maniladiol- und Erythrodiol-Estern. Der höchste Gehalt an Faradiol-3-monoestern wurde in

den Zungenblüten gefunden, weniger in den Röhrenblüten und sehr wenig in den Samen und in den Kelchblättern (ZITTERL-EGLSEER et al., 1996). In den Blüten sind ferner die Triterpentriole Heliantriol A1, Helantriol B0, Heliantriol B1, Heliantriol B2, Heliantriol C, Longispinogenin und Ursatriol nachgewiesen worden (PYREK, 1979; WILKOMIRSKI, 1985a).

Die Untersuchung der Triterpenalkohole aus Ringelblumenblüten erfolgt in der Regel zusammen mit den Sterolen. Damit sind die Extraktion, Aufreinigung und Analytik meist gleich (Kap. B.2.8.2). Aus diesem Grund soll an dieser Stelle nur noch auf Methoden eingegangen werden, die bei den Sterolen noch nicht beschrieben wurden.

Heutzutage erfolgt die Extraktion mittels Ultraschall (NEUKIRCH et al., 2004; SEYDEL, 2002; ZITTERL-EGLSEER et al., 2001) oder durch die effizientere und schonendere Methoden mit überkritischem Kohlenstoffdioxid (SFE) (HAMBURGER et al., 2003). Da die Triterpenalkohole in den Ringelblumenblüten zum Großteil als Ester vorliegen, müssen diese vor der Analyse hydrolysiert werden. Dies geschieht durch einfaches Verseifen mit alkoholischer Kali- oder Natronlauge (ADLER und KASPRZYK, 1976; AKIHISA et al., 1996; WILKOMIRSKI, 1985a; WILKOMIRSKI, 1985b). Nach der Verseifung erfolgt die Trennung oder Aufreinigung der Triterpenalkohole mittels Kieselgel-DC mit oder ohne Imprägnierung mit AgNO₃ (ADLER und KASPRZYK, 1976; KASPRZYK et al., 1970) oder säulenchromatographisch an Kieselgel (AKIHISA et al., 1996; WILKOMIRSKI, 1985a; WILKOMIRSKI, 1985b) oder an Aluminiumoxid (STEVENSON, 1961). Heute sind zur Fraktionierung Niederdruck-Flüssigchromatographie-Systeme, so genannte Lobar-Systeme ebenso üblich wie präparative bzw. semi-präparative-HPLC (HAMBURGER et al., 2003; NEUKIRCH et al., 2004).

Die chromatographische Analyse erfolgt nach Derivatisierung zu Trimethylsilyl (TMS)- oder Acetatester. Für die Trennung finden unpolare Kapillarsäulen Anwendung (AKIHISA et al., 1996). Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines internen Standards, wie z.B. Cholesterol oder Betulin (AITZETMÜLLER et al., 1998; AKIHISA et al., 1996). Eine Trennung mit gleichzeitiger Quantifizierung der Triterpenalkohole oder auch der unverseiften Triterpenalkohol-Ester aus Ringelblumenblüten erfolgt zweckmäßiger mittels HPLC an RP-18-Säulen und spektralphotometrischer oder massenspektrometrischer Detektion (NEUKIRCH et al., 2004; REZNICEK und ZITTERL-EGLSEER, 2003; ZITTERL-EGLSEER et al., 2001).

2.10 Capsaicinoide

2.10.1 Chemie und Eigenschaften

Capsaicinoide tragen als Phenylalkylamine einen exocyclischen Stickstoff und werden deshalb als Proto- oder Pseudoalkaloide bezeichnet (KOZUKUE et al., 2005). Sie kommen als Scharfstoffe in den Früchten verschiedener *Capsicum*-Arten vor. Formal handelt es sich bei den Capsaicinoiden um Amide von Fettsäuren mit Vanillylamin (4-Hydroxy-3-methoxybenzylamin). Sie unterscheiden sich in der Länge der aliphatischen Kette (9 bis 11 C-Atome), dem Ort der Methylverzweigung sowie der An- oder Abwesenheit von C-C-Doppelbindungen (HAWER et al., 1993; IWAI et al., 1979).

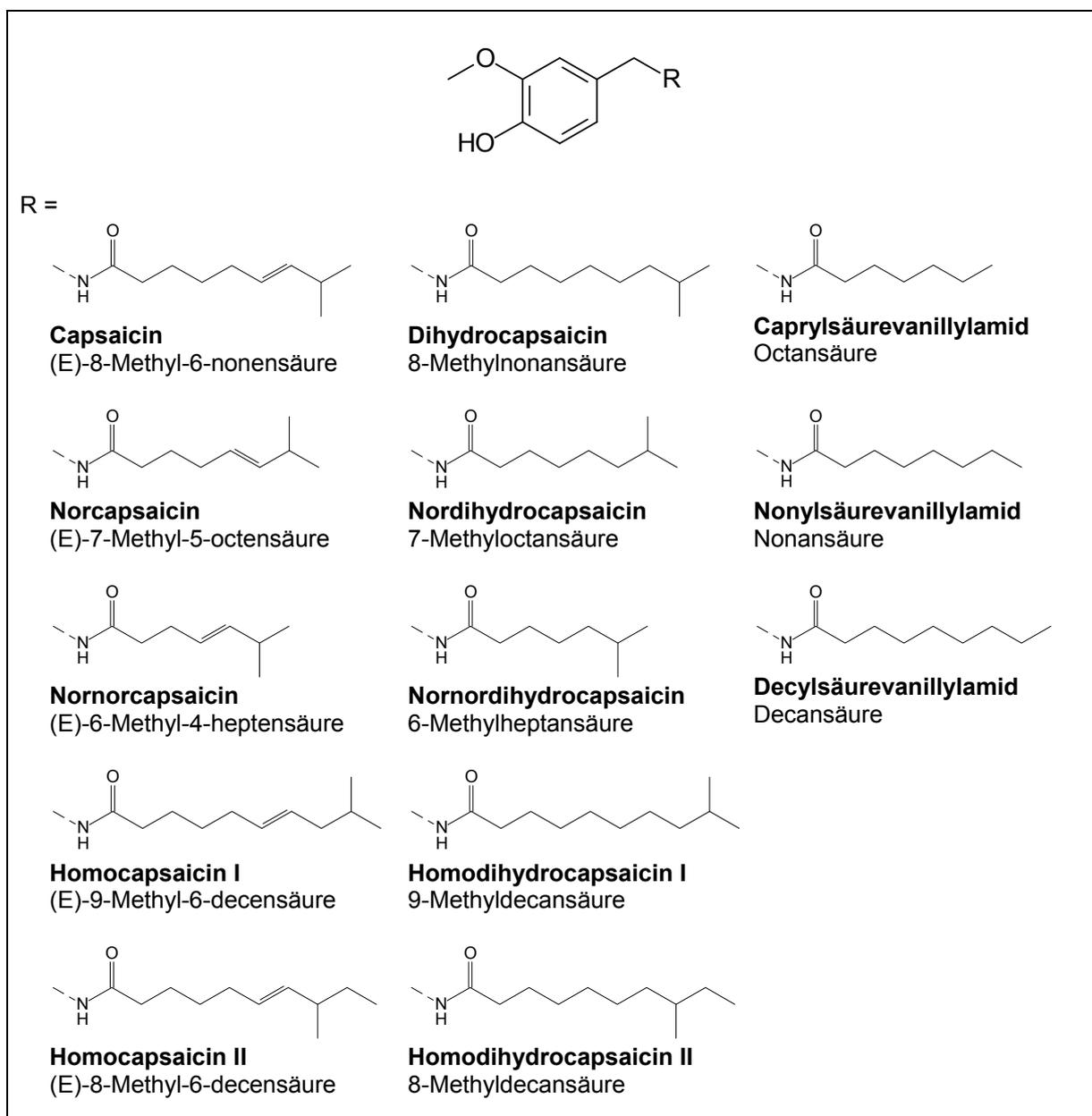


Abb. B-17 Unterscheidung der Capsaicinoide durch ihre zugrunde liegenden Fettsäureamide

Aufgrund dieser Unterschiede in der Acylseitenkette kann man die Capsaicinoide in drei Gruppen einteilen: in die Capsaicin-Homologe, die eine methylverzweigte Seitenkette mit einer C-C-Doppelbindung tragen (Abb. B-17, linke Spalte), die Gruppe der Dihydrocapsaicin-Homologe, die auch methylverzweigte, jedoch gesättigte Seitenketten besitzen (Abb. B-17, mittlere Spalte) und die Gruppe der „N-Vanillyl-N-acylamide“, deren Seitenkette gesättigt und unverzweigt ist (Abb. B-17, rechte Spalte) (SCHWEIGGERT et al., 2006; THOMPSON et al., 2005b). Die Doppelbindung allernatürlichen Capsaicin-Homologe, also Capsaicinoide mit einer Doppelbindung in der Acylkette, liegen in trans-Konformation vor (HIEPLER, 2004).

Capsaicinoide sind farblos, in Wasser nur sehr schlecht, in alkoholischer Lösung oder in Chloroform dagegen leicht löslich. Sie rufen auf der Zunge ein starkes Brennen hervor, das durch einen Hitze- bzw. Schmerzreiz verursacht wird. Capsaicin und die Capsaicinoide sind wasserdampflich, d.h. auch Dämpfe können die Augen und beim Einatmen die Atemwege reizen.

Die Capsaicinoide werden in der Pflanze von speziellen Drüsenzellen zusammen mit dem ätherischen Öl gebildet, die sich auf der Epidermis der Plazentawand befinden. Von dort werden sie in den subkutikulären Raum der Fruchtscheidewand sezerniert und als gelbes, öliges Sekret angereichert (FUJIWAKE et al., 1980). Daher enthalten die Plazenta und die ihr nahen Bestandteile (Samen und Samenscheidewände) hohe Konzentrationen an Scharfstoffen (HIEPLER, 2004).

2.10.2 Capsaicinoide aus Cayennepfefferfrüchten

Je nach Sorte variiert der Gehalt an Capsaicinoiden in getrockneten Früchten von unter 0,1 bis zu 5,0 g/100 g (GIBBS und O'GARRO, 2004; KOZUKUE et al., 2005) und bis zu 14,0 g/kg in frischen Früchten (BAJAJ, 1980; PRUTHI, 2003). Je höher der Capsaicinoidgehalt desto schärfer die Früchte. Dabei machen Capsaicin, Dihydrocapsaicin und Nordihydrocapsaicin zusammen meist mehr als 95% der Capsaicinoidfraktion aus (JURENITSCH et al., 1979). Diese verteilen sich nicht sortenspezifisch zu 63 bis 77% auf Capsaicin, 20 bis 32% auf Dihydrocapsaicin, und 1 bis 8% auf Nordihydrocapsaicin (MANIRAKIZA et al., 2003).

Zur Bestimmung der Schärfe von Paprikafrüchten wurde 1912 von Scoville ein organoleptisches Vergleichsverfahren eingeführt, der so genannte „Scoville heat test“, nach dem heute noch, wenn auch in leicht modifizierter Form, die Schärfe von Chilis angegeben wird (SCOVILLE, 1912). Die verschiedenen *Capsicum*-Arten können auf der so genannten Scoville-Skala Werte von 0 bis über 500.000 erreichen, wobei pures Capsaicin einem Schärfegrad von 15×10^6 bis 16×10^6 Scoville-Einheiten entsprechen würde. Entsprechend dieser Einteilung reicht die Klassifizierung der Schärfe von Capsicum-Arten von mild (0–500 Scoville-Einheiten, z. B. Gemüsepaprika) über pikant (500–1.500 Scoville-Einheiten, z. B. Peperoni, Peperoncini) und mittelscharf (1.500–30.000 Scoville-Einheiten, z. B. Wachspaprika) bis zu

scharf: (30.000–500.000 Scoville-Einheiten, z. B. Cayennepfeffer). Der Capsaicinoidgehalt wird jedoch exakter chemisch-analytisch bestimmt. Die analytisch ermittelten Capsaicinoid-Konzentrationen können dann durch Multiplikation mit speziellen Faktoren in Scoville-Einheiten umgerechnet werden (MANIRAKIZA et al., 2003).

Zur Quantifizierung der Capsaicinoide gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, wobei heutzutage der Schwerpunkt auf den chromatographischen Methoden GC und HPLC liegt. Zur gaschromatographischen Untersuchung der Capsaicinoide wurden verschiedene Strategien entwickelt. Bei der Verwendung einer unpolaren stationären Trennphase müssen die Capsaicinoide derivatisiert werden. Sie lassen sich entweder als Trimethylsilylether (IWAI et al., 1979; TODD, Jr. et al., 1977) trennen oder nach Hydrolyse und Methylierung als Fettsäuremethylester (JURENITSCH et al., 1979; JURENITSCH und LEINMUELLER, 1980). Bei der Verwendung polarer Phasen kann auf eine Derivatisierung verzichtet werden (HAWER et al., 1993; THOMAS et al., 1998). Neben dem konventionellen FID kommen auch thermo-selektive Detektoren (THOMAS et al., 1998) und MSD zum Einsatz (MANIRAKIZA et al., 2003).

Zur Trennung der Capsaicinoide mittels HPLC werden RP-Säulenmaterialien eingesetzt, insbesondere RP-18 (PEUSCH et al., 1997; SCHWEIGGERT et al., 2006), aber auch RP-8 (REILLY et al., 2001). Bessere Trennung, insbesondere in Bezug auf die Nebencapsaicinoide werden mit modernen C30- oder Phenyl-Phasen erreicht (THOMPSON et al., 2005a) oder die Trennleistung der RP-Materialien durch Zugabe von Silberionen erhöht (CONSTANT et al., 1995; THOMPSON et al., 2005a; WILLIAMS und MANDER, 2001). Detektion erfolgt mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm (SANTAMARIA et al., 2000) oder mittels Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 320 nm (HIEPLER, 2004). Auch eine massenspektrometrische Detektion mit verschiedenen Ionisierungseinrichtungen wird genutzt (DE WASCH et al., 2001; SCHWEIGGERT et al., 2006).

An ausgefallenen neuen Methoden ist noch die Analyse der Capsaicinoide mit überkritischer Flüssigkeitschromatographie (SATO et al., 1999), elektronischer Nase (KOREL et al., 2002) oder enzymatischen Immunoassays (PERKINS et al., 2002) zu erwähnen.

Capsaicinoide werden mit organischen Lösungsmitteln oder verdünnten alkoholischen Lösungen mit oder ohne Wärme extrahiert (HAWER et al., 1993; KAALE et al., 2002; KOZUKUE et al., 2005). Um Störpeaks zu vermeiden, wird die Untersuchungslösung an einer RP-18-Säule (ATTUQUAYEFIO und BUCKLE, 1987; SANTAMARIA et al., 2000), oder an einer Kieselgelsäule (JOHNSON et al., 1982) aufgereinigt. Heutzutage spielt die Ultraschall unterstützte Extraktion (KARNKA et al., 2002) oder die Extraktion mit Hilfe von überkritischen Flüssigkeiten eine große Rolle. Nach PEUSCH et al. (1997) ist letztere zwar nicht erschöpfend, jedoch ist die Untersuchungslösung frei von Störsubstanzen.

2.11 Alkaloide

2.11.1 Chemie und Eigenschaften

Alkaloide sind Pflanzenbasen mit heterocyclisch eingebautem Stickstoff. Auch neutrale und sauer reagierende (z.B. Coffein) oder Amine mit aromatischem Ring (z.B. Capsaicinoide, Kap. B.2.10.1) werden zu den Alkaloiden gezählt. Das Stickstoff enthaltende Kohlenstoffskelett entstammt formal einer oder mehrerer Aminosäuren. Ist dies nicht der Fall, spricht man von Pseudoalkaloiden (z.B. Steroidalkaloide oder Terpenalkaloide wie z.B. Taxol). Alkaloidbasen sind meist lipophile Substanzen, die mit Säuren wasserlösliche Salze bilden.

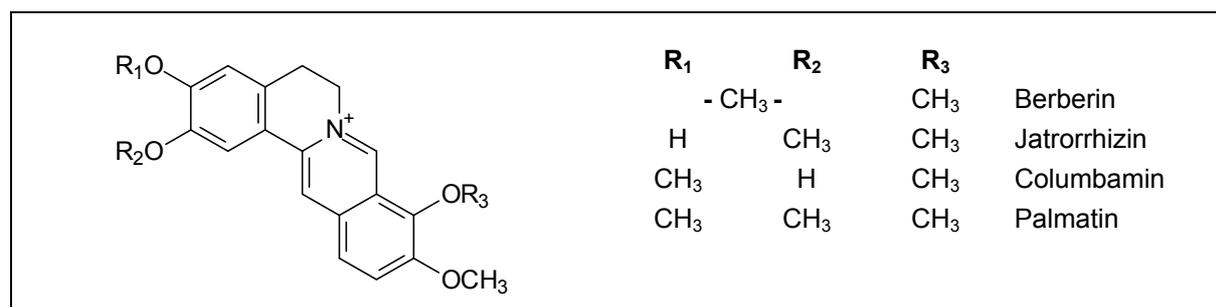


Abb. B-18 Isochinolin-Alkaloide vom Protoberberin-Typ aus Berberitzenwurzelrinde

Die Einteilung der Alkaloide erfolgt aufgrund ihrer heterocyclischen Ringsysteme und gliedert sich dann weiter in Typen, z.B. nach zusätzlichen Resten. So ist in den hier genauer betrachteten Isochinolinalkaloiden vom Protoberberin-Typ eine *N*-Methyl-Gruppe mit dem Benzyl-Rest in *ortho*-Position verknüpft, so dass ein System aus vier Sechseringen entsteht (Abb. B-18). Ein weiterer Alkaloid-Typ innerhalb der Isochinolin-Gruppe sind z.B. die Bisbenzylisochinolin-Alkaloide. Diese bestehen aus zwei Benzyltetrahydroisochinolin-Einheiten, die über mehrere Etherbrücken und oft auch C-C-Bindungen miteinander verknüpft sein können.

2.11.2 Alkaloide in Berberitzenwurzelrinde

Die Rinde von Berberitzenwurzeln enthält einen bemerkenswert hohen Gehalt an Isochinolin-Alkaloiden, wobei Werte bis 13 g/100 g (PETCU und GOINA, 1970) oder gar 15 g/100 g (PITEA, 1975) erreicht werden. Berberin, Palmatin und Jatrorrhizin (Gruppe der Protoberberine, Abb. B-18) stellen die Hauptalkaloide dar. Daneben wurden Columbamin, Berberrubin, Hydroxyberberin, Oxyberberin, Dihydroanhydroberberin (Protoberberine), sowie Berbamin und Oxyacanthin (Bisbenzylisochinoline) nachgewiesen (SUAAU et al., 1998; VILLINSKI et al., 2003).

Die Bandbreite der Extraktionsmittel zur Isolierung der Isochinolin-Alkaloide reicht von Wasser, über saure oder alkalische Lösungen, reinem Methanol oder Ethanol bis hin zu alkoholischen Lösungen mit unpolaren organischen Lösungsmitteln. Der Schwerpunkt liegt bei wässrigen Lösungen mit Methanol oder Ethanol. Das Europäische Arzneibuch fordert in der

Monographie „Kanadische Gelbwurz“ (Ph. Eur. 5.1 „Hydrastidis rhizoma“ Nr. 1831) zur Isolierung von Berberin eine 0,1%ige ammoniakalische Ethanollösung.

Heutzutage erfolgt die Trennung und gleichzeitige quantitative Bestimmung mittels HPLC, wobei in der Literatur nur wenige Methoden beschrieben sind (STURM und STUPPNER, 1998; UNGER und STÖCKIGT, 1997; VILLINSKI et al., 2003). Zieht man in die Betrachtung auch die Analytik anderer Berberin-haltiger Drogen mit ein (z.B. Kanadische Gelbwurz, *Hydrastis canadensis* L.), so ist eine Fülle an chromatographischen Methoden publiziert. Alle bedienen sich der RP-Phasen als stationärer Phase, als Elutionssysteme werden in den meisten Fällen saure oder leicht saure wässrige Gemische mit Acetonitril oder Methanol verwendet (LU et al., 2006; VILLINSKI et al., 2003; WEBER et al., 2001; WU et al., 2005). Da es sich bei den Protoberberin-Alkaloiden um ionische Verbindungen handelt, eluieren sie mit einem Tailing. Dies wird durch Zugabe von Ionenpaar-Reagenzien, wie Na-Dodecylsulfat, Na-Ocatansulfat oder Na-Laurylsulfat kompensiert (FENG et al., 2005a; LEE et al., 1999). Die Detektion kann spektralphotometrisch bei unterschiedlichen Wellenlängen erfolgen, da die Alkaloide vier unterschiedlich stark ausgeprägte Maxima (bei Wellenlängen von 240, 275, 355 und 435 nm) in ihren UV/VIS-Spektren aufweisen. Auch die massenspektrometrische Detektion wird oft angewandt, wobei in diesen Fällen Ionenpaar-Reagenzien keinen Einsatz finden können (VILLINSKI et al., 2003; WEBER et al., 2003).

Da Protoberberine stark polare Verbindungen darstellen, kommen auch elektrochemische Verfahren zur Trennung zum Einsatz, wie die Kapillarelektrophorese, gekoppelt mit spektralphotometrischer (UNGER und STÖCKIGT, 1997) oder massenspektrometrischer (STURM und STUPPNER, 1998) Detektion.

3. BESCHREIBUNG DER ARZNEIDROGEN

3.1 Arnikablüten – *Arnicae flos*

3.1.1 Botanik und Drogengewinnung

Nach der Definition des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur. 5.0 „Arnikablüten“ Nr. 1391) bestehen Arnikablüten (*Arnicae flos*) aus den ganzen oder teilweise zerfallenen und getrockneten Blütenständen bzw. Blütenkörbchen von *Arnica montana* L. (Asteraceae). Arnika oder auch Bergwohlverleih ist in Europa weitgehend geschützt; für pharmazeutische Zwecke wird sie heute kultiviert. Arnika wird bis 60 cm hoch, hat eine grundständige Blattrosette, einen

unverzweigten Stängel mit gegenständigen, verkehrt eiförmigen Blättern und 1-3 Blütenkörbchen. Diese bestehen aus goldgelben Röhren- und Zungenblüten.



Abb. B-19 *Arnica montana* aus „Pflanzenleben des Schwarzwaldes“ (1927)

3.1.2 Inhaltsstoffe

Als Wirkstoffe der Arnikablüten gelten vor allem die Sesquiterpenlactone (0,3 - 1,0 g/100 g), insbesondere Ester des Helenalins und Dihydrohelenalins (Kap. B.2.1). Weiterhin ist ätherisches Öl enthalten (2,0 – 3,0 mL/kg), das aus Fettsäuren, Alkaen, Thymol mit verschiedenen Derivaten und verschiedenen weiteren Mono- und Sesquiterpenen besteht. Außerdem sind Polyacetylene und die Cumarine Scopoletin und Umbelliferon enthalten.

Für die Blütenfarbe sind Xanthophylle (z.B. Lutein) und Flavonoide (0,4 – 0,6 g/100 g) verantwortlich. Letztere liegen vorwiegend als Glykoside vor (z.B. Quercetin-3-glucosid, Kämpferol-3-glucosid und Luteolin-7-

glucosid), können aber auch frei vorkommen. Zu bemerken ist noch das Vorkommen an lipophilen methoxylierten Flavonoidaglyka in den Blüten. An Phenolcarbonsäure-Derivaten ist Chlorogensäure erwähnenswert, ebenso Cynarin und andere Caffeyolchinasäuren.

3.1.3 Arzneibuchanforderungen

Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 5.0 „Arnikablüten“ Nr. 1391) fordert einen Mindestgehalt an Sesquiterpenlactonen von 0,4 g/100 g in der getrockneten Droge, berechnet als Helenalintiglat.

3.1.4 Anwendungsgebiete

Arnikazubereitungen werden nach den Vorgaben der Kommission E zur äußerlichen Anwendung bei Verletzungs- und Unfallfolgen, z.B. Hämatome, Distorsionen, Prellungen, Quetschungen, Frakturödemen sowie bei rheumatischen Muskel- und Gelenkbeschwerden eingesetzt; ebenso gegen Entzündungen der Schleimhäute von Mund- und Rachenraum, Furunkeln und Entzündungen als Folge von Insektenstichen und Oberflächenphlebitis. Ähnliche Anwendungsgebiete werden von der ESCOP beschrieben: äußerlich zur Behandlung von Blutergüssen, Verstauchungen, Entzündungen als Folge von Insektenstichen sowie bei Zahnfleischentzündungen, Aphthen und zur symptomatischen Behandlung von rheumatischen Beschwerden.

Die pharmazeutische Anwendungsform stellen die Tinktur für Umschläge, Infuse oder ölige Auszüge dar. In der Kosmetik werden Arnikazubereitungen als Zusatz zu Mundwässern, Haarwässern, Gesichtscremes und Zahncremes verwendet (HAUSEN und VIELUF, 1997a).

3.1.5 Unerwünschte Nebenwirkungen

Bei der Anwendung von Arnika kann es zur Kontaktallergie kommen, wobei Helenalin und seine Ester verantwortlich sind (HAUSEN und VIELUF, 1997a; WILLUHN, 1986); auch dem ätherischen Öl (enthält Epoxythymol-Derivate) kommt eine allergene Potenz zu (MERFORT, 2001). Trotz der verbreiteten Anwendung treten bei bestimmungsgemäßigem Gebrauch nur relativ selten Kontaktallergien oder Sensibilisierungen auf.

3.2 Kamillenblüten – *Matricariae flos*

3.2.1 Botanik und Drogengewinnung

Nach der Definition des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur. 5.1 „Kamillenblüten“ Nr. 0404) bestehen Kamillenblüten (*Matricariae flos*) aus den getrockneten, mehr oder weniger zerfallenen Blütenköpfchen der Echten Kamille, *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (Synonym: *Matricaria recutita* L.), die zur Familie der Asteraceae gehört. Die Pflanze ist einjährig, bis 50 cm hoch und ist fast weltweit verbreitet. Sie hat 2- bis 3-fach gefiederte Blätter und zahlreiche Blütenköpfchen mit aufgewölbtem, hohlem Blütenboden. Darauf stehen ein Kranz weißer Zungenblüten und zahlreiche gelbe Röhrenblüten. Die Kamille wird heute weltweit angebaut; Hauptlieferanten der Droge sind Argentinien, Ägypten und Ungarn.

3.2.2 Inhaltsstoffe

Das ätherische Öl und die Flavonoide werden für die Wirkung verantwortlich gemacht. Ätherisches Öl ist je nach Sorte und Provenienz zwischen 3,0 und 15,0 mL/kg enthalten (Kap. B.2.2). Flavonoide können bis zu 6 g/100 g in Kamillenblüten enthalten sein (Kap. B.2.5). Ferner sind die Cumarine Herniarin und Umbelliferon zu 0,04 bis 0,12 g/100 g in den Blüten

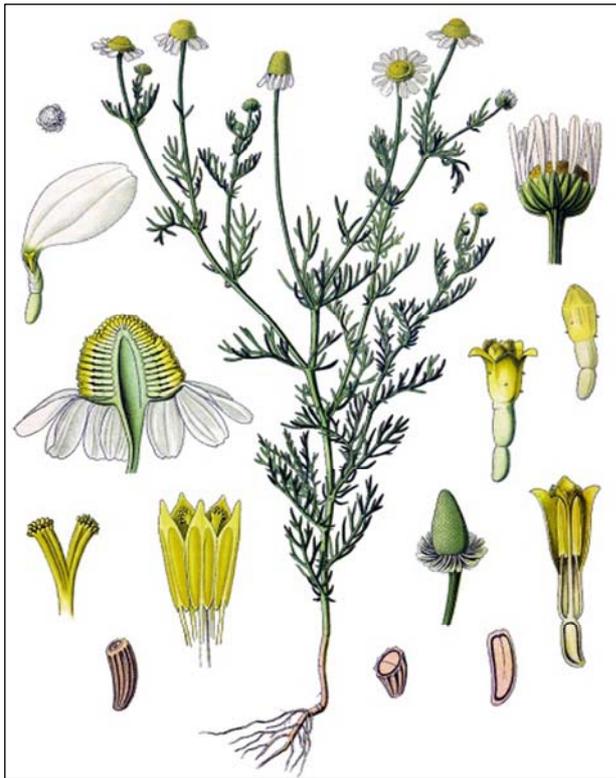


Abb. B-20 Chamomilla recutita „Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz“ (1885)

auch von ESCOP zur äußerlichen, wie auch zur innerlichen Anwendung empfohlen. Die innerlichen Anwendungsgebiete umfassen die Behandlung gastrointestinaler Spasmen und entzündlicher Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes. Die äußerlichen Anwendungsgebiete beinhalten neben der Behandlung von Haut- und Schleimhautentzündungen, auch die Behandlung bakterieller Hauterkrankungen, einschließlich der Mundhöhle und des Zahnfleisches. Auch bei Erkrankungen im Anal- und Genitalbereich können Kamillenpräparate in Form von Bädern oder Spülungen eingesetzt werden. Ebenso wie bei entzündlichen Erkrankungen und Reizzuständen der Luftwege (Inhalation).

Neben der pharmazeutischen Verwendung als Tee, Fluidextrakt, Tinktur und isopropanolisch-wässrigen Auszügen (Balneotherapie) werden Kamillenblüten auch in der Lebensmittelindustrie (Tee) und in der Kosmetikindustrie (ölige Extrakte zur Herstellung von Hautölen oder als Bestandteil sonstiger Pflegeprodukte) eingesetzt (BENDER, 2004).

3.2.5 Unerwünschte Nebenwirkungen

Kontaktallergien durch Kamillenblüten sind sehr selten und dann eher auf sporadisch auftretende Verunreinigungen durch Hundskamille (*Anthemis cotula*) zurückzuführen. Als Kontaktallergen in der Kamille kommt nach HAUSEN und VIELUF (1997c) das Cumarin Herniarin in Betracht. Das Sesquiterpenlacton Matricin besitzt keine exocyclische Doppelbindung und ist deshalb nicht allergen (Kap. B.2.1) (MERFORT, 2001).

enthalten (Kap. B.2.4) sowie Phenolcarbonsäuren (Kap. B.2.3). Darüber hinaus wurden in Kamillenblüten unterschiedlicher Herkunft noch das Sesquiterpenlacton Matricin, Carotinoide, Lipide, Schleimstoffe, Phytosterole, Cholin, Aminosäuren und mineralische Bestandteile nachgewiesen.

3.2.3 Arzneibuchanforderungen

Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 5.1 „Kamillenblüten“ Nr. 0404) fordert in der getrockneten Droge einen Mindestgehalt an blauem ätherischen Öl von 4,0 mL/kg und 0,25 g/100 g an Apigenin-7-glucosid.

3.2.4 Anwendungsgebiete

Zubereitungen aus Kamillenblüten werden sowohl von der Kommission E (BANZ vom 5. Dezember 1984) als

3.3 Stockrosenblüten – *Alceae flos*

3.3.1 Botanik und Drogengewinnung

Stockrosenblüten oder Baummalvenblüten (*Alceae flos* oder *Malvae arboreae flos*) ist keine offizinelle Droge. Sie besteht aus ganzen oder geschnittenen und getrockneten Blüten von *Alcea rosea* L. var. *nigra*, Familie der Malvaceae.

Die *Alcea rosea* L. oder Stockrose ist eine ein- bis mehrjährige, bis 3 m hohe Pflanze mit meist unverzweigtem Stängel und langstieligen Blättern mit herzförmigem Grund. Die Blüten sind 6 bis 10 cm groß und weisen eine intensiv dunkelpurpurne Farbe auf. Daneben existieren jedoch auch weiße, gelbe und rosa bis blassrote Varietäten, sowie Zuchtformen mit gefüllten Blüten, die allerdings nicht für arzneiliche Zwecke verwendet werden. Die handelsübliche Droge stammt überwiegend aus Kulturen osteuropäischer Länder.

3.3.2 Inhaltsstoffe

Stockrosenblüten werden schon seit langem wegen ihrer Anthocyane, die für die intensiven Farben der Petalen, insbesondere der schwarzen Varietäten verantwortlich sind, gehandelt und verwendet (MATLAWSKA, 1992). Die Anthocyane setzen sich aus zwei Hauptvertretern zusammen: den Monoglucosiden des Delphinidins und des Malvidins (KOHLMÜNZER et al., 1983) (OTAKULOV et al., 1989) (Kap. B.2.6.2). Die Droge enthält außerdem Schleimpolysaccharide, die für die Wirkungen der Droge verantwortlich gemacht werden (BLASCHEK, 2004). Außerdem wurden Sterole, Phenolcarbonsäuren und Flavonoide nachgewiesen (FENG et al., 2005b).



Abb. B-21 *Malva alcea* L. aus „Kräuterbuch“ (1914)

3.3.3 Anwendungsgebiete

Stockrosenblüten zeigen laut Kommission E ähnliche Wirkungen wie die Eibischwurzel und finden bei Schleimhautreizungen im Mund- und Rachenraum und damit verbundenem trockenen Hustenreiz Anwendung (BAnz. Nr. 43 vom 02.03.1989). Wegen ihrer Färbung sind Stockrosenblüten, bzw. Malvenblüten, beliebte Schmuckdrogen in Teemischungen speziell in Brust- und Hustentees (HÄNSEL und STICHER, 2007).

3.4 Ringelblumenblüten – *Calendula flos*

3.4.1 Botanik und Drogengewinnung

Nach der Definition des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur. 5.0 „Ringelblumenblüten“ Nr. 1297) bestehen Ringelblumenblüten (*Calendulae flos*) aus ganzen oder geschnittenen, getrockneten, völlig entfalteten, und vom Blüten-



Abb. B-22 *Calendula officinalis* L. aus „Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz“ (1885)

getrockneten, völlig entfalteten, und vom Blütenstandsboden befreiten Einzelblüten verschiedener gefüllter Varietäten von *Calendula officinalis* L., aus der Familie der Asteraceae. Die Pflanze ist einjährig, bis 50 cm hoch. Die wechselständigen Blätter sind 10 bis 15 cm lang und filzig behaart. Jeder Stängel oder Seitenzweig trägt an seiner Spitze ein Blütenköpfchen. Es besteht aus einem schüsselförmigen Hüllkelch, der von zahlreichen grünen, schmal-lanzettlichen, beidseitig dicht mit Drüsenhaaren besetzten Blättchen gebildet wird. Doppelt so lang wie der Hüllkelch sind die etwa 15 bis 20 mm langen Zungenblüten. Das Innere des Köpfchens wird von trichterförmigen Röhrenblüten eingenommen. Infloreszenzen mit mehreren Kreisen von Zungenblüten werden als "gefüllt" bezeichnet. Je nach Sorte sind diese hellgelb bis dunkelorange gefärbt. Die Droge stammt überwiegend aus dem Anbau.

3.4.2 Inhaltsstoffe

Ringelblumenblüten enthalten ein breites Spektrum an terpenoiden Verbindungen. Neben Mono-, Di- und Sesquiterpenen aus dem nur in geringem Maß gebildeten ätherischen Öl, das zu etwa 2 mL/kg in den Blüten vorkommt, sind vor allem Triterpene nachgewiesen. Zu diesen gehören die Triterpensaponine, insbesondere Oligoglykoside der Oleanolsäure, die Saponoside A bis F (VIDAL-OLLIVIER et al., 1989a). Der Gesamtgehalt an Saponosiden beläuft auf sich 2,0 bis 10,0 g/100 g. Abgesehen von den Triterpensäuren ist auch eine Vielzahl an Triterpenalkoholen in den Ringelblumenblüten bekannt, die sich von ψ -Taraxen, Taraxen, Lupen, Oleanen oder Ursen ableiten. Diese kommen in den Blüten als Monole, Di- und Triole verestert oder frei vor (Kap. B.2.9). Als weitere, den Triterpenen nahe verwandte Stoffgruppe kommen Sterole ebenfalls als Ester, als Glykoside oder in freier Form in den Blüten vor (Kap. B.2.8). Die Farbe der Blüten beruht auf den Carotinoiden. In den orangefarbenen Blüten kommen mehr Carotine vor, besonders Lycopin, während in den gelb blühenden Varietäten Xanthophylle dominieren (Kap. B.2.7). Außerdem sind Flavonoide enthalten, insbesondere

glykosidisch gebundenes und freies Isorhamnetin und Quercetin (BILIA et al., 2001; VIDAL-OLLIVIER et al., 1989b), wobei getrocknete Ringelblumenblüten bis zu 2,0 g/100 g Flavonoide enthalten können (PICCAGLIA et al., 1997). Darüber hinaus wurden in der Droge Spuren an Cumarinen (Scopoletin, Umbelliferon und Aesculetin) nachgewiesen.

3.4.3 Arzneibuchanforderungen

Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 5.0 „Ringelblumenblüten“ Nr. 1297) fordert einen Mindestgehalt an Flavonoiden von 0,4 g/100 g in der getrockneten Droge, berechnet als Hype-rosid.

3.4.4 Wirkungen und Anwendungsgebiete

Nach den Vorgaben der Kommission E finden Zubereitungen aus Ringelblumenblüten lokale Anwendung zur Förderung der Wundheilung und aufgrund ihrer entzündungshemmenden und granulationsfördernden Effekte. Als Anwendungsgebiete werden von der der Kommission E die lokale Behandlung von entzündlichen Veränderungen der Mund- und Rachenschleimhaut, schlecht heilende Wunden und Ulcus cruris genannt. Gemäß der ESCOP werden Zubereitungen aus Ringelblumenblüten zur symptomatischen Behandlung leichter Entzündungen der Haut und der Schleimhaut sowie zur Unterstützung der Wundheilung genannt. Ringelblumenblüten werden als Tinktur, Infus oder Fluidextrakte aber auch als Öl-mazerate, die als Salbengrundlagen dienen, verwendet (ISAAC, 1992).

Ringelblumenblüten-Extrakte eignen sich für die Pflege empfindlicher, normaler und trockener Haut und zur Säuglingspflege (DIEMUNSCH und MATHIS, 1980). Daher sind sie auch Bestandteil vieler kosmetischer Produkte, wie Gesichtslotionen, Hand- oder Sonnencremes Badeemulsionen, Seifen, Shampoos (BEZBRADICA et al., 2005; HENRIQUE DOS SANTOS et al., 2005) und kosmetischer Präparate zur Pflege bei Hautrötung, Ödemen oder Sonnenbrand (BAKO et al., 2002; VOGELSSANG, 2006).

3.4.5 Unerwünschte Nebenwirkungen

Allergische Wirkungen sind nicht bekannt, auch sind Kreuzallergien mit anderen Asteraceen sind bisher nicht beschrieben (HAUSEN und VIELUF, 1997b).

3.5 Cayennepfefferfrüchte – *Capsici fructus*

3.5.1 Botanik und Drogengewinnung

Nach der Definition des Europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur. 5.7 „*Capsici fructus*“ Nr. 1859) besteht die Droge aus getrockneten, reifen Früchten von *Capsicum annuum* L. var. *minimum*

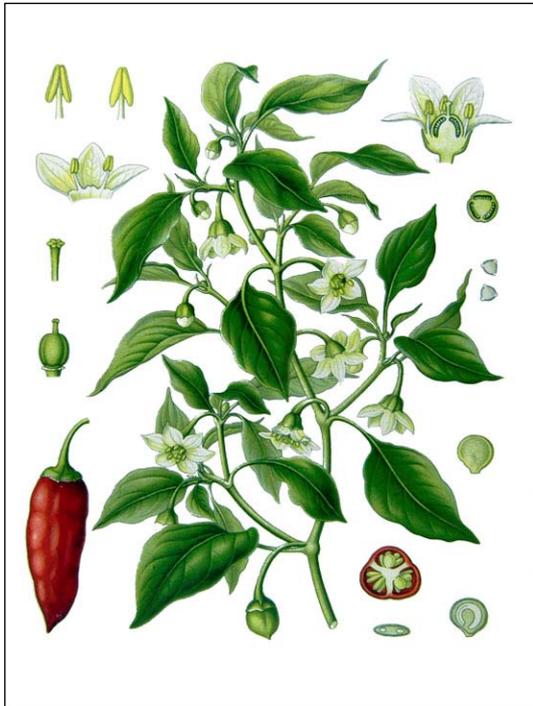


Abb. B-23 *Capsicum annum* L. aus Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen (1887)

(Miller) Heiser und kleinfruchtigen Varietäten von *Capsicum frutescens* L., die zur Familie der Solanaceae gehören. Für diese pharmazeutisch genutzten Arten sind ein extrem scharfer Geschmack und damit ein hoher Gehalt an Scharfstoffen, den Capsaicinoiden, charakteristisch. Die Früchte werden zur Zeit der Vollreife geerntet, in flacher Schicht ausgebreitet und an einem warmen, aber schattigen Ort oder auf Heißluftdarren getrocknet. Botanisch handelt es sich bei *Capsicum frutescens* L. um einen mehrjährigen, buschigen Halbstrauch, bis 150 cm hoch und ovalen bis oval-lanzettlichen Blättern. Im Unterschied dazu ist *Capsicum annum* L. var. *minimum* als nur einjährige Pflanze mit bis 100 cm deutlich kleiner, trägt einzelne, lang gestielte, stumpf zugespitzte Blätter.

Die beiden Stammpflanzen unterscheiden sich auch in Bezug auf die Blüten und Früchte. Die Blüten von *Capsicum annum* L. var. *minimum* hängen meist einzeln oder seltener in Paaren. *Capsicum frutescens* L. bildet fünf- bis siebenzählige radförmige Blüten, die in Paaren oder Gruppen an hängenden oder aufrechten Blütenstielchen gebildet werden. Die Früchte von *Capsicum annum* L. var. *minimum* sind kegelförmig oder länglich spitz, bis zu 15 cm groß. In unreifem Zustand sind sie fleischig und dunkelpurpur, in reifem eher ausgetrocknet, leuchtend rot und mit zahlreichen gelblich-weißen Samen. Die Früchte von *Capsicum frutescens* stehen stets aufrecht, von kugelig bis länglich-spitz variierend, selten größer als 3 cm, mit gelben Samen. Der Capsaicinoid-Gehalt ist unter anderem ein Kriterium zur warenkundlichen Unterscheidung von Gemüse- oder Gewürzpaprika, Chilis oder Peperonis bzw. von „edelsüßem Paprika“ und Cayennepfeffer (Kap. B.2.10.2).

Die beiden Stammpflanzen unterscheiden sich auch in Bezug auf die Blüten und Früchte. Die Blüten von *Capsicum annum* L. var. *minimum* hängen meist einzeln oder seltener in Paaren. *Capsicum frutescens* L. bildet fünf- bis siebenzählige radförmige Blüten, die in Paaren oder Gruppen an hängenden oder aufrechten Blütenstielchen gebildet werden. Die Früchte von *Capsicum annum* L. var. *minimum* sind kegelförmig oder länglich spitz, bis zu 15 cm groß. In unreifem Zustand sind sie fleischig und dunkelpurpur, in reifem eher ausgetrocknet, leuchtend rot und mit zahlreichen gelblich-weißen Samen. Die Früchte von *Capsicum frutescens* stehen stets aufrecht, von kugelig bis länglich-spitz variierend, selten größer als 3 cm, mit gelben Samen. Der Capsaicinoid-Gehalt ist unter anderem ein Kriterium zur warenkundlichen Unterscheidung von Gemüse- oder Gewürzpaprika, Chilis oder Peperonis bzw. von „edelsüßem Paprika“ und Cayennepfeffer (Kap. B.2.10.2).

Beide Arten stammen ursprünglich aus den tropischen Gebieten Südamerikas. Wild kommen sie in den südlichen USA, Mexiko bis ins nördliche oder östliche Südamerika vor, werden heute in verschiedenen Formen in allen wärmeren Gegenden Amerikas und Europas kultiviert. Früchte der tropischen Arten sind Capsaicinoid-reicher als die der gemäßigten Zonen.

3.5.2 Inhaltsstoffe

Paprikafrüchte (*Capsicum annuum* L. var. *minimum*) enthalten je nach Sorte unterschiedliche Mengen an Capsaicinoiden, mit maximal 0,2 g/100 g eher niedrigere Konzentrationen. In den Früchten des Cayennepfeffers (*Capsicum frutescens*) ist der Capsaicinoid-Gehalt deutlich höher (Kap. B.2.10). Zusammen mit den Scharfstoffen wird in allen *Capsicum*-Arten ätherisches Öl in denselben sezernierenden Zellen gebildet und in den Subkutikularraum ausgeschieden. Dieses ätherische Öl ist nur zu ca. 1,0 mL/kg in den Früchten vorhanden (PRUTHI, 2003) und enthält die für das Aroma charakteristischen Verbindungen 2-Methoxy-3-isobutylpyrazin und Capsiamid (N-(13-Methyltetradecyl)-acetamid). Die intensive rote Farbe beruht auf den lipophilen Carotinoiden, die zu 0,3 bis 6,0 g/100 g in freier Form oder verestert mit verschiedenen Fettsäuren vorliegen (PRUTHI, 2003). Hauptvertreter sind Capsanthin und Capsorubin, die zusammen ca. 60% der Gesamtcarotinoide ausmachen. Daneben wurden noch α - und β -Carotin, Zeaxanthin, Violaxanthin, Neoxanthin, Cryptoxanthin, Luteoxanthin und Lutein nachgewiesen. Außerdem sind antimykotisch wirksame Steroidsaponine (0,2 bis 0,3 g/100 g) enthalten und Flavonglykoside, insbesondere mit Apigenin und Luteolin als Aglyka, Vitamin C und Zucker.

3.5.3 Arzneibuchanforderungen

Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 5.7 „Capsici fructus“ Nr. 1859) fordert einen Mindestgehalt an Capsaicinoiden von 0,4 g/100 g in der getrockneten Droge, berechnet als Capsaicin.

3.5.4 Anwendungsgebiete

Zubereitungen aus Cayennepfefferfrüchten werden nach den Empfehlungen der Kommission E ausschließlich zur äußerlich Hautreiztherapie bei schmerzhaften Muskelverspannungen im Schulter-Arm-Bereich sowie im Bereich der Wirbelsäule angewandt. Aber sie dienen auch als lokales Analgetikum bei rheumatischen Beschwerden, diabetischen Neuropathien und Neuralgien, insbesondere Post-Zoster-Schmerzen. Darüber hinaus werden Cayennepfefferfrucht-Extrakte als Bestandteil von Cremes zur Förderung der Durchblutung und Steigerung der Reizempfindlichkeit im Genitalbereich eingesetzt.

Zur Anwendung kommen Salben, Gele, Linimente und Pflaster, die als Wirkstoffe die isolierten Capsaicinoide oder Capsicum-Extrakte enthalten. Eine Form dieser Extrakte stellen die „Oleoresine“ aus Paprika- oder Cayennepfeffer-Früchten dar. Sie werden mit heißem Aceton oder 90%igem Ethanol und anschließendem Vertreiben des Lösungsmittels durch Destillation hergestellt. Auch Perkolate, Ölmazerate und eine Tinktur finden Anwendung. Diese Zubereitungen enthalten Capsaicinoid-Konzentrationen von 0,02 bis 0,05g/100 g. In der Kosmetik werden Auszüge aus *Capsicum*-Arten in Haartonikas zur Stimulation der Haarfollikel eingesetzt (D'AMELIO, Sr., 1998).

Die Aufbereitungsmonographie "Paprika" der Kommission E bezieht sich nur auf die eher Capsaicin-arme Sorten von *Capsicum annuum*, also auf den "edelsüßen" Paprika und geht in der Monographie "Cayennepfeffer" auf die scharfen Sorten ein.

3.5.5 Unerwünschte Nebenwirkungen

Die ursprüngliche Annahme, dass bei einer längeren Anwendung mit einer Schädigung sensibler Nerven zu rechnen ist, ist widerlegt, so dass heute eine Anwendungsdauer von mehreren Tagen bis zu zwei Wochen toleriert werden kann. Äußerlich angewandt können Paprika-Zubereitungen jedoch in geringen Mengen die Schleimhäute sehr stark reizen und schmerzhaftes Brennen erzeugen. Ein Kontakt von Paprika-Zubereitungen mit Schleimhäuten und besonders den Augen ist daher zu vermeiden. Nur in seltenen Fällen treten allergische Überempfindlichkeitsreaktionen auf.

3.6 Berberitzenwurzelrinde – *Berberidis radices cortex*

3.6.1 Botanik und Drogengewinnung

Nach der Definition des homöopathischen Arzneibuchs (HAB 2006 „*Berberis vulgaris*“) besteht



Abb. B-24 *Berberis vulgaris* L. aus „Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz“ (1885)

Berberitzenwurzelrinde oder auch Sauerdornwurzelrinde (*Berberidis radices cortex*) aus getrockneten, unterirdischen Rindenteilen von *Berberis vulgaris* L., Familie der Berberidaceae. Bei der gewöhnlichen Berberitze handelt es sich um einen sommergrünen, dicht verzweigten Strauch, mit dreiteiligen Dornen, der Wuchshöhen von etwa 3 m erreicht. Die Zweige sind stark gefurcht, aus deren Achseln die obovat bis elliptischen und fein gezähnten Laubblätter entspringen. Die Rinde ist außen gelbbraun bis grau, innen leuchtend gelb, längs gestreift, oft blättrig zerfallen und hat einen charakteristisch herben Geruch. Die stark riechenden Blüten sind gelb und hängen in traubenförmigen Blütenständen an den Zweigen. Die reifen Früchte sind länglich, fleischig, scharlachrot, bis zu 12 mm lang und stark sauer. Die Berberitze wächst in der gemäßigten nördlichen Hemisphäre, vor allem in Europa, Nordafrika sowie in Teilen von Amerika und Mittelasien. Die Droge wird aus Wildbeständen gesammelt.

3.6.2 Inhaltsstoffe

In der Berberitzenwurzelrinde kommen bis zu 16 g/100 g Isochinolin-Alkaloide vor (Kap. B.2.11). Daneben wurden Gerbstoffe und ätherisches Öl in der Wurzel beschrieben (D'AMELIO, Sr., 1998). In den reifen Früchten sind keine Alkaloide enthalten, sondern ca. 3 g/100 g farbgebende Anthocyane und Phenolcarbonsäuren, ca. 7 g/100 g organische Säuren (z. B. Äpfelsäure und Ascorbinsäure) sowie Triterpensäuren, Mineralstoffe und Spurenelemente.

3.6.3 Arzneibuchanforderungen

Das Homöopathischen Arzneibuch (HAB 2006 „Berbis vulgaris“) fordert einen Mindestgehalt an Alkaloiden von 2,0 g/100 g in der getrockneten Droge, berechnet als Berberin.

3.6.4 Anwendungsgebiete

Zubereitungen aus Berberitzenwurzeln wurden von der Kommission E nicht positiv bewertet, dienen jedoch in der Homöopathie zur Behandlung von nervösen Magenbeschwerden, Gastritis, Meteorismus, bei undefinierten Krankheiten der Leber, Niere, Galle, Harnwege, sowie bei Hämorrhoiden und bei Rheuma. In der Kosmetik werden sie in Shampoos und Haarspülungen zugesetzt, um Strähnen in hellem Haar zu verstärken (D'AMELIO, Sr., 1998).

3.6.5 Unerwünschte Nebenwirkungen

Bei der Aufnahme höherer Dosen an Berberitzenwurzel-Extrakten muss mit leichter Benommenheit, Nasenbluten, Erbrechen, Diarrhoe, Nierenreizungen und evtl. Nephritis gerechnet werden. Akute Vergiftungen sind kaum zu befürchten, da etwa 2 g Droge so viel Berberin enthält, dass gerade die therapeutische Einzeldosis des Reinalkaloids erreicht wird (FROHNE und PFÄNDER, 1982).

4. OLIVENÖL

Olivenöl (*Olivae oleum*, Ph. Eur.) ist das aus den reifen Steinfrüchten von *Olea europaea* L. gewonnene fette Öl. Es wird heute in allen Zonen mit Winterfeuchte und trockenen, heißen Sommern kultiviert. Etwa 90% der Weltproduktion an Olivenöl stammen aus dem Mittelmeerraum (VISIOLI et al., 2001), wobei die Produktionsländer der Europäischen Union Italien, Spanien, Griechenland, Portugal und Frankreich ca. 76% der Weltproduktion erzeugen, was im Schnitt 2 Mio. t/Jahr Olivenöl sind (INFORMATIONSGEMEINSCHAFT OLIVENÖL, 2007).

Die Qualitätsanforderungen an Oliven- und Oliventresteröle, sowie deren Vermarktung in der Europäischen Union wird durch eine Vielzahl von europäischen sowie nationalen Verordnungen geregelt.

- **Native Olivenöle**
Öle, die aus der Frucht des Ölbaums ausschließlich durch mechanische oder sonstige physikalische Verfahren unter Bedingungen, die nicht zu einer Verschlechterung des Öls führen, gewonnen wurden und die keine andere Behandlung erfahren haben als Waschen, Dekantieren, Zentrifugieren und Filtrieren.
 - a) *Natives Olivenöl extra*
Gehalt an freien Fettsäuren (berechnet als Ölsäure) max. 0,8 %; Peroxidzahl (POZ) max. 20 meq O₂/kg; Wachsgehalt (Ester langkettiger Fettsäuren mit Fettalkoholen) max. 250 mg/kg; sensorisch mängelfrei und fruchtig
 - b) *Natives Olivenöl*
Gehalt an freien Fettsäuren max. 2,0 %; POZ max. 20 meq O₂/kg; Wachsgehalt max. 250 mg/kg; sensorisch nur geringe Abweichungen erlaubt und fruchtig
 - c) *Lampantöl*
Gehalt an freien Fettsäuren > 2,0 %; POZ max. 20 meq O₂/kg; Wachsgehalt max. 250 mg/kg; sensorisch geringe Mängel erlaubt, nicht fruchtig
- **Raffiniertes Olivenöl**
Durch Raffination von nativem Olivenöl gewonnenes Öl; Gehalt an freien Fettsäuren max. 0,3 %; POZ max. 5 meq O₂/kg
- **Olivenöl – bestehend aus raffiniertem Olivenöl und nativem Olivenöl**
Verschnitt von raffiniertem mit nativem Olivenöl, außer Lampantöl; Gehalt an freien Fettsäuren max. 1,0 %; POZ max. 5 meq O₂/kg
- **Rohes Oliventresteröl**
Öl aus Oliventrester, das durch Behandlung mit Lösungsmitteln (Hexan) oder auf physikalische Weise gewonnen wurde (zweite Zentrifugation bei höherer Temperatur) oder das Lampantöl entspricht, mit der Ausnahme von durch Wiederveresterungsverfahren gewonnene oder durch Mischung mit Ölen anderer Art gewonnene Öle; POZ max. 5 meq O₂/kg
- **Raffiniertes Oliventresteröl**
Durch Raffination von rohem Oliventresteröl gewonnenes Öl; Gehalt an freien Fettsäuren max. 0,3 %; POZ max. 20 meq O₂/kg
- **Oliventresteröl**
Verschnitt von raffiniertem Oliventresteröl mit nativem Olivenöl, außer Lampantöl; Gehalt an freien Fettsäuren max. 1,0 %; POZ max. 5 meq O₂/kg

Abb. B-25 Bezeichnungen und Definitionen für die einzelnen Olivenölkategorien

Darin sind verbindliche Bezeichnungen und Definitionen für einzelne Olivenölkategorien festgelegt (Abb. B-25). Sensorische Tests durch speziell geschulte Panels spielen dabei eine ebenso große Rolle wie die Bestimmung des oxidativen Zustandes des Öls durch Analyse der freien Fettsäuren oder der entstandenen Peroxide (Peroxidzahl bzw. spektrale Absorption bei 232 und 270 nm). Das Europäische Arzneibuch bezieht sich in den Monographien "Olivenöl" (Ph. Eur. 5.1 „Olivae oleum virginale“ Nr. 0518) und „Olivenöl, raffiniert“ (Ph. Eur. 5.4 „Olivae oleum raffinatum“ Nr. 1456) auf Olivenöle der Kategorie „Natives Olivenöl extra“ bzw. „raffiniertes Olivenöl“ gemäß dem europäischen Lebensmittelrecht.

Um Verfälschungen mit anderen Ölen zu erkennen, werden vom der Ph. Eur. verschiedene Reinheitsprüfungen verlangt. Diese beruhen vorwiegend auf den Regelungen der EU (Verordnung (EWG) Nr. 2568/1991 der Kommission vom 11. Juli 1991). Olivenöle weisen gemäß dem INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL (2006) die in Tab. B-3 aufgeführte durchschnittliche Fettsäurezusammensetzung auf. Zusätze an fremden Ölen werden nur erkannt, wenn deren Fettsäurezusammensetzung deutlich abweicht oder wenn diese ungewöhnliche Fettsäuren enthalten.

Tab. B-3 Durchschnittliche Zusammensetzung der Fettsäuren von Olivenölen gemäß dem INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL (2006) [fettgedruckte Werte sind rechtliche Höchstgrenzen]

Fettsäure	Durchschnittliche Zusammensetzung	Ph. Eur.
Myristinsäure	≤ 0,05 %	≤ 0,1 %
Palmitinsäure	7,5 - 20,0 %	7,5 - 20,0 %
Palmitoleinsäure	0,3 - 3,5 %	≤ 3,5 %
Hepatdecansäure	≤ 0,3 %	
Heptadecensäure	≤ 0,3 %	
Stearinsäure	0,5 - 5,0 %	0,5 - 5,0 %
Ölsäure	55,0 - 83,0 %	56,0 - 85,0 %
Linolsäure	3,5 - 21,0 %	3,5 - 20,0 %
Linolensäure	≤ 1,0 %	≤ 1,2 %
Arachinsäure	≤ 0,6 %	≤ 0,7 %
Eisosensäure	≤ 0,4 %	≤ 0,4 %
Behensäure	≤ 0,2 %	≤ 0,2 %
	(für Oliventresteröle ≤ 0,3 %)	
Lignocerinsäure	≤ 0,2 %	≤ 0,2 %

Das Vorkommen von trans-Isomeren der Öl-, Linol- und Linolensäure deutet auf eine thermische Belastung des Öls, z.B. durch Raffination oder Bleichung hin. Daher ist ihre Bestimmung ein Nachweis für derartige Verfahrensschritte. Bei der Bestimmung muss allerdings darauf geachtet werden, dass während der Analytik selbst keine trans-Fettsäuren gebildet werden. Ein weiteres Merkmal zur Identifizierung von reinen Olivenölen ist die Fettsäureverteilung der Triacylglycerole. In 2-Stellung werden bei der Biosynthese der Fette vorwiegend ungesättigte Fettsäuren eingebaut.

Ein Wert von mehr als 1,3 % gesättigten Fettsäuren in 2-Stellung am Glycerin deutet darauf hin, dass es sich nicht um ein reines Olivenöl handelt, sondern meist um so genannte Esteröle; dies sind aus Olivenölfettsäuren und Glycerin synthetisch hergestellte Öle.

Anhand der Sterolzusammensetzung lässt sich eine Vermischung erkennen. Native Olivenöle müssen einen Sterolgehalt von mindestens 1000 mg/kg aufweisen. Extrahierte Olivenöle besitzen einen deutlich höheren Sterolgehalt, dieser nimmt jedoch während der Raffination wieder ab. Um die rechtlichen Vorgaben einzuhalten, müssen Olivenöle die in Tab. B-4 aufgeführte Sterolzusammensetzung erfüllen. Die Zusammensetzung der Sterolfraktion ist für alle Olivenöle gleich und verändert sich während des Raffinationsprozesses nur bedingt, z.B. die Umlagerung von β -Sitosterol zu Stigmasta-3,5-dien. Für Letzter wurde ein Grenzwert von 0,15 mg/kg für native Olivenöle festgelegt, um native von raffinierten Ölen unterscheiden zu können.

Tab. B-4 Geforderte Zusammensetzung der Sterole um Verfälschungen mit anderen Ölen auszuschließen (Ph. Eur.)

Sterole	geforderter Anteil
Cholesterol	max. 0,5 %
Brassicasterol	max. 0,1 %
Campesterol	max. 4,0 %
Δ 7-Stigmasterol	max. 0,5 %
Summe aus Δ 5,23-Stigmasterol, Clerosterol, β -Sitosterol, Sitostanol, Δ 5-Avenasterol und Δ 5,24-Stigmastadienol	min. 93,0%

Bei der gaschromatographischen Bestimmung der Sterole werden in der Regel die Triterpenalkohole, insbesondere Erythrodiol und Uvaol (Kap. B.2.9) mit erfasst. Triterpenalkohole kommen in allen pflanzlichen Ölen vor und dienen bei der Untersuchung von Olivenölen zur Erkennung der Tresteröle, die Gehalte von mehr als 4,5 g/kg Triterpenalkohole aufweisen. Bei nativen oder raffinierten Olivenölen muss der Gehalt unter 4,5 g/kg liegen.

Neben diesen lebensmittelrechtlichen Regelungen verlangt das Ph. Eur. noch den Nachweis von Sesamöl (Abwesenheit von Sesamin).

Phenolische Verbindungen mit Gehalten zwischen 0,05 und 1,0 g/100 g sind wichtige Geschmacksträger von Olivenöl, die immer stärker in den Fokus der Chemoprävention rücken (BOSKOU, 2000; VISIOLI und GALLI, 1998). Dabei handelt es sich um Secoiridoide, Flavonoide, Phenolcarbonsäuren und Lignane. Da diese Stoffe hydrophil sind, gehen diese Verbindungen nur begrenzt aus dem Olivenfruchtfleisch ins Öl über. Zu den Secoiridoiden zählen Oleuropein und Ligstrosid. Oleuropein macht den bitter-scharfen Geschmack des Olivenöls aus (VISIOLI et al., 2001). Die Flavonoidaglyka sind vertreten durch Luteolin und Apigenin. An Phenolcarbonsäuren sind p-Hydroxyphenylethanol (Tyrosol), 3,4-Dihydroxyphenylethanol (Hydroxytyrosol), p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Syringasäure, Zimtsäure, p- und o-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure enthalten (MONTEDORO et al., 1992). Die Lignane sind vertreten durch Pinoresinol und 1-Acetoxypinoresinol (GOMEZ-ALONSO et al., 2002; MATEOS et al., 2003).

Die phenolischen Substanzen tragen zur Stabilität des Olivenöls, insbesondere zum Schutz vor oxidativen Veränderungen bei (GIMENO et al., 2002), ebenso wie die Tocopherole und Tocotrienole, die zu 115 bis 210 mg/kg vorkommen (SEPPANEN et al., 2003). Einen weiteren wichtigen Beitrag zum Geruch und Geschmack von Olivenöl liefern die Kohlenwasserstoffe, die in Olivenölen zwischen 1,25 und 7,5 g/kg enthalten sind. Hauptbestandteil der Kohlenwasserstoffe ist das für Olivenöle charakteristische Triterpen Squalen (MATEOS et al., 2003). Weitere Bestandteile sind C11- bis C32-n-Paraffine, aromatische Kohlenwasserstoffe, Naphthalin und dessen Derivate. Zusätzlich enthält Olivenöl in geringen Mengen freie und veresterte C27- bis C32-n-Alkohole. Für den arteigenen Geschmack und Geruch des Olivenöls sind Hexanal, Hexanol und Hexylacetat-Derivate, Nonanal und 2,4 Decadienal verantwortlich (FLAMINI et al., 2003; VICHI et al., 2003). Die gelblich-grüne Farbe nativer Öle sind auf Carotinoide, Chlorophylle und Phaeophytine zurückzuführen (SEPPANEN et al., 2003). Hauptvertreter der Carotinoide sind vor allem Lutein und β -Carotin, die in der Summe zwischen 0,5 bis 100 mg/kg im Öl enthalten sind (GIMENO et al., 2002; SU et al., 2002a). Der Gehalt an Chlorophyll bzw. an Phaeophytinen schwankt von 1 bis 10 mg/kg bzw. 0,2 bis 20 mg/kg (CICHELLI und PERTESANA, 2004). Bei der Raffination von Olivenölen gehen viele dieser sensorisch wichtigen Verbindungen verloren. Deshalb sind Carotinoide, Chlorophylle, Phaeophytine und phenolische Verbindungen, ebenso wie viele wasserdampfflüchtige Kohlenwasserstoffe in raffinierten Ölen nicht mehr nachweisbar (CICHELLI und PERTESANA, 2004; GIMENO et al., 2002; SU et al., 2002a).

Olivenöl wird pharmazeutisch zur Herstellung von Linimenten, Salben, Pflastern und Seifen und als Vehikel zur Herstellung öliger Lösungen und Suspensionen zur Injektion genutzt. Der therapeutische Einsatz beschränkt sich heute auf die Wundpflege, bei leichten Verbrennungen und bei Psoriasis, zum Erweichen von Krusten bei Ekzemen und als Massagegleitöl, in wässriger Emulsion bei Sonnenbrand und als Massageöl zur Rheumabehandlung (DE et al, 1992). In der Kosmetikindustrie wird Olivenöl als Fettgrundlage in Cremes und Salben verwendet (BEZBRADICA et al., 2005; DIEMUNSCH und MATHIS, 1980; HANGYA und KELEN, 2001; MIKHAILOVNINA und SAVINOV, 1950).



C. ERGEBNISSE

1. SESQUITERPENLACTONE AUS ARNIKABLÜTEN

1.1 Methodenentwicklung

Die Analytik der Sesquiterpenlactone lehnt sich an eine Methode an, welche von WILLUHN und LEVEN (1991) entwickelt wurde und Eingang ins europäische Arzneibuch fand (Ph. Eur. 5.0 „Arnicae Flos“, Nr. 1391). Zur massenspektrometrischen Identifizierung der einzelnen Verbindungen musste die Aufreinigung der Analysenlösung jedoch verfeinert werden. Zu diesem Zweck wurde die säulenchromatographische Aufreinigung an Aluminiumoxid durch eine Aufreinigung an Kieselgel ersetzt, um die Flavonoide nahezu quantitativ aus der Analysenlösung zu entfernen, die ansonsten bei der HPLC zusammen mit den zu untersuchenden Sesquiterpenlactonen eluieren würden.

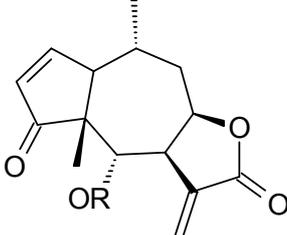
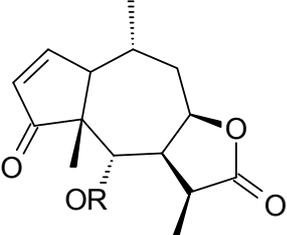
		
R = H	Helenalin	11,13-Dihydrohelenalin
R = Acetat	262.12	264.13
R = Methylacrylat	304.13	306.15
R = Isobutytrat	330.15	332.16
R = Tiglat	332.16	334.18
R = 2-Methyl-butytrat	344.16	346.18
R = Isovalerianat	344.16	346.18
	346.18	348.19

Abb. C-1 Sesquiterpenlactone in Arnikablüten und deren theoretische Molekülmassen

Spektralphotometrisch könnte man zwar die Flavonoide und Sesquiterpenlactone anhand ihrer unterschiedlichen UV-Spektren zwar voneinander unterscheiden, jedoch würden Peaküberlappungen eine korrekte Quantifizierung verhindern. In der massenspektrometrischen Detektion würde die bloße Menge an Verbindungen in der Untersuchungslösung das Grundrauschen deutlich erhöhen und damit die Empfindlichkeit erniedrigen. Auch konnte durch den Einsatz von Kieselgel einer Gefahr der Artefaktbildung durch das basisch reagierende Aluminiumoxid vorgebeugt werden.

Nach dem modifizierten Aufreinigungsschritt enthielt die Untersuchungslösung nur noch die zu analysierenden Sesquiterpenlactone (Abb. C-2). Die Identifizierung der einzelnen Peaks erfolgte massenspektrometrisch nach Elektrosprayionisation (ESI). Bei dieser Ionisierungsart kam es kaum zu Fragmentierungen der Moleküle und die detektierten Substanzen waren anhand ihrer Molekularmassen zu identifizieren. Bei der Aufnahme der ESI-Massenspektren im positiven Modus wurde das Analytmolekül protoniert. Dadurch war der Molpeak im Spektrum eine Masseinheit größer als das tatsächliche Molekulargewicht der Substanz $[(M+H)^+]$. Ein Vergleich der Molekularmassen aus Abb. C-1 mit den Spektren der einzelnen Sesquiterpenlactone zeigte, dass der Molpeak jedoch nicht den Basispeak im Spektrum darstellte. Es fiel auch auf, dass der Basispeak der Spektren immer um 18 Masseinheiten größer als die Molekularmasse der jeweiligen Substanz war. Dies ist auf Addukt-Bildung der detektierten Substanz mit ubiquitär vorkommenden Ammoniumionen (NH_4^+) zurückzuführen.

Mit Hilfe der Molekülmassen und anhand der Massenspektren der einzelnen Sesquiterpenlactone war es möglich, diese in der Droge eindeutig zu identifizieren. Bei Substanzen mit der gleichen Molekülmasse wurde die Elutionsreihenfolge durch Vergleich mit Literaturdaten festgelegt. Dadurch und mittels der UV-Spektren der Sesquiterpenlactone bei der photometrischen Detektion konnten alle Sesquiterpenlacton-Peaks im Chromatogramm zugeordnet und benannt werden (Abb. C-2, Tab. C-1 und Abb. H-2).

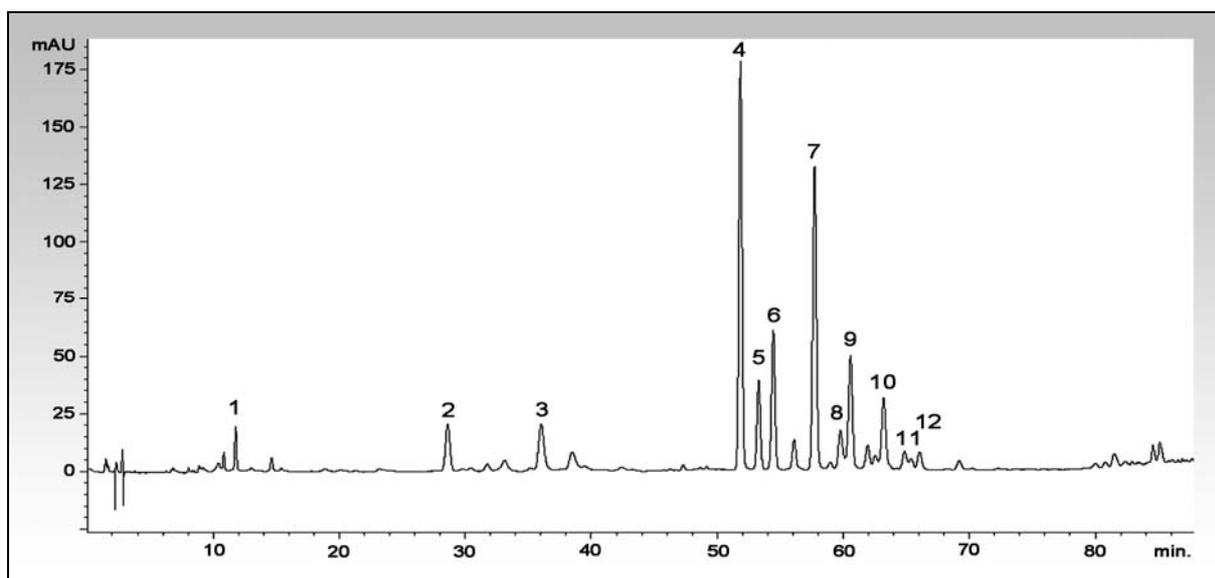


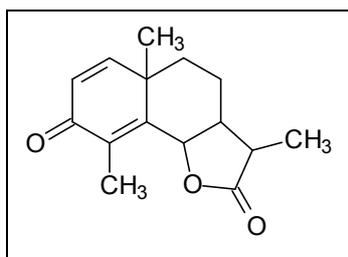
Abb. C-2 LC-DAD-Chromatogramm der Sesquiterpenlactone aus Arnikablüten (H: Helenalin, DH: Dihydrohelenalin) [Peakidentifizierung nach Tab. C-1]

Tab. C-1 Sesquiterpenlactone in Arnikablüten

Peak	Retentionzeit [min]	Identität	HPLC-UV/VIS Spektrum, λ_{\max} [nm]
1	11,7	Dihydrohelenalin	232
2	28,6	DH-acetat	231
3	36,0	H-acetat	214, 229sh
4	51,0	DH-Methacrylat	213, 230sh
5	53,3	DH-isobutyrat	230
6	54,4	H-methacrylat	212, 231
7	56,1	DH-tiglat	207sh, 222, 232sh
8	57,7	DH-methylcrotonat	214, 230sh
9	60,5	H-tiglat	219, 230sh
10	63,2	DH-isovalerianat	229
11	64,8	H-methylcrotonat	222, 230sh
12	66,0	H-isovalerianat	238

H: Helenalin, DH: Dihydrohelenalin

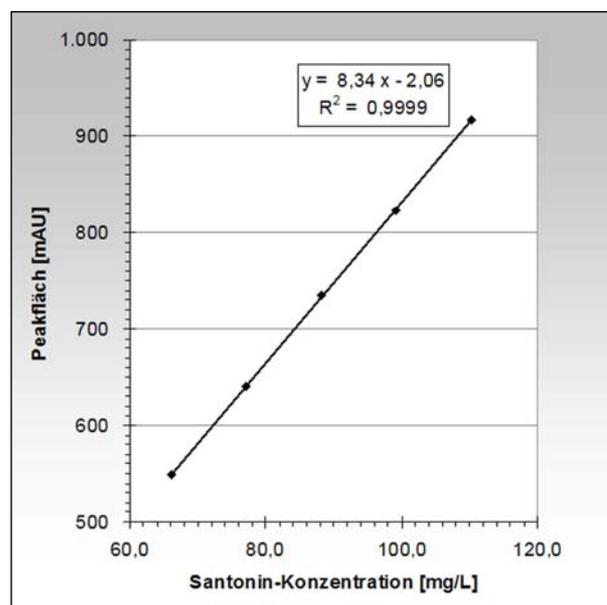
Die in den Arnikablüten identifizierten Sesquiterpenlactone sind in Tab. C-1 zusammengestellt. Da es sich um eine Droge spanischer Herkunft handelte, überwiegen die Dihydrohelenaline im analysierten Sesquiterpenlacton-Spektrum (siehe Kap. B.2.1.2) (WILLUHN und LEVEN, 1991).

**Abb. C-3 Strukturformel des ISTD Santonin**

Bei der Untersuchung der Ölauszüge musste das Öl vor der HPLC abgetrennt werden. Dazu wurde zu Beginn der Aufarbeitung ein Flüssig-Flüssig-Verteilungsschritt eingeführt. Der Ölauszug wird in Petrolether gelöst und mit Methanol (70%) extrahiert. Anschließend werden zur kompletten Entfernung aller Ölreste die vereinten methanolischen Phasen noch einmal mit Petrolether gewaschen. Um mögliche Verluste an Sesquiterpenlactonen während der aufwändigen Isolierung bzw. Aufreinigung zu kompensieren, wurde mit Santonin als internem Standard gearbeitet (Abb. C-3). Dabei handelt es sich um ein Sesquiterpenlacton, das im Retentionsverhalten und in Bezug auf die spektralen Eigenschaften den Sesquiterpenlactonen Helenalin und Dihydrohelenalin und deren Estern sehr ähnlich ist. Zunächst wurde mit Santonin eine Kalibriergerade erstellt (siehe Tab. H-1 und Abb. H-3), die in Abb. C-4 dargestellt ist und folgender Formel gehorchte:

$$y = 8,34 x - 2,06 \quad (R^2 = 0,9999)$$

Die Kalibriergerade war über den gesamten Bereich (66,1 bis 110,2 mg/L) linear auswertbar, wobei die Nachweisgrenze für Santonin bei 1,43 mg/L in der Messlösung lag und die Bestimmungsgrenze bei 5,46 mg/L. Zur Überprüfung, ob die Extraktions- und Bestimmungsmethode zur Analyse der Sesquiterpenlactone geeignet ist, wurde

**Abb. C-4 Kalibriergerade Santonin**

ca. 50 mg Standardsubstanz in 100 g Olivenöl eingewogen und anschließend auf die gleiche Weise bestimmt, wie die Ölauszüge. In einer Serie von vier Versuchen, von denen jedes Öl mindestens fünfmal aufgearbeitet und quantifiziert wurde, konnte die mittlere Wiederfindungsrate von Santonin zu $91,3 \pm 2,3$ % ($n = 23$) bestimmt werden (Tab. H-2). Damit ist die Methode geeignet zur Isolierung und Quantifizierung von Sesquiterpenlactonen aus Arnikablüten-Ölauszügen.

1.2 Quantitative Bestimmung der Sesquiterpenlactone in der Droge

Die Gehalte der einzelnen Sesquiterpenlactone in den Arnikablüten wurden durch Peakflächenvergleich ermittelt. Die unterschiedlichen molaren Absorptionskoeffizienten der einzelnen Sesquiterpenlactone wurden durch Korrekturfaktoren kompensiert, die von WILLUHN und LEVEN (1991) veröffentlicht wurden. Die Werte für die einzelnen Sesquiterpenlactone in den Arnikablüten sind in Tab. C-2 wiedergegeben. Die Summe der Sesquiterpenlactone in den Arnikablüten berechnet sich daraus zu 644 ± 15 mg/100 g Droge ($n = 6$). Damit erfüllt die Droge die Forderung des europäischen Arzneibuches (Ph. Eur. 5.0 „Arnicae Flos“, Nr. 1391), von mindestens 0,4 % Sesquiterpenlactone (= 400 mg/100 g) berechnet als Helenalin-tiglat. Auch stimmen die ermittelten Werte sehr gut mit den von WILLUHN et al. (1994) veröffentlichten Daten für Arnikablüten spanischer Herkunft überein. Die Autoren hatten in der Summe damals einen Gehalt von 670 mg/100 g ermittelt.

Tab. C-2 Ermittelte Sesquiterpenlacton-Gehalte der Arnikablüten (n=6)

Verbindung	Korrekturfaktor f_{Korr}	Sesquiterpenlacton-Konzentration [mg/100 g]	Standardabweichung [mg/100 g]	rel. Standardabweichung
Dihydrohelenalin	0,80	19,7	0,2	1,0%
DH-acetat	0,85	27,7	0,3	1,1%
H-acetat	1,00	12,6	0,2	1,9%
DH-methacrylat	1,23	330,9	7,7	2,3%
DH-isobutyrat	0,88	8,3	0,1	1,1%
H-methacrylat	1,25	27,3	1,2	4,3%
DH-tiglat	1,15	137,3	2,1	1,5%
DH-methylbutyrat	0,88	24,1	1,4	6,0%
H-tiglat	0,88	6,5	0,3	4,2%
DH-isovalerianat	1,15	44,6	1,0	2,3%
H-methylbutyrat	0,87	1,7	0,2	9,0%
H-isovalerianat	1,15	3,6	0,3	7,6%
Summe		644,3	14,9	2,3%

DH: Dihydrohelenalin, H: Helenalin

1.3 Übergangsrate der Sesquiterpenlactone in die Ölauszüge

Aus den ermittelten Werten (Tab. C-3) berechnet sich der Gehalt an Sesquiterpenlactonen in der Summe zu 52 ± 3 mg/100 g im Ölauszug W 10% ($n = 6$). Unter Berücksichtigung des Gehalts an Sesquiterpenlactonen in der Droge von 644 mg/100 g und des Droge-Extrakt-Verhältnisses (DEV) von 1:10 bei der Herstellung der Ölauszüge konnte die Übergangsrate der Sesquiterpenlactone aus der Droge in die Ölauszüge W 10% zu $81,2 \pm 1,0$ % ermittelt werden.

Tab. C-3 Ermittelte Sesquiterpenlacton-Gehalte im Ölauszug W 10% (n=6)

Verbindung	Sesquiterpenlacton-Konzentration [mg/100 g]	Standardabweichung [mg/100 g]	rel. Standardabweichung
Dihydrohelenalin	1,4	0,1	5,2%
DH-acetat	3,1	0,1	3,9%
H-acetat	- ¹	-	
DH-methacrylat	27,3	0,0	0,1%
DH-isobutyrat	0,8	0,0	2,6%
H-methacrylat	2,6	0,0	1,3%
DH-tiglat	11,8	2,4	2,1%
DH-methylbutyrat / H-tiglat	1,8	0,1	3,6%
DH-isovalerianat	3,4	0,1	1,8%
H-methylbutyrat	- ¹	-	
H-isovalerianat	0,2	0,0	7,6%
Summe	52,4	2,8	5,3%

¹ Wert unterhalb der Nachweisgrenze; DH: Dihydrohelenalin, H: Helenalin

Tab. C-4 Sesquiterpenlacton-Gehalte im Ölauszug H 10% (n=8)

Verbindung	Sesquiterpenlacton-Konzentration [mg/100 g]	Standardabweichung [mg/100 g]	rel. Standardabweichung
Dihydrohelenalin	0,7	0,0	0,7%
DH-acetat	2,4	0,0	0,1%
H-acetat	- ¹	-	
DH-methacrylat	23,8	0,1	0,4%
DH-isobutyrat	0,7	0,0	0,7%
H-methacrylat	2,7	0,0	0,4%
DH-tiglat	9,3	0,5	0,6%
DH-methylbutyrat	1,9	0,0	0,8%
H-tiglat	0,1	0,0	0,0%
DH-isovalerianat	3,7	0,1	2,1%
H-methylbutyrat	0,1	0,0	0,0%
H-isovalerianat	0,3	0,0	5,5%
Summe	45,7	0,8	1,7%

¹ Wert unterhalb der Nachweisgrenze; DH: Dihydrohelenalin, H: Helenalin

Der Gehalt an Sesquiterpenlactonen in den Ölauszügen H 10% berechnet sich aus den Werten nach Tab. C-4 in der Summe zu 46 ± 1 mg/100 g ($n = 8$). Unter Berücksichtigung des Gehaltes an Sesquiterpenlactonen in der Droge und des DEV von 1:10 errechnet sich die Übergangsrate zu $70,9 \pm 0,9$ %. In Abb. C-5 sind die Übergangsraten der Sesquiterpenlactone als Summe aus der Droge in die Ölauszüge dargestellt, wobei die Droge definitions-

gemäß zu 100% gesetzt wird. Über die Übergangsraten der Sesquiterpenlactone hinaus soll auch das Sesquiterpenlactonmuster in den Ölauszügen näher betrachtet werden. In Abb. C-6 sind die prozentualen Zusammensetzungen sowohl der Sesquiterpenlactone in der Droge als auch der beiden Ölauszüge dargestellt. Es ist daraus zu erkennen, dass die Sesquiterpenlactonmuster der Ölauszüge dem der Droge vergleichbar sind und dass auch die Muster der beiden Ölauszüge W 10% und H 10% nahezu gleich sind.

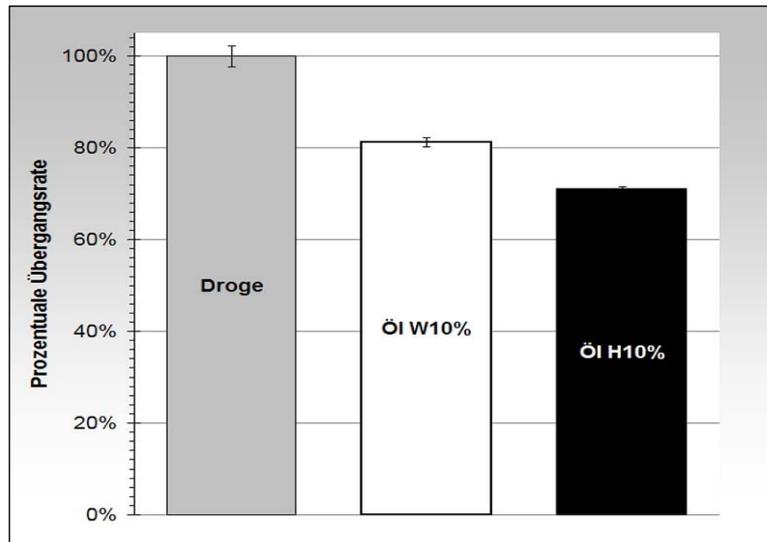


Abb. C-5 Prozentuale Übergangsraten der Sesquiterpenlactone aus Arnikablüten in die Ölauszüge (DEV 1:10)

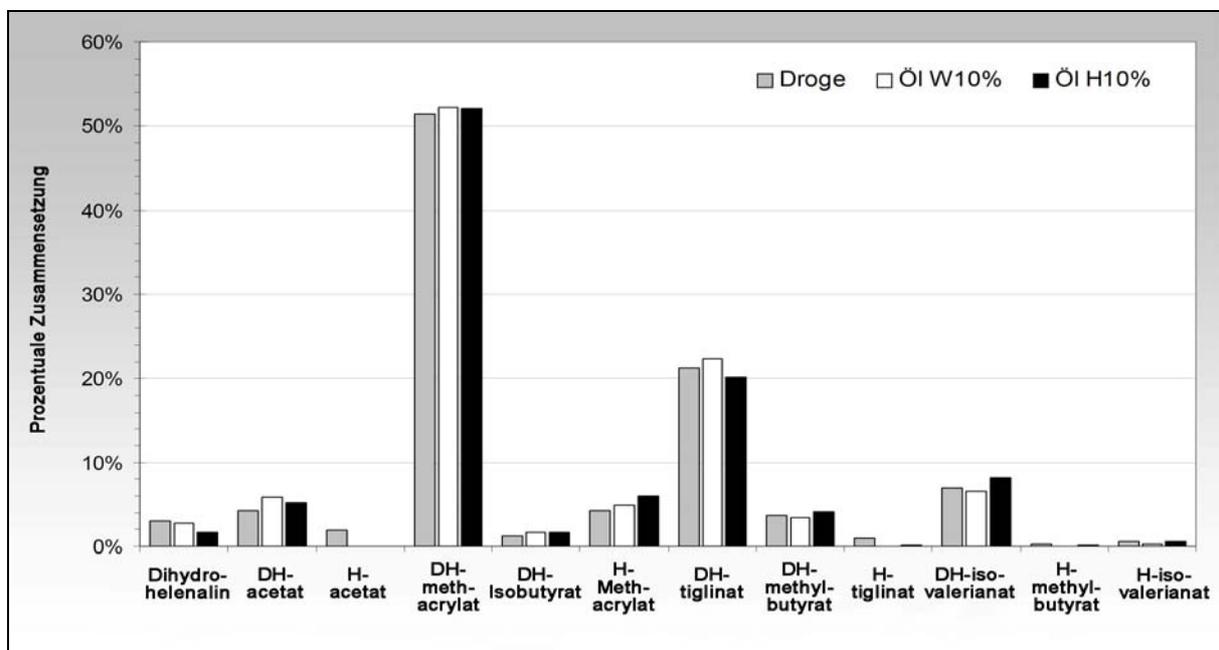


Abb. C-6 Prozentuale Zusammensetzung der Sesquiterpenlactone der Droge und der daraus hergestellten Ölauszüge W 10% und H 10% (Mittelwerte) [H: Helenalin; DH: Dihydrohelenalin]

2. ÄTHERISCHES ÖL AUS KAMILLENBLÜTEN

2.1 Methodenentwicklung

Die Untersuchung des Übergangs des ätherischen Öls aus den Kamillenblüten in die Ölauszüge betrifft zum einen die Menge an ätherischem Öl als solches, zum anderen die Übergangsraten der einzelnen Komponenten des ätherischen Öls. Der Gehalt an ätherischem Öl in der Droge wurde nach der Vorschrift des Europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur. 5.0 „Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls in Drogen“, Nr. 2.8.12) bestimmt, wobei es sich um eine Wasserdampfdestillation und eine volumetrische Messung des Öls, mit Xylol als Hilfsphase, handelte. Probleme bereitete diese Methode bei der Untersuchung der Ölauszüge wegen der fettigen Matrix. Die Fettschicht auf dem Destillationswasser verursachte in der Apparatur Siedeverzüge, so dass riesige Dampfblasen die Fettschicht durchschlugen, mit denen die Kühlung der Destillationsapparatur überfordert war. So verdampfte ein Großteil des ätherischen Öls aus der Öffnung über der Hilfsphase und verhinderte ein reproduzierbares Messen. Als einzig gangbarer Weg erwies sich die Destillation des Drogenrückstands der Ölauszug-Herstellung, d.h. die mit Öl erschöpfend extrahierten Kamillenblüten, die nach der Pressung nur noch geringe Mengen an Olivenöl enthielten. Der Gehalt an ätherischem Öl wurde also nicht direkt in den Ölauszügen ermittelt, sondern indirekt, indem der Gehalt in den Kamillenblüten-Rückständen bestimmt wurde. Dieser Weg basiert auf der Annahme, dass während der Herstellung der Ölauszüge kein ätherisches Öl verloren gehen kann, so dass die Differenz zwischen ätherischem Ölgehalt in der Droge und dem Gehalt im Drogenrückstand als übergegangener Anteil genommen werden konnte.

Weiterhin wurden wiederum die Komponentenmuster der Ölauszüge analysiert und mit dem der Droge verglichen. Dies erfolgte gaschromatographisch, wobei auch hier nur die Zusammensetzung der ätherischen Öle der Pressrückstände und nicht der Ölauszüge selbst analysiert werden konnten. Zusätzlich wurde versucht, das ätherische Öl aus den Ölauszügen zu isolieren und zwar nach Verseifen zusammen mit dem unverseifbaren Anteil. Die Frage, ob das ätherische Öl aus Kamillenblüten die Verseifung mit 2 M Kalilauge unbeschadet übersteht, sollte zuvor geklärt werden.

2.2 Bestimmung des Gehalt an ätherischem Öl in der Droge

Die quantitative Bestimmung des Gehaltes an ätherischem Öl der Kamillenblüten erfolgte nach den Vorgaben des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur. 5.0 „Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls in Drogen“, Nr. 2.8.12) unter Verwendung von 0,5 mL Xylol als Hilfsphase und einer Destillationsdauer von vier Stunden. Vor der eigentlichen Untersuchung wurde noch der Blindwert der beiden verwendeten Destillationsapparaturen unter diesen Destillationsbedingungen ermittelt (Tab. H-3). Nach dreimaliger Destillation konnte der mittlere Blindwert beider Apparaturen zu 0,03 mL bestimmt werden. Aus vier Destillationsansätzen der Kamillenblüten berechnete sich der Gehalt an ätherischem Öl zu $4,63 \pm 0,05$ mL/kg (Tab. H-4). Die verwendeten Kamillenblüten entsprachen damit den Forderungen des Ph. Eur. nach einem ätherischen Öl-Gehalt von mindestens 4,0 mL/kg.

2.3 Übergangsrate des ätherischen Öls in die Ölauszüge

Zur Bestimmung des Gehaltes an ätherischem Öl in den Pressrückständen wurden vier Ölauszüge hergestellt und analysiert. Unmittelbar nach der Herstellung der Ölauszüge wurden die mit Olivenöl ausgezogenen und abgepressten Kamillenblüten zur quantitativen Bestimmung des ätherischen Ölgehaltes einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Aus den ermittelten Werten (Tab. H-5) berechnete sich der Gehalt an ätherischem Öl in den Pressrückständen der Ölauszüge W 10% im Mittel zu $0,75 \pm 0,06$ mL/kg. Unter Zugrundelegung eines Gehaltes an ätherischem Öl in der Droge von $4,63$ mL/kg, bedeutet dies, dass mit $3,88 \pm 0,11$ mL/kg ätherisches Öl in die Ölauszüge W 10% übergegangen ist. Die Übergangsrate des ätherischen Öls berechnet sich daraus zu $83,8 \pm 2,4$ %, was bedeutet, dass ein Großteil des ätherischen Öls aus der Droge in die Ölauszüge W 10% übergegangen ist.

Der Gehalt an ätherischem Öl in den Pressrückständen der Herstellung der Ölauszüge H 10% wurde im Mittel zu $0,95 \pm 0,06$ mL/kg bestimmt (Tab. H-6). Damit berechnet sich der Gehalt an ätherischem Öl in den Ölauszügen H 10% zu $3,68 \pm 0,11$ mL/kg und die Übergangsrate an ätherischem Öl aus der Droge in die Ölauszüge H 10% zu $79,5 \pm 2,4$ %.

In Abb. C-7 sind die Übergangsraten des ätherischen Öls aus der Droge in die Ölauszüge dargestellt, wobei die Droge definitionsgemäß zu 100% gesetzt wird.

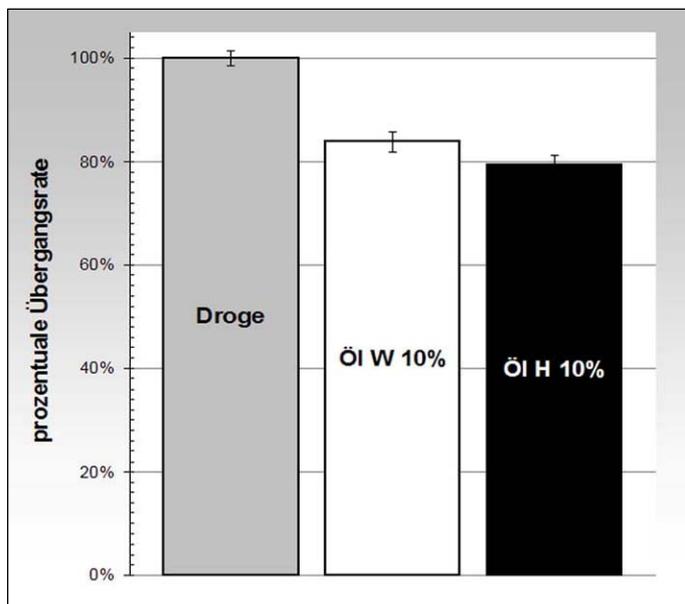


Abb. C-7 Übergangsrate des ätherischen Öls aus den Kamillenblüten in die Ölauszüge (DEV 1:10)

2.4 Zusammensetzung des ätherischen Öls

Das Wasserdampfdestillat der verwendeten Kamillen-Droge wurde mittels GC-MS untersucht, um alle Peaks im Chromatogramm identifizieren zu können. Unter Zuhilfenahme spezieller Auswertesoftware (Masslib und Massfinder) und umfangreicher kommerzieller, wie auch an der Universität Hamburg erstellter Massenspektren-Datenbanken (z.B. NIST 05, NIST MS/MS, Wiley 4th Ed.) und durch Vergleich mit Literaturdaten konnten nahezu alle Peaks im Chromatogramm des ätherischen Öls (Abb. C-8) identifiziert werden. In Tab. C-5 sind neben den Namen der Komponenten des ätherischen Öls auch die Hauptfragmente des Massenspektrums dargestellt. Wenn das Massenspektrum den Molekülpeak enthält, so ist dieser mit „(m)“ gekennzeichnet. In jedem Massenspektrum ist darüber hinaus noch der größte Massenpeak, der Basispeak „(b)“ gesondert markiert. Mit Hilfe der Scannummern der Verbindungen und einem Alkanstandard, der unter denselben Bedingungen wie das ätherische Öl chromatographiert wurde, konnten die aufgeführten Retentionsindizes errechnet werden. Diese erleichterten die Identifizierung und sicherten das Ergebnis der Datenbankabfragen zusätzlich ab.

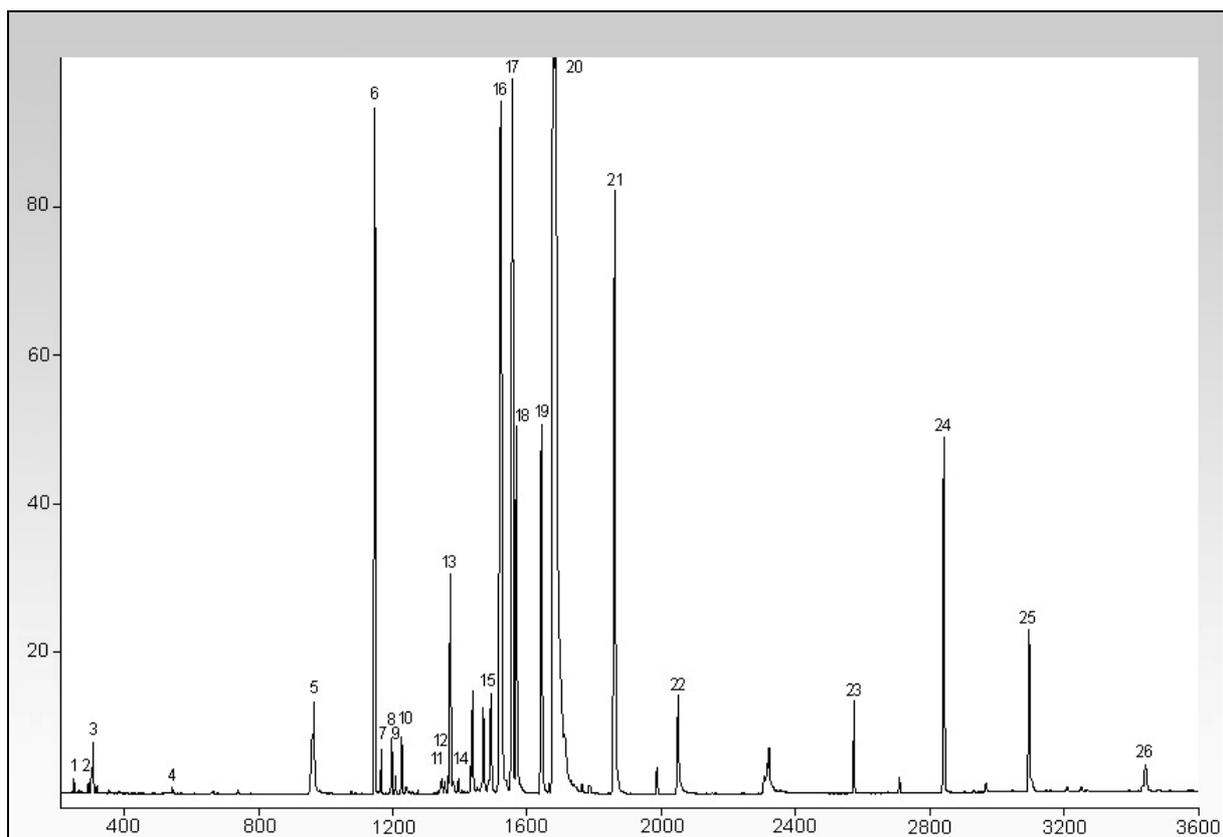


Abb. C-8 GC-MS-Chromatogramm (TIC) des ätherischen Öls aus Kamillenblüten

Tab. C-5 Identifizierte Verbindungen des ätherischen Öls aus Kamillenblüten

Peak	Name	m/z	Scan-Nummer	RT-Index
1	p-Cymen	134(m), 119 (b), 91	250	1015
2	E-β-Ocimen	121, 105, 93 (b), 91, 79	294	1039
3	Artemisiaketone	83 (b), 69, 55	304	1044
4	Terpinen-4-ol	111,93, 71 (b)	543	1166
5	n-Dodecansäure	172, 129, 115, 101, 87, 73, 60 (b)	962	1363
6	E-β-Farnesen	204, 161, 133, 120, 107, 93, 69 (b)	1145	1452
7	Dehydrosesquicineol	137, 127, 119, 109, 94, 79, 69, 43 (b)	1164	1462
8	Germacren D	204 (m), 161, 133, 119, 105, 91 (b), 81	1197	1478
9	γ-Humulene	204 (m), 189, 161, 147, 133, 119, 105, 91, 79, 41 (b)	1207	1483
10	Bicyclogermacren	204 (m), 189, 161, 136, 121, 107, 93 (b), 79	1227	1493
11	E-Nerolidol	161, 136, 131, 107, 93, 69, 41 (b)	1345	1554
12	3E,7E-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen	175, 107, 93, 81, 69 (b), 53	1365	1564
13	Spathulenol	220 (m), 205, 187, 177, 159, 147, 131, 119, 105, 91, 79, 69, 55, 43 (b)	1371	1567
14	4(14)-Salvialen-1-on	177, 123 (b), 107, 91, 81, 67	1397	1580
15	T-Cadinol	204, 189, 161 (b), 134, 119, 105, 91, 81	1491	1630
16	Bisabololoxid B	238 (m), 220, 205, 179, 161, 143 (b), 134, 125, 119, 105, 93, 85	1520	1646
17	Bisabolonoxid	236 (m), 200, 179, 150, 141, 134, 121, 107, 93 (b), 79, 67	1556	1665
18	α-Bisabolol	204, 161, 109, 93, 79, 69 (b)	1568	1672
19	Chamazulen (aus Matricin)	184 (m), 169 (b), 155, 141, 128, 115	1641	1712
20	Bisabololoxid A	220, 143 (b), 132, 125, 107, 93, 79, 68	1689	1739
21	cis-Spiroether	200 (m, b), 185, 170, 157, 141, 128, 115, 102, 76, 55, 50	1861	1839
22	n-Hexadecansäure	256 (m), 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143, 115, 97, 83, 73, 56	2051	1955
23	2,3-Dimethyl-heptadecan	183, 169, 155, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57, 43 (b)	2575	2250
24	n-Pentacosan	267, 211, 197, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57 (b), 43	2842	2408
25	n-Heptacosan	211, 197, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57 (b), 43	3098	2558
26	n-Triacontan	155, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57, 43(b)	3440	2778

RT: Retention, (m): Molekülpeak, (b): Basispeak

Tab. C-6 Gemittelte Peakflächen und prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Ausgangsdroge (n=4)

	Gemittelte Peakfläche [mAU]	Gemittelter prozentualer Peakflächenanteil [%]	rel. Standardabweichung [%]
Artemisiaketon	3.325,2	0,7	0,00
Dodecansäure	8.905,4	1,7	0,02
Farnesen	28.497,4	5,5	0,05
Spathulenol	7.895,0	1,6	0,02
Bisabolonoxid	73.008,5	14,2	0,13
Bisabolol	37.673,4	7,4	0,07
Chamazulen	10.993,1	2,2	0,03
Bisabololoxid A	239.737,0	46,4	0,08
cis-Spiroether	37.406,4	7,3	0,08

Die verwendeten Kamillenblüten stammen aus Ägypten, wo vor allem zwei unterschiedliche Kamillen-Chemodeme kultiviert werden (Tab. B-2). Die Hauptkomponente des untersuchten ätherischen Öls ist Bisabololoxid A, somit es handelt sich um Kamillenblüten des Bisabololoxid A-reichen Typs. Daneben konnte auch Chamazulen eindeutig identifiziert werden. Das bedeutet, dass in der verwendeten Droge ursprünglich Matricin enthalten war, das sich wegen der Wärmeeinwirkung während der Wasserdampfdestillation in das blaue Chamazulen umwandelt.

2.5 Verseifung des ätherischen Öls von Kamillenblüten

Zur Klärung der Frage, ob das ätherische Kamillenöl ohne Veränderung verseifbar ist, wurde das aus der Ausgangsdroge mittels Wasserdampfdestillation isolierte ätherische Öl verseift und mit dem unverseifbaren Anteil isoliert. Das Gaschromatogramm ist in Abb. C-10 dargestellt; zum Vergleich ein unverseiftes Öl in Abb. C-9. Dabei fällt auf, dass im Chromatogramm des verseiften ätherischen Öls, vor allem zwischen 10 und 12 bzw. 17 und 19 min, einzelne Substanzen eluieren, die im unverseiften Öl nicht detektiert werden konnten. Diese stammen, wie sich herausstellte, aus den Reagenzien, die zur Verseifung verwendet wurden (Blindwert). Auch einige Komponenten des ätherischen Öls, wie z.B. n-Dodecansäure (5) gehen bei der Verseifung verloren oder werden von Störpeaks überdeckt. Ansonsten weisen die Chromatogramme beider Aufarbeitungen dasselbe Komponentenmuster auf, woraus zu schließen ist, dass die Hauptkomponenten die Verseifung unbeschadet überstehen, sodass die Verseifung zur Isolierung des ätherischen Öls aus den Ölauszügen herangezogen werden konnte.

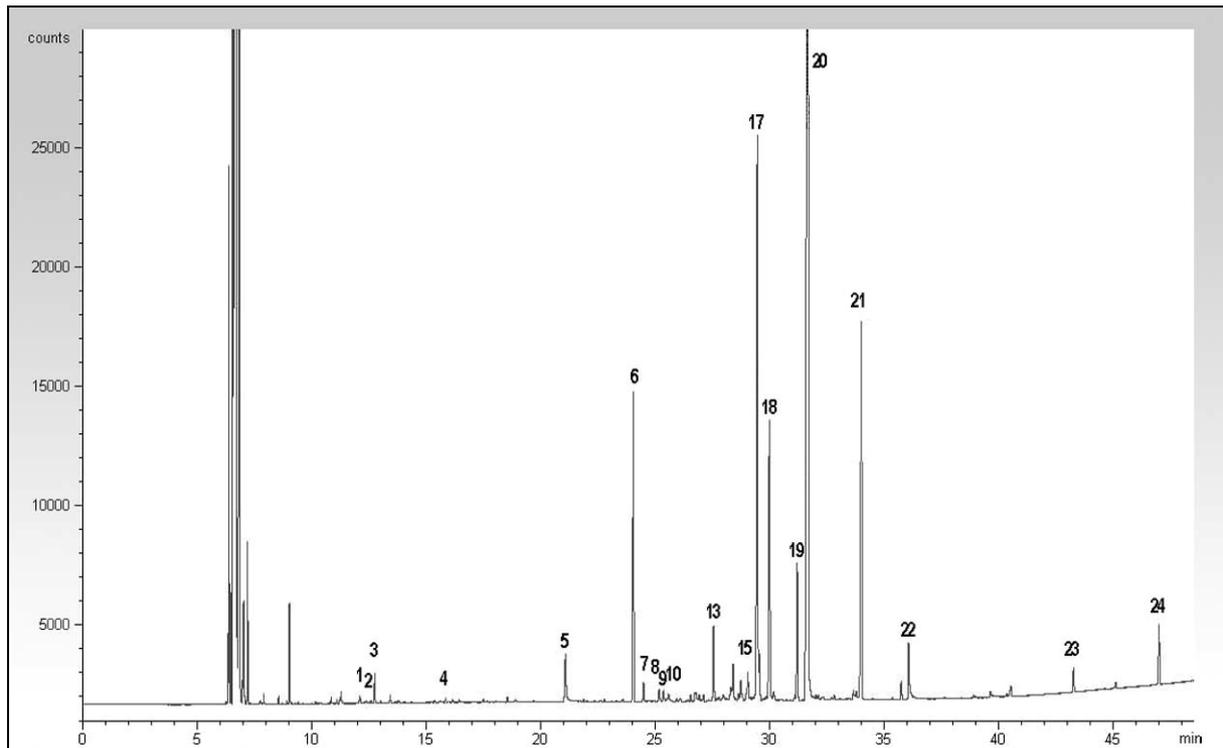


Abb. C-9 GC-FID Chromatogramm des isolierten ätherischen Öls aus Kamillenblüten vor der Verseifung [Peakbenennung nach Tab. C-5]

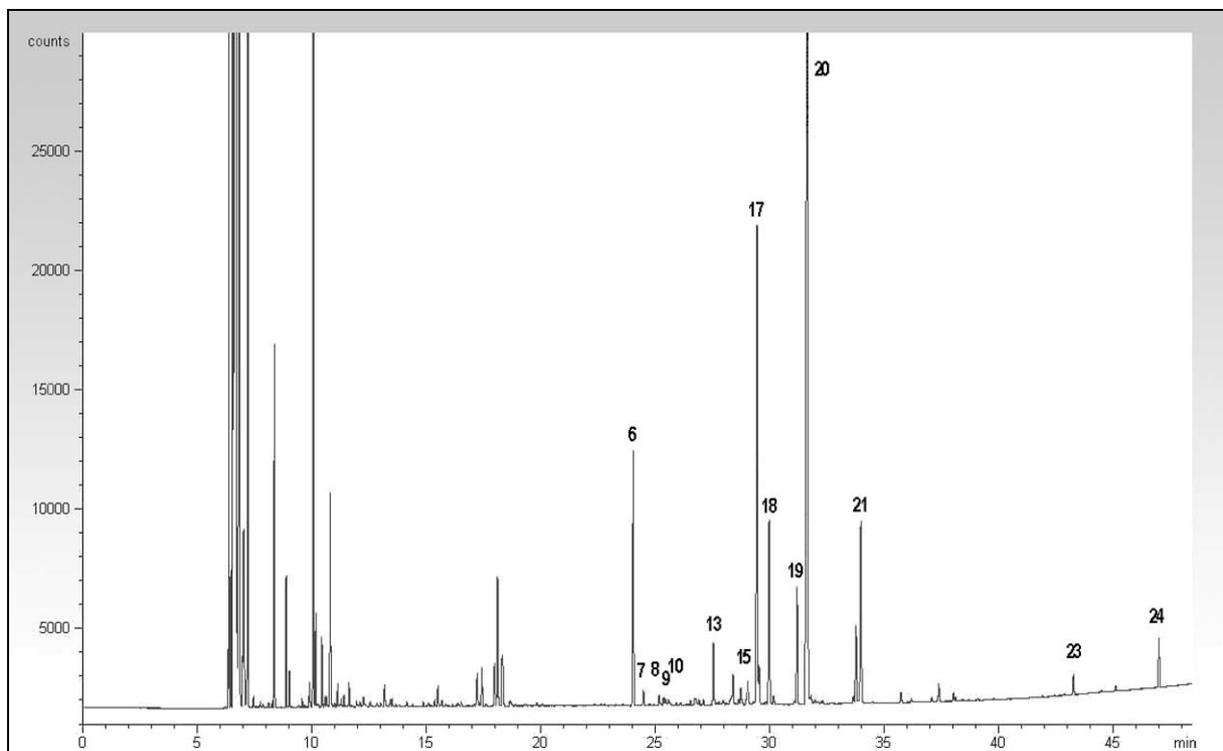


Abb. C-10 GC-FID Chromatogramm des isolierten ätherischen Öls aus Kamillenblüten nach der Verseifung [Peakbenennung nach Tab. C-5]

2.6 Zusammensetzung des ätherischen Öls in den Pressrückständen

Die Berechnung der Übergangsraten einzelner Komponenten des ätherischen Öls beschränkt sich auf die Hauptkomponenten, d.h. auf Komponenten, die zu über 1 % im ätherischen Öl enthalten sind. Den Prozentangaben in Tab. C-7 und Tab. C-8 liegen die bei der Integration der Chromatogramme nach der 100% Methode ermittelten Peakflächenprozente zugrunde. Das ätherische Öl des Pressrückstands des Ölauszugs W 10% ist fast deckungsgleich mit dem ätherischen Öl aus der Droge. Daraus kann abgeleitet werden, dass es während der Herstellung des Ölauszugs W 10% zu keiner Diskriminierung einzelner Komponenten kommt und die Herstellungsbedingungen des Ölauszugs W 10% keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des ätherischen Öls nehmen.

Tab. C-7 Gemittelte Peakflächen und prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Pressrückständen der Herstellung des Ölauszugs W 10% (n=3)

	Gemittelte Peakfläche [mAU]	Gemittelter prozentualer Peakflächenanteil [%]	rel. Standardabweichung [%]
Artemisiaketon	3.217,0	0,7	0,00
Dodecansäure	9.051,1	1,9	0,13
Farnesen	28.429,2	5,7	0,01
Spathulenol	7.378,5	1,5	0,00
Bisabolonoxid	70.599,2	14,2	0,01
Bisabolol	36.552,5	7,5	0,01
Chamazulen	11.702,8	2,3	0,01
Bisabololoxid A	226.987,5	45,7	0,33
cis-Spiroether	34.037,4	6,9	0,02

Tab. C-8 Gemittelte Peakflächen und prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Pressrückständen der Herstellung des Ölauszugs H 10% (n=3)

	Gemittelte Peakfläche [mAU]	Gemittelter prozentualer Peakflächenanteil [%]	rel. Standardabweichung [%]
Artemisiaketon	4.589,7	0,8	0,01
Dodecansäure	2.180,5	0,6	0,38
Farnesen	123.076,0	21,2	0,06
Spathulenol	18.407,9	3,1	0,16
Bisabolonoxid	70.438,7	12,0	0,16
Bisabolol	55.406,4	9,2	0,56
Chamazulen	26.042,0	4,3	0,24
Bisabololoxid A	61.325,6	10,8	0,26
cis-Spiroether	10.335,0	1,6	0,28

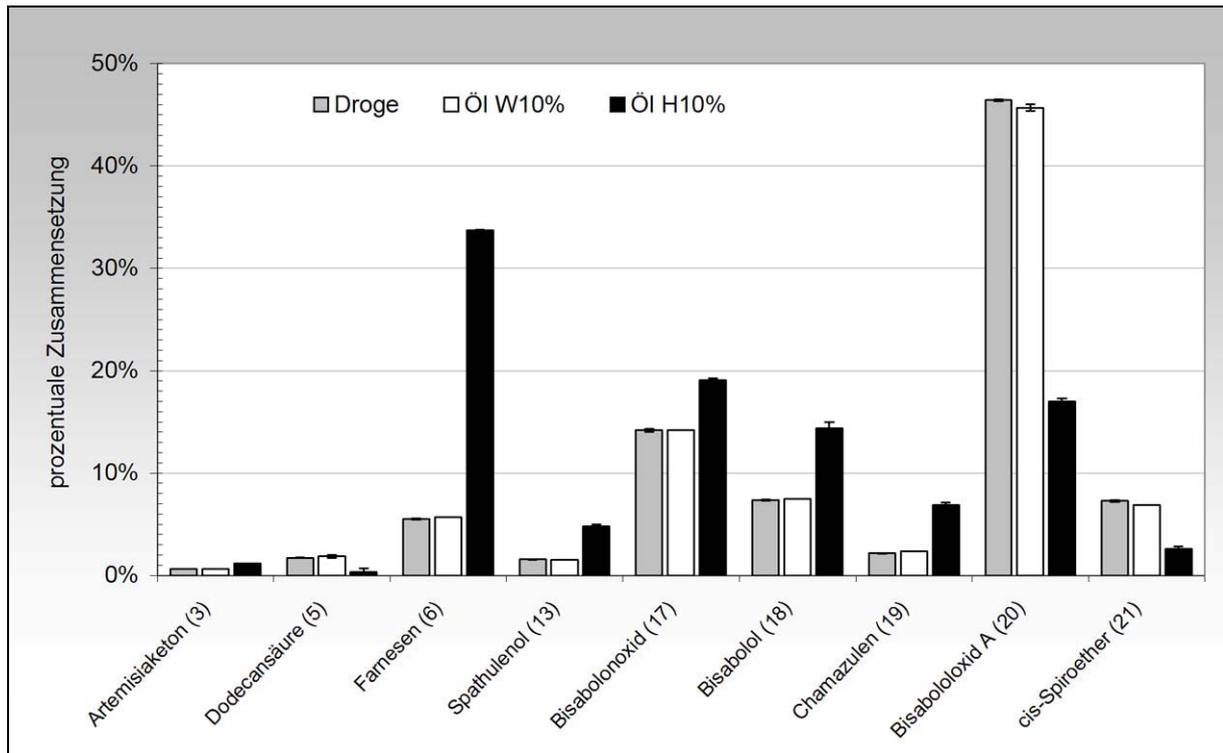


Abb. C-11 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Droge und der Pressrückstände

Die Zusammensetzung des ätherischen Öls des Ölauszugs H 10% unterscheidet sich gravierend von der des ätherischen Öls der Droge (Abb. C-11). Insbesondere die prozentualen Gehalte der Hauptkomponenten Bisabololoxid A (17) und Farnesen (6) verändern sich stark und zwar in der Weise, dass in dem Maße, in dem Bisabololoxid A prozentual abnimmt, Farnesen prozentual zunimmt. Eine Umwandlung von Bisabololoxid A in Farnesen ist nicht vorstellbar. Betrachtet man die absoluten Werte in Tab. C-8, wird deutlich, dass die prozentuale Veränderung im Wesentlichen auf einem starken Verlust an Bisabololoxid A beruht. Für diese deutliche Veränderung der Zusammensetzung ist vermutlich der pH-Wert verantwortlich. Durch die hohe thermische Belastung des Olivenöls während der Mazeration werden aus den Triglyceriden Fettsäuren frei, die den pH-Wert des Extraktionsansatzes senken, was tatsächlich messbar war. Der Destillationsansatz der Droge und der Pressrückstände der Ölauszüge W 10% hatte einen pH-Wert von 5-6, die der Ölauszüge H 10% jedoch einen pH-Wert von 4-5. In weiteren Experimenten wurden Kamillenblüten unter verschiedenen pH-Werten des Destillationswassers der Wasserdampfdestillation unterworfen und im Anschluss die Zusammensetzung des ätherischen Öls mittels GC untersucht. Hierbei konnte zwar nicht die in den Pressrückständen der Ölauszüge H 10% gefundene Muster reproduziert werden, jedoch zeigte sich, dokumentiert in Abb. C-12, dass sich die Zusammensetzung des ätherischen Öls stark mit dem pH-Wert des Destillationswassers verändert.

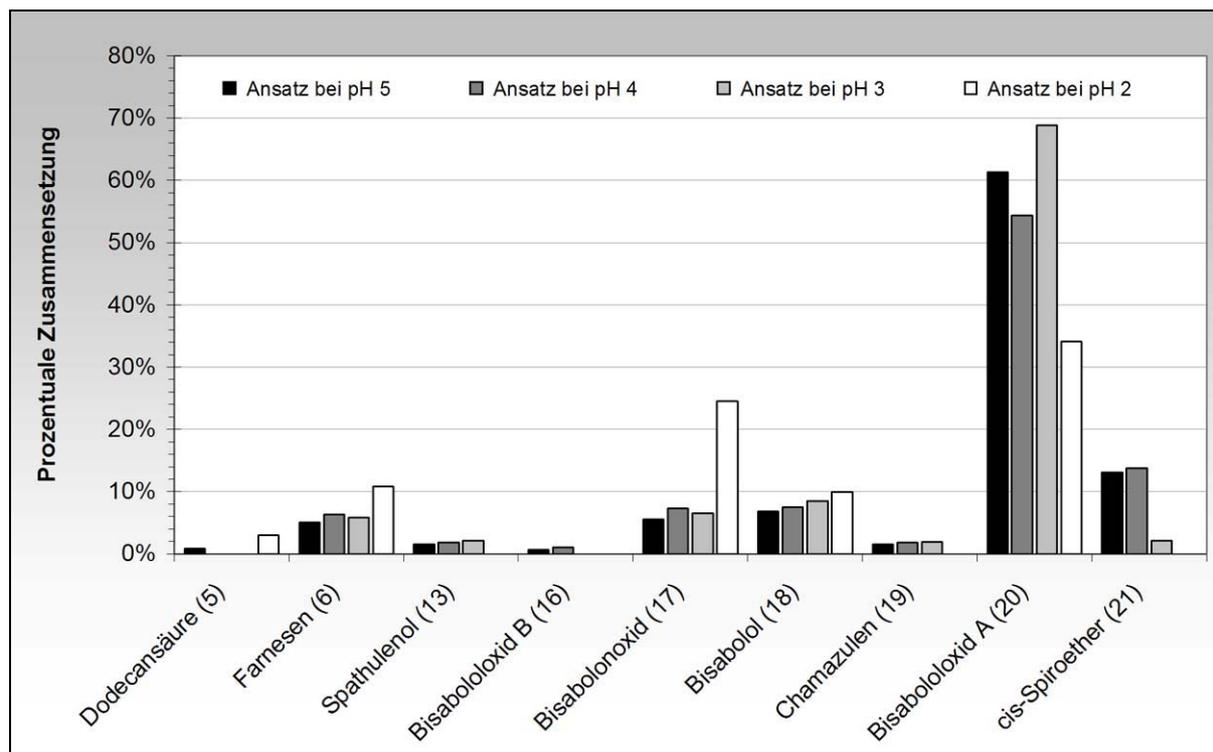


Abb. C-12 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Droge destilliert bei unterschiedlichen pH-Werten

2.7 Zusammensetzung des ätherischen Öls nach Verseifen der Ölauszüge

Bei allen Überlegungen blieb bislang unbedacht, dass nur die Zusammensetzungen der ätherischen Öle der Pressrückstände untersucht wurden, die zwar im Vergleich zum Öl der Droge verändert sein können, was aber nicht bedeutet, dass auch die ätherisch-Öl-Zusammensetzung in den Ölauszügen verändert ist. Deshalb wurden die ätherischen Öle der Ölauszüge direkt untersucht und zwar durch Isolierung nach Verseifung der Fettgrundlage, die, wie vorher beschrieben, keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des ätherischen Öls hat (Kap. C.2.5). Abb. C-13 zeigt neben dem ätherischen Öl der Droge, das direkt durch Wasserdampfdestillation aus der Droge gewonnen wurde, die ätherischen Öle der beiden Ölauszüge, wie sie nach Verseifen der Ölmatrix isoliert wurden. Die zugrunde liegenden Daten sind in Tab. C-9 und Tab. C-10 aufgeführt.

Tab. C-9 Gemittelte Peakflächen und prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Ölauszügen W 10% nach Verseifung (n=3)

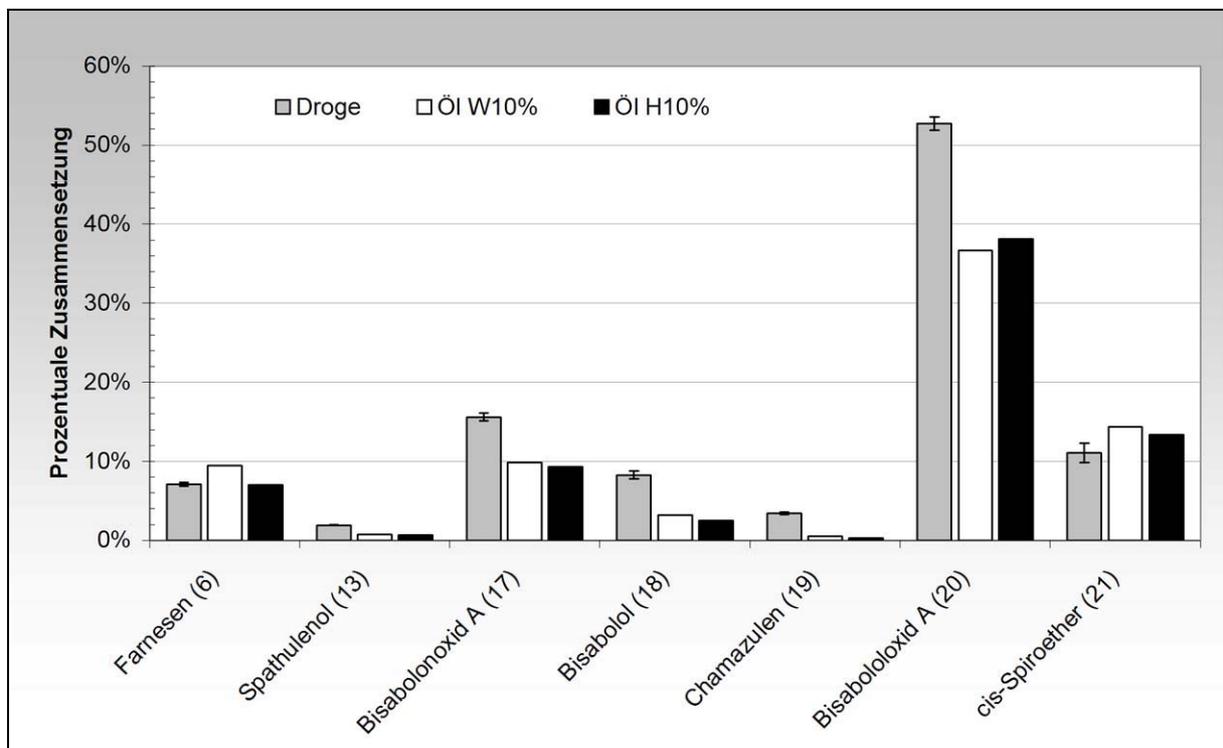
	Gemittelte Peakfläche [mAU]	Gemittelter prozentualer Peakflächenanteil [%]	rel. Standardabweichung [%]
Farnesen	5.684,6	9,5	0,24
Spathulenol	445,4	0,8	0,01
Bisabolonoxid	5.555,6	9,9	0,15
Bisabolol	2.061,6	3,2	0,04
Chamazulen	326,0	0,5	0,10
Bisabololoxid A	20.751,0	36,7	0,22
cis-Spiroether	9.839,8	14,3	0,08

Tab. C-10 Gemittelte Peakflächen und prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Ölauszügen H 10% nach Verseifung (n=3)

	Gemittelte Peakfläche [mAU]	Gemittelter prozentualer Peakflächenanteil [%]	rel. Standardabweichung [%]
Farnesen	2.793,9	7,0	0,47
Spathulenol	436,7	0,7	0,04
Bisablonoxid A	6.046,2	9,3	0,56
Bisabolol	1.719,5	2,5	0,00
Chamazulen	147,4	0,3	0,05
Bisabololoxid A	25.369,4	38,1	0,72
cis-Spiroether	10.083,8	13,4	0,31

Die ätherischen Öle beider Ölauszüge unterscheiden sich nur geringfügig, jedoch weichen sie in ihrer Zusammensetzung deutlich vom ätherischen Öl der Droge ab (Abb. C-13). Dies wird vor allem am Gehalt an Chamazulen deutlich, das im Wasserdampfdestillat der Droge vorhanden ist, im ätherischen Öl der Ölauszüge naturgemäß, da es sich um Extrakte handelt, fehlt.

In der Ähnlichkeit der ätherischen Ölmuster der beiden Ölauszüge kommt zum Ausdruck, dass es, trotz unterschiedlicher Herstellungsparameter, zu keiner Diskriminierung einzelner Komponenten beim Übergang aus der Droge in die Ölauszüge kommt. Die indirekte Analyse des ätherischen Öls über den Umweg des Pressrückstands, ist demnach nur zur Bestimmung der Übergangsrate des ätherischen Öls brauchbar, nicht jedoch zur Untersuchung des ätherischen Ölmusters.

**Abb. C-13 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Droge und der Ölauszüge nach Verseifen**

3. PHENOLISCHE KOMPONENTEN AUS KAMILLENBLÜTEN

3.1 Methodenentwicklung

Die phenolischen Komponenten der Kamillenblüten beinhalten Cumarine, Phenolcarbonsäuren und Flavonoide. Die drei Stoffgruppen werden in diesem Kapitel gemeinsam besprochen, da sie analytisch auch gemeinsam erfasst wurden. Zur Berechnung der Übergangsraten dieser Verbindungen wurde neben einer angemessenen Isolierung auch eine HPLC-Methode entwickelt. Bei der Isolierung musste einerseits die gesamte Breite der phenolischen Verbindungen aus den Kamillenblüten, die sich über einen großen Polaritätsbereich erstrecken, erfasst werden. Andererseits sollte eine Aufreinigung des Extraktes erfolgen, um Störsignale im HPLC-Chromatogramm zu minimieren.

Für die Identifizierung einzelner phenolischer Komponenten wurde zunächst die Trennung eines methanolischen Extrakts der Kamillenblüten an einer konventionellen HPLC-Anlage mit einer RP18-Trennsäule und einem Dioden-Array-Detektor (DAD) optimiert. Die Parameter wurden dann auf eine LC-MS-Anlage mit Electrospray-Ionisation (ESI) transferiert und die einzelnen Peaks anhand ihrer Masse identifiziert. In den Abbildungen im Anhang (Abb. H-4 bis Abb. H-26) sind die Chromatogramme der UV/VIS-Detektion bei einer Wellenlänge von 320 nm und synchron die der MS-Detektion, die jeweils einen bestimmten Massenbereich abdecken, dargestellt. Da es sich bei der ESI um eine sehr milde Art der Ionisierung handelt, zerfallen die Moleküle nicht in ihre Fragmente. Daher ist meist der Molekülpeak auch gleichzeitig der Basispeak im Massenspektrum. Anhand des erfassten Massenbereichs der MS-Chromatogramme konnten die einzelnen Verbindungen identifiziert werden. Je nach Ionisierungspolarisation, positiv oder negativ, erhält man Molekülpeaks, die um eine Masseneinheit größer ($[M+H]^+$) oder um eine niedriger ($[M-H]^+$) als die molekulare Masse der identifizierten Verbindung sind.

Man erkennt in Abb. H-4 bis Abb. H-6, dass neben dem Cumarin Herniarin auch Komponenten des ätherischen Öls, die beiden Spiroether in der cis- bzw. trans-Konfiguration, durch ihre Massen von $m/z = 176$ bzw. 220 klar im UV/VIS-Chromatogramm nachzuweisen sind. Die Detektion dieser Verbindungen erfolgte mittels positiver Ionisierung. Alle weiteren Substanzen wurden der negativen Ionisation ausgesetzt, um ein möglichst starkes Detektorsignal zu erhalten. So konnten neben dem Flavon Apigenin noch dessen 7-O-Glucosid identifiziert und beide Verbindungen den jeweiligen Peaks im UV-Chromatogramm sicher zugeordnet werden (Abb. H-7 und Abb. H-8). Ferner sind zwei Acetyl-glucoside des Apigenins dargestellt (Abb. H-9), die in dieser Form bereits in der Literatur von SVEHLIKOVA et al. (2004) beschrieben wurden. Weitere in der Literatur beschriebene Esterderivate des Apigenin-Glucosids (B.2.5.2) konnten in der hier vorliegenden Droge massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden.

In Abb. H-10 bis Abb. H-12 sind in den MS-Chromatogrammen die Phenolcarbonsäure Kaffeesäure und ihre Derivate in Form von Caffeoylechinasäuren abgebildet. Man erkennt,

dass die DicaFFEoylchinasäuren (DCC), insbesondere die 1,3-DicaFFEoylchinasäure (Cynarin), neben dem Apigenin und dessen Derivaten, die Hauptvertreter der phenolischen Komponenten der Kamillenblüten sind. Des Weiteren sind insbesondere die methoxylierten Flavonoidaglyka ChrysoSplenetin, ChrysoSplenol, Eupaletin und Jaceidin in den Chromatogrammen Abb. H-13 bis Abb. H-15 aufgeführt. Diese sind in den Kamillenblüten nur in sehr geringen Konzentrationen enthalten und eluieren erst sehr spät von der RP18-Trennsäule.

Zu Beginn eluieren Moleküle mit sehr hoher Polarität, wie die beiden Ferulasäure-Derivate (Abb. H-16). Als eher lipophiles, methoxyliertes Flavonoidaglykon eluiert Chrysoeriol erst relativ spät. In glykosidierter Form eluiert es naturgemäß früher (Abb. H-17 und Abb. H-18). Dieser Effekt ist auch bei Isorhamnetin zu erkennen (Abb. H-20 und Abb. H-21). Die Elutionsfolge der beiden Glykoside des Quercetins, Quercetin-7-galactosid bzw. -glucosid konnten mittels MS nicht geklärt werden (Abb. H-19). Nach Vergleich mit Literaturdaten (MULINACCI et al., 2000) wurde das Galactosid vor das Glucosid gereiht.

Die beiden Flavonoidaglyka Luteolin und Kämpferol besitzen die gleiche molekulare Masse und sind daher im selben MS-Chromatogramm dargestellt (Abb. H-22). Der Ausschlag für die Zuordnung im Chromatogramm gab hier ein Luteolin-Standard, mit dessen Hilfe die Retentionszeit für Luteolin eindeutig zugeordnet werden konnte. Bei anderen Peaks war die eindeutige Zuordnung in einzelnen Fällen nicht immer möglich. So im Falle des Peaks des MS-Chromatogramms in Abb. H-26. Da die beiden möglichen Verbindungen, Axilarin oder Spinacetin, die gleiche Masse aufweisen, keine Standards vorlagen und beide Substanzen in der Literatur in Kamillenblüten beschrieben sind, konnte keine Zuordnung getroffen werden. Eindeutig dagegen konnte das Patuletin-glucosid zugeordnet werden (Abb. H-24 und Abb. H-25).

Im Ergebnis konnten mittels MS, durch Vergleich der UV-Spektren mit Standard-Spektren und anhand von zahlreichen Literaturdaten nahezu alle Peaks im HPLC-Chromatogramm identifiziert werden. In Abb. C-14 ist im oberen Teil das Chromatogramm eines methanolischen Extrakts aus Kamillenblüten mit den Benennungen aller identifizierten phenolischen Komponenten dargestellt. Im Vorgriff auf Kap. C.3.2 wurde im unteren Teil der Abbildung ein Chromatogramm eines Ölauszugs aus denselben Kamillenblüten dargestellt. Die Benennung der Peaks, sowie weitere relevante Daten zur Charakterisierung der phenolischen Komponenten aus Kamillenblüten sind in Tab C-11 zusammengefasst. Es wurden neben den Retentionszeiten auch die Massen und die charakteristischen Maxima der UV-Spektren dargestellt.

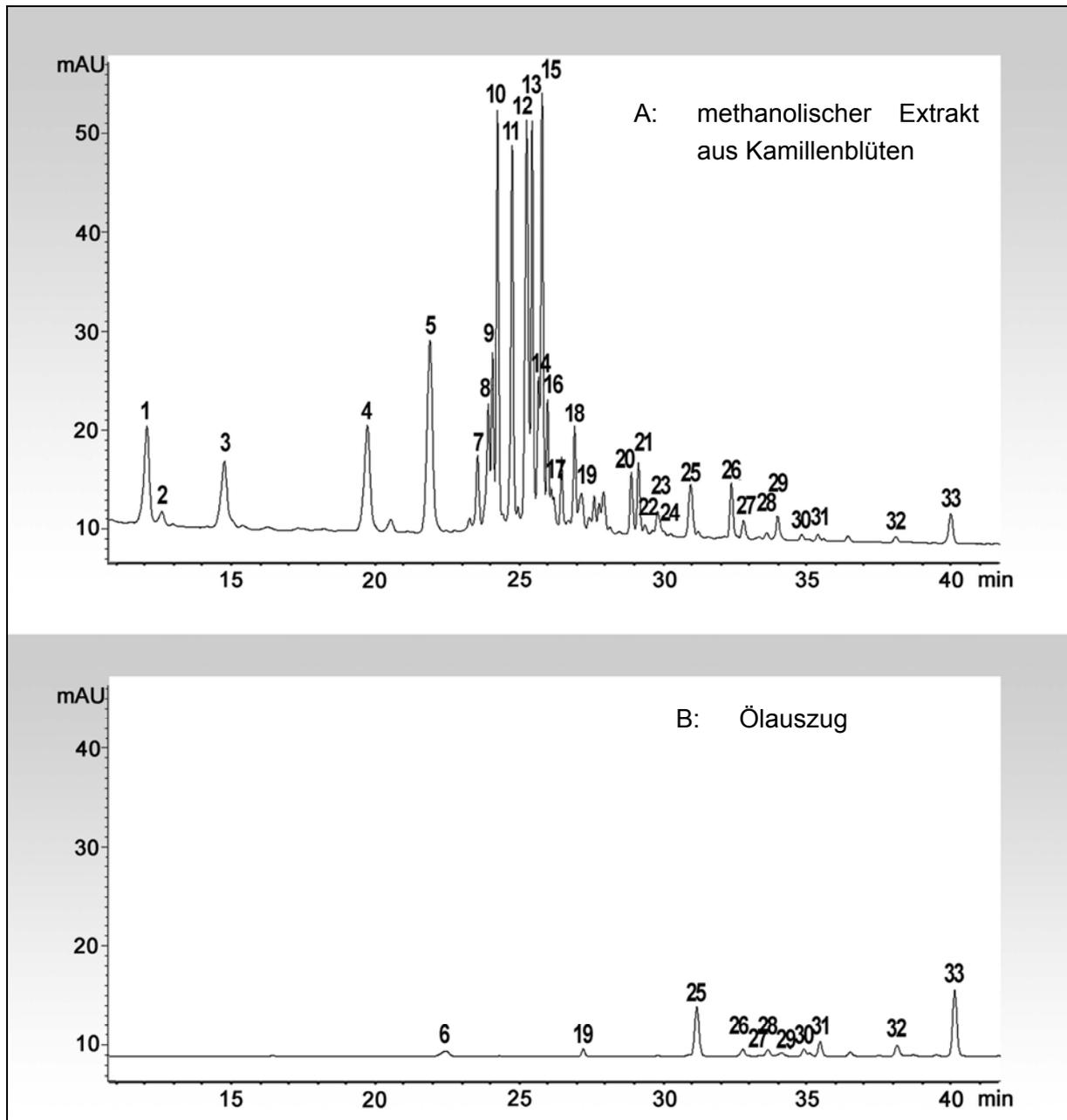


Abb. C-14 HPLC-DAD – Chromatogramm eines methanolischen Kamillenextraktes (A) und eines Ölauszuges (B) [Peakidentifizierung nach Tab. C-11]

Tab. C-11 Identifizierte phenolische Verbindungen aus Kamillenblüten

	RT [min]	Verbindung	molekulare Masse	UV Maxima [nm]
1	12,0	Chlorogensäure	354	324, 302sh, 218, 238 sh
2	12,8	4-Caffeoylchinasäure	354	322, 302sh, 2442, 218
3	14,8	Ferulasäure-glucosester	356	302, 282sh, 210, 226sh
4		Flavonoiddiglykosid		358, 260, 272sh, 214sh
5	21,6	Ferulasäureglucosid	356	318, 292, 236, 214
6		Umbelliferon	162	322, 294sh, 214sh
7	22,6	Quercetin-3-galactosid	464	370, 254, 268sh
8	22,9	Quercetin-7-glucosid	464	370, 254, 266sh
9	23,1	Luteolin-7-glucosid	448	356, 260, 272sh, 236
10	23,5	Patuletin-7-glucosid	494	336, 278sh, 260, 276sh, 234sh
11	23,9	Dicaffeoylchinasäure-Derivat		322, 302sh, 242, 218
12	24,1	1,3-Dicaffeoylchinasäure	516	322, 302sh, 242, 218
13	24,3	Apigenin-7-glucosid	432	334, 266
14	24,6	Isorhamnetin-7-glucosid	478	334, 376sh, 280, 254
15	24,9	Dicaffeoylchinasäure-Derivat		324, 304sh, 242, 216
16	25,9	Ferulasäure-Derivat		320, 302sh, 232sh
17	26,0	Apigenin-7-(6"-malonyl-glucosid)	518	334, 266, 226sh
18	26,5	Apigenin-7-(6"-caffeoyl-glucosid)	594	334, 266, 226sh
19	26,9	Apigenin-7-(4"-acetyl-glucosid)	474	334, 266, 226sh
20	27,8	Apigenin-7-(6"-acetyl-glucosid)	474	334, 266, 226sh
21	28,4	Apigenin-7-(4"acetyl - 6"-malonyl-glucosid)	560	334, 266, 226sh
22	29,0	Luteolin	286	346, 252
23	29,4	Apigenin-7-(acetyl - malonyl-glucosid)	560	334, 266, 226sh
24	29,5	Quercetin	302	370, 302sh, 254, 266sh, 212sh
25	31,1	Herniarin	176	322, 294sh, 218
26	32,4	Apigenin	270	346, 292sh, 252, 266, 220sh
27	32,9	Chryseriol	300	340, 266, 240sh
28	33,3	Kämpferol	286	364, 324sh, 294sh, 264, 248sh, 218sh
29	33,5	Isorhamnetin	316	344, 254
30	34,6	Chrysofenol	360	348, 258, 244sh
31	35,1	Jaceidin	360	346, 254, 266sh
32	38,0	Eupaletin	330	360, 342sh, 268, 290sh, 254sh
33	40,1	Chrysofenetin	374	350, 256, 270sh

RT: Retentionszeit, sh: Schulter

3.2 Übergangsraten der phenolischen Komponenten in die Ölauszüge

Beim Vergleich der beiden Chromatogramme aus Abb. C-14 wird deutlich, dass nur ein Bruchteil der phenolischen Komponenten der Kamillenblüten in die Ölauszüge übergeht. Insbesondere die Flavonoidglykoside und Phenolcarbonsäuren, d.h. die sehr polaren Verbindungen, die relativ frühzeitig eluieren, sind nicht in den Ölauszügen zu finden. Somit beschränkt sich die Berechnung der Übergangsraten bei den phenolischen Komponenten auf wenige polare Komponenten. Sinnvollerweise wurde dann deren Isolierung aus der Ausgangsdroge so modifiziert, dass die polaren Flavonoidaglyka und Phenolcarbonsäuren bei der Aufarbeitung auch abgetrennt wurden, damit sie in den Chromatogrammen nicht stören konnten. Deshalb wurde nach Extraktion der phenolischen Komponenten mit 70%igem Methanol noch ein weiterer Flüssig-Flüssig-Extraktionsschritt mit einer Lösungsmittelmischung aus Toluol und Ethylacetat (20 + 5 VT) eingefügt.

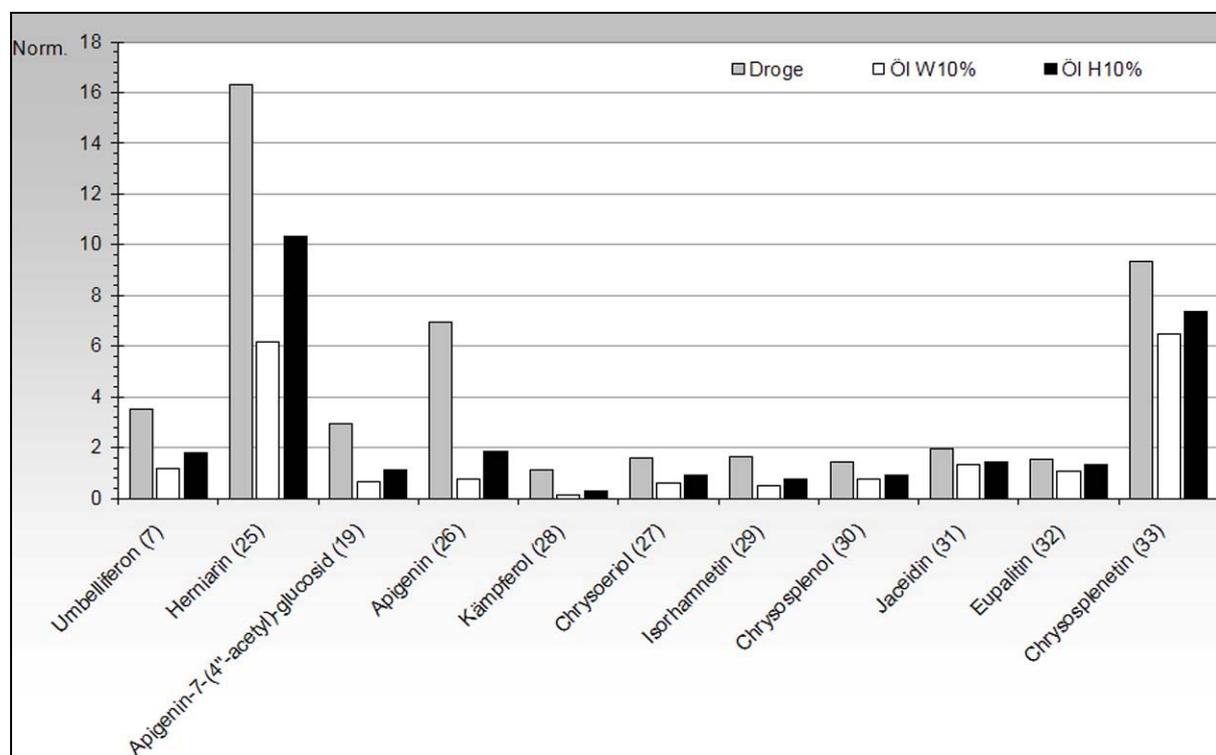


Abb. C-15 Zusammensetzung der Droge und der Ölauszüge W 10% und H 10%, dargestellt anhand normierter Peakflächen der detektierten phenolischen Komponenten (n=4)

Ein Vergleich der Phenolmuster der Droge und der Ölauszüge ist in Abb. C-15 anhand normierter Peakflächen dargestellt (Tab. H-11 bis Tab. H-13). Aufgenommen wurden nur solche Verbindungen, die mindestens 1% der Gesamtpeakfläche ausmachten. Dabei wurde darauf geachtet, dass in allen Messlösungen die Menge an Droge die gleiche war. Die Verbindungen in Abb. C-15 sind nicht entsprechend ihrer Elutionsreihenfolge angeordnet, sondern nach Stoffgruppen sortiert (Tab. C-12).

Tab. C-12 Stoffgruppen der phenolischen Komponenten und deren Vertreter in den Ölauszügen

Cumarine	Acylierte Flavonglucoside	Flavonoidaglyka (nicht methoxyliert)	Methoxylierte Flavonoidaglyka
Umbelliferon (6) Herniarin (24)	Apigenin-7-(4''-acetylglucosid) (19)	Lutoelin (22) Quercetin (24) Apigenin (26) Kämpferol (28)	Chrysoeriol (27) Isorhamnetin (29) Chrysofenol (30) Jaceidin (31) Eupaletin (32) Chrysofenetin (33)

Die Übergangsraten sind in Abb. C-16 als Summe, getrennt nach phenolischen Stoffgruppen dargestellt. Daraus wird deutlich, dass methoxylierte Flavonaglyka (61 bis 72 %) besser aus den Kamillenblüten in die Ölauszüge übergehen als nicht methoxylierte Flavonoidaglyka (11 bis 26 %). Die Übergangsraten der anderen Gruppen korrelieren mit ihrer Lipophilie (Kap. B.2.3). Je lipophiler die phenolische Komponente ist, desto höher die ermittelte Übergangsraten. KUNDE und ISAAC (1979) haben eine Einteilung der Flavonoide aus Kamillenblüten entsprechend ihrer Polaritäten eingeführt, abgeschätzt nach deren chromatographischem Verhalten in der DC. Dabei sinkt die Polarität wie folgt: Flavonidglykoside < Flavonoidmonoglykosiden < acetylierte Flavonglykosiden < Flavonoidaglyka (nicht methoxyliert) < methoxylierte Flavonoidaglyka (Abb. B-8). In Bezug auf die Übergangsraten wurde folgende Reihung festgestellt: Flavondi- und -monoglykoside gehen naturgemäß nicht ins Öl über. Die geringsten Übergangsraten weisen die nicht methoxylierten Flavonoidaglyka mit 11 bis 26% auf, dann folgen die acylierten Flavonglucoside mit 23 bis 38% und schließlich mit 61 bis 71% die methoxylierten Flavonoidaglyka. Die Cumarine schließen mit 37 bis 61 % in dieser Betrachtungsweise die Polaritätslücke zwischen den methoxylierten Flavonaglyka und den acylierten Flavonglucosiden. Damit korreliert die Reihung nach Übergangsraten nicht ganz mit der Reihung nach Polaritäten, denn die acylierten Flavonglucoside weisen in Anbetracht der Tatsache, dass sie vor den Aglyka eluieren, eine relativ hohe Übergangsraten auf. Dies erklärt sich durch die Lösungseigenschaften des Öls, das zwar durch ihren lipophilen Charakter bestimmt wird, jedoch offensichtlich eine Selektivität für acylierte Flavonglykoside aufweist.

Vergleicht man die beiden Ölauszüge W 10% und H 10%, so erkennt man einen deutlichen Unterschied. Alle untersuchten phenolischen Gruppen weisen bei den Ölauszügen H 10% höhere Übergangsraten auf als bei W 10%. Besonders stark kommt dieser Effekt bei den Cumarinen zum Ausdruck. Die prozentuale Übergangsraten in den Ölauszug H 10% betrug 61%, beim Ölauszug W 10% dagegen nur 37%. Die Droge in Abb. C-16 wurde definitionsgemäß zu 100% gesetzt.

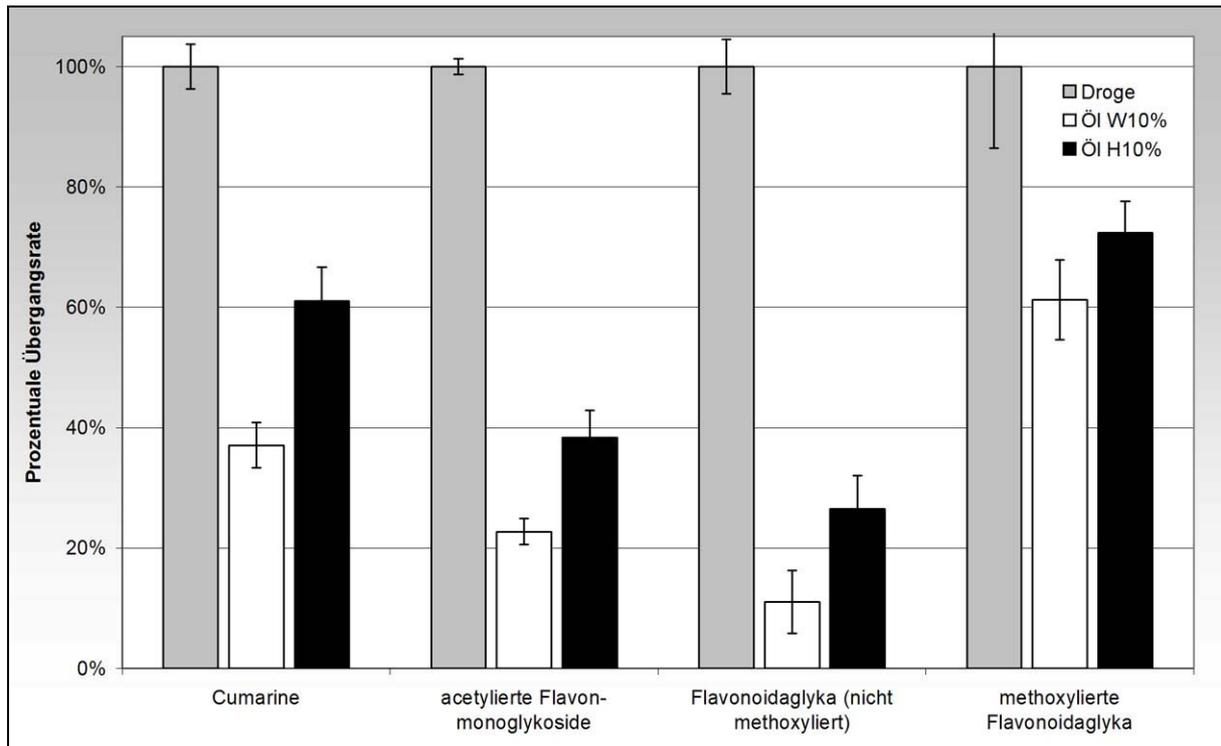


Abb. C-16 Mittlere prozentuale Übergangsraten der phenolischen Komponenten aus den Kamillenblüten in die Ölauszüge H 10% bzw. W 10%, getrennt nach Stoffgruppen (n=4)

4. ANTHOCYANE AUS STOCKROSENBLÜTEN

4.1 Methodenentwicklung

Bei den Anthocyanen handelt es sich um sehr farbintensive glykosidische Substanzen. Damit ist ihr Verbleib sowohl bei der Isolierung, als auch bei der Herstellung der Ölauszüge visuell gut zu verfolgen. Alle Ölauszüge aus den stark gefärbten Stockrosenblüten besaßen lediglich die bläulich grün-gelbe Farbe des raffinierten Olivenöls. Daraus wurde geschlossen, dass die stark polaren Anthocyane nicht oder nur in Spuren in die Ölauszüge übergehen. Dieser subjektive Eindruck sollte mit objektiven Analysemethoden bestätigt werden, wobei hierfür eine photometrische Bestimmung der Anthocyane direkt in den Ölauszügen gewählt wurde, die einfach und zeitsparend durchgeführt werden konnte.

Für die Isolierung der Anthocyane wurden drastische Bedingungen angewandt (B.2.6.2) indem sie aus den Stockrosenblüten durch dreimalige Extraktion mit einer Mischung aus Methanol und 25%iger Salzsäure (9+1 VT) erschöpfend extrahiert wurden. Nach Ermittlung des UV/VIS-Absorptionsmaximum des Extrakts, das bei einer Wellenlänge von 521 nm lag, wurden alle weiteren photometrischen Untersuchungen bei dieser Wellenlänge durchgeführt. Da keine adäquaten Standards zur Quantifizierung zur Verfügung standen, wurde die Übergangsraten der Anthocyane aus der Droge in die Ölauszüge folgendermaßen gemessen:

Mit dem Extrakt der Droge wurde eine Regressionsgerade erstellt (Tab. H-14 und Abb. H-27). Die Anthocyan-Konzentrationen der Ölauszüge wurden bestimmt, indem deren Absorption nach Verdünnungen in Petrolether zur Lösung des Öls, gegen eine Lösung aus einer entsprechenden Menge an reinem Olivenöl in Petrolether als Kompensationslösung, gemessen wurde. Mit diesen Absorptionswerten wurde aus der Regressionsgeraden der Droge die theoretische Menge an Droge in der Messlösung der Ölauszüge ermittelt. Diese ermittelte theoretische Menge an Droge wurde mit der tatsächlich eingesetzten ins Verhältnis gesetzt und so die prozentuale Übergangsrate der Anthocyane aus den Stockrosenblüten in die Ölauszüge ermittelt.

4.2 Übergangsrate der Anthocyane aus der Droge in die Ölauszüge

In den Ölauszügen W 10% wurde auf die oben beschriebene Weise ein prozentualer Übergang der Anthocyane von $0,10 \pm 0,02\%$ ($n = 12$) ermittelt (Tab. C-13) und in den Ölauszügen H 10% ein Übergang von $0,09 \pm 0,02\%$ ($n = 12$) (Tab. C-14). Der visuelle Eindruck bei der Herstellung der Ölauszüge konnte mit einem derart geringen Übergang der stark polaren Anthocyane analytisch bestätigt werden.

Tab. C-13 Ermittlung des prozentualen Übergangs der Anthocyane aus den Stockrosenblüten in die Ölauszüge W 10% ($n = 3$)

Tatsächliche Konzentration an Droge [mg/L]	Gemittelte Absorption	Theoretische ermittelte Menge Droge [mg/L]	prozentuale Übergangsrate
10210,0	0,014	12,5	0,12%
15240,0	0,019	15,4	0,10%
20040,0	0,021	16,9	0,08%
25440,0	0,024	18,3	0,07%

Tab. C-14 Ermittlung des prozentualen Übergangs der Anthocyane aus den Stockrosenblüten in die Ölauszüge H 10% ($n = 3$)

Tatsächliche Konzentration an Droge [mg/L]	Gemittelte Absorption	Theoretische ermittelte Menge Droge [mg/L]	prozentuale Übergangsrate
10100,0	0,011	10,8	0,11%
15090,0	0,015	13,1	0,09%
20120,0	0,019	15,4	0,08%
24990,0	0,023	18,1	0,07%

5. CAROTINOIDE AUS RINGELBLUMENBLÜTEN

5.1 Methodenentwicklung

Da Carotinoide in Kompartimenten der Pflanzenzellen, den Chromo- bzw. Chloroplasten enthalten sind, lassen sie sich, obwohl in organischen Lösungsmitteln gut löslich, schwer aus der Droge extrahieren. Die unterschiedliche Polarität der Carotine im Vergleich zu den Xanthophyllen erschwert die Auswahl des Lösungsmittels und der Isolierungsmethode, zumal Carotinoide sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff, Licht und Hitze sind (Kap. B.2.7.1). In der Literatur sind viele Isolierungsmethoden für Carotinoide aus Pflanzenmaterial bzw. speziell aus Ringelblumenblüten beschrieben, die photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm auf ihre Effizienz geprüft wurden. Dazu wurde eine Kalibriergerade mit β -Carotin in Hexan+Aceton (1+1 VT) erstellt, anhand derer die Gehalte in den verschiedenen Lösungsmittelextrakten berechnet wurden (Tab. H-15 und Abb. H-28). Die Kalibriergerade gehorcht folgender Formel: $y = 0,24 x - 0,01$ ($R^2 = 0,9999$)

Tab. C-15 Carotinoidgehalte (berechnet als β -Carotin) der Ringelblumenblüten nach Isolierung mit verschiedenen Lösungsmitteln (n=9)

Lösungsmittel	Carotinoidgehalt
TBME	74,6 \pm 1,3 mg/100 g
Ethanol	76,6 \pm 1,8 mg/100 g
Hexan+Aceton (1+1 VT)	80,9 \pm 2,3 mg/100 g
Ethylacetat/Methanol/Petrolether (1+1+1 VT)	82,8 \pm 0,9 mg/100 g

Für diese Experimente, wie auch zur Herstellung der Ölauszüge, wurden orangefarbene Ringelblumenblüten verwendet, die einen hohen Anteil an Carotinen in den Petalen aufweisen (Kap. B.2.7.2). Als am effizientesten erwies sich fünfmaliges Extrahieren der Droge über je eine Stunde unter intensivem Schütteln mit einer Lösungsmittelmischung aus Ethylacetat / Methanol / Petrolether (1+1+1 VT). Der Carotinoidgehalt (berechnet als β -Carotin) der Ringelblumenblüten wurde mit dieser Methode zu $82,8 \pm 0,9$ mg/100 g ($n = 9$) bestimmt (Tab. C-15). Dieser Wert lag innerhalb der Grenzen von 30 bis 140 mg/100 g (mit Methanol und Chloroform (2+1 VT) extrahiert, photometrisch bestimmt und als β -Carotin berechnet), die von BOMME et al. (1990) für orangefarbene Ringelblumenblüten ermittelt wurden.

5.2 Übergangsrate der Carotinoide in die Ölauszüge

Die Isolierung der Carotinoide aus den Ölauszügen ist nur nach Verseifen der Fettgrundlage möglich, wobei die Carotinoide dann im unverseifbaren Anteil enthalten sind. Da Carotinoide jedoch sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff, Licht und Hitze sind, war bei einer Verseifung mit einem hohen Verlust an Carotinoiden durch die Isolierung zu rechnen. Daher wurde die Isolierung umgangen, und der Carotinoidgehalt der Ölauszüge nach Verdünnen mit einer Mischung aus Aceton und Hexan (1+1 VT) direkt photometrisch bei einer Wellenlänge von

450 nm ermittelt. Um die Störungen durch die Eigenfarbe des Olivenöls zu kompensieren wurde eine Kalibriergerade erstellt (Tab. H-17 und Abb. H-29), bei der β -Carotin als Standard ebenfalls in Olivenöl und der Lösungsmittelmischung gelöst wurde. Die Kalibriergerade gehorcht folgender Formel: $y = 0,20 x + 0,01$ ($R^2=0,9991$).

Tab. C-16 Carotinoidgehalt des Ölauszugs W 10% berechnet als β -Carotin (n=3)

	Carotinoidgehalt [mg/100 g]	Standardabweichung [mg/100 g]	rel. Standardabweichung
Probe 1	4,1	0,0	0,7%
Probe 2	4,1	0,0	0,7%
Probe 3	4,2	0,0	0,9%

Tab. C-17 Carotinoidgehalt des Ölauszugs H 10% berechnet als β -Carotin (n=3)

	Carotinoidgehalt [mg/100 g]	Standardabweichung [mg/100 g]	rel. Standardabweichung
Probe 1	3,3	0,0	0,8%
Probe 2	3,4	0,0	1,4%
Probe 3	3,4	0,1	1,8%

In den Ölauszügen W 10% wurde auf diese Weise ein Carotinoidgehalt von $4,1 \pm 0,1$ mg/g ($n = 9$), berechnet als β -Carotin, ermittelt (Tab. C-16). Unter Berücksichtigung des β -Carotinsgehaltes der verwendeten Ringelblumenblüten von $82,8 \pm 0,9$ mg/100 g und einem DEV von 1:10 bei der Herstellung der Ölauszüge, ergibt sich eine prozentuale Übergangsrate der Carotinoide von $50,0 \pm 1,6$ %. In den Ölauszügen H 10% wurde ein Carotinoidgehalt von $3,4 \pm 0,0$ mg/100 g ($n = 9$), berechnet als β -Carotin, ermittelt (Tab. C-17). Damit ergibt sich eine prozentuale Übergangsrate der Carotinoide aus der Droge in die Ölauszüge H 10% von $40,8 \pm 1,0$ %. In Abb. C-17 sind die Übergangsraten der Carotinoide aus den Ringelblumenblüten in die Ölauszüge dargestellt, wobei die Werte der Droge definitionsgemäß zu 100% gesetzt wurden.

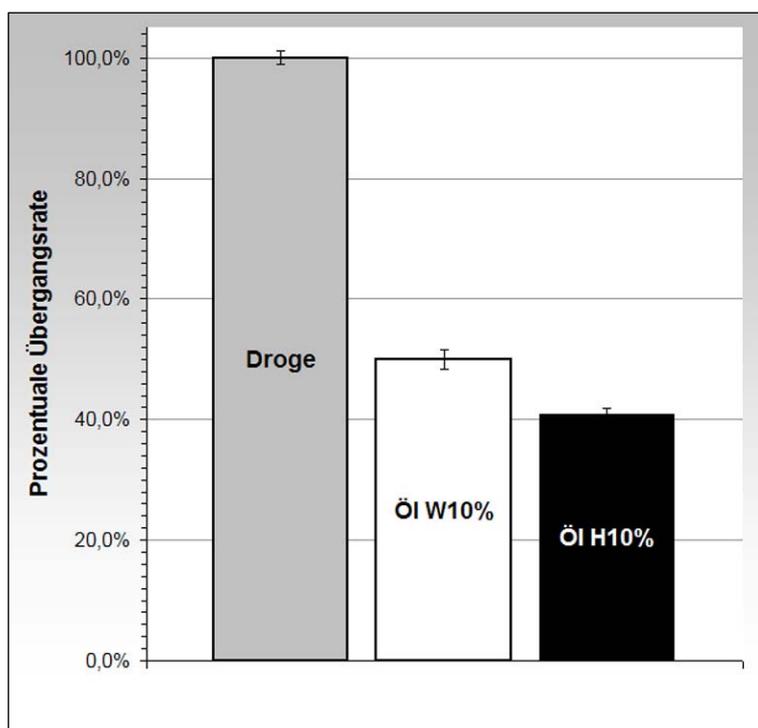


Abb. C-17 Prozentualer Übergang der Carotinoide aus Ringelblumenblüten in die Ölauszüge

6. STEROLE UND TRITERPENALKOHOLE AUS RINGELBLUMENBLÜTEN

6.1 Methodenentwicklung

Die Isolierung, Derivatisierung und Bestimmung der Sterole und Triterpenalkohole erfolgte in Anlehnung an die deutsche Standardmethode F-III 1 „Sterine – Isolierung und gaschromatographische Untersuchung“ bzw. an die identische Methode der EU-Verordnung (EWG) Nr. 2568/1991 (vom 11. Juli 1991), die auch Eingang ins Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 5.4 „Sterole in fetten Ölen“ Nr. 2.4.23) gefunden hat. Die Droge bzw. die Ölauszüge wurden verseift und als unverseifbarer Anteil isoliert. Die Fettbestandteile wurden säulenchromatographisch an Aluminiumoxid abgetrennt, wobei die Sterole und Triterpenalkohole mit Ethanol und TBME von der Säule eluiert wurden. Die GC-Trennung erfolgte nach Derivatisierung zu Trimethylsilylethern. Mit diesem Verfahren ist es möglich, die Phytosterole β -Sitosterol und Campesterol nebeneinander zu quantifizieren. Das Verhältnis dieser beiden Sterole zueinander ist für jedes Fett bzw. Öl charakteristisch, so dass es bei Fetten und Ölen zur Identifizierung und zur Reinheitsbestimmung dient.

Da nur wenige Sterole und Triterpenalkohole isoliert als Standards zur Verfügung standen und die GC-MS wegen Interferenzen zwischen den Silylethern und der Trennsäule bzw. dem Detektor nur eingeschränkt verwendet werden konnte, wurde eine andere Strategie gewählt. Zunächst wurden unterschiedliche Öle und Pflanzen untersucht, deren Sterol- und Triterpenalkoholmuster gut bekannt sind, wie z.B. Sonnenblumen-, Oliven- oder Rapsöl. Dadurch und durch eine Vielzahl an veröffentlichten relativen Retentionszeiten auf unterschiedlichsten stationären GC-Phasen war es möglich, eine Peakidentifizierung durchzuführen (Tab. C-18).

Zur quantitativen Bestimmung der Sterole und Triterpenalkohole wurde die Methode des internen Standards (ISTD) gewählt. Um vom eingesetzten ISTD Cholestanol auf die übrigen Sterole und Triterpenalkohole in den Untersuchungslösungen umrechnen zu können, braucht man in der GC mit FID spezielle Korrekturfaktoren. Diese berechnen sich aus dem Verhältnis der theoretischen Responsefaktoren, die sich wiederum aus dem Molekulargewicht dividiert durch die Anzahl an C-Atomen mal zwölf, die nicht an Heteroatome gebunden sind, ergeben.

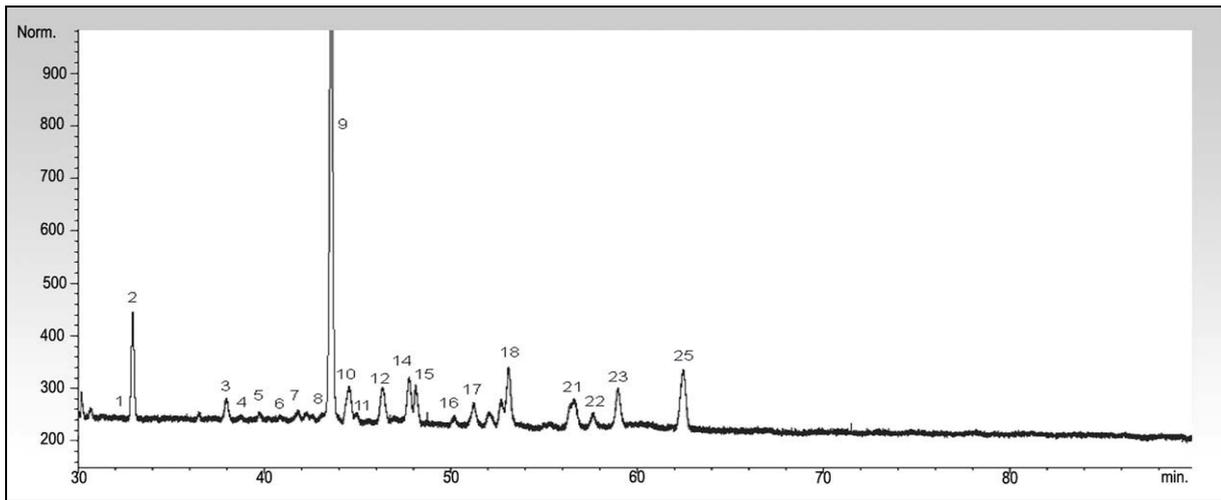


Abb. C-18 GC-FID-Chromatogramm der Sterole und Triterpenalkohole aus Olivenöl [Peakbenennung siehe Tab. C-18]

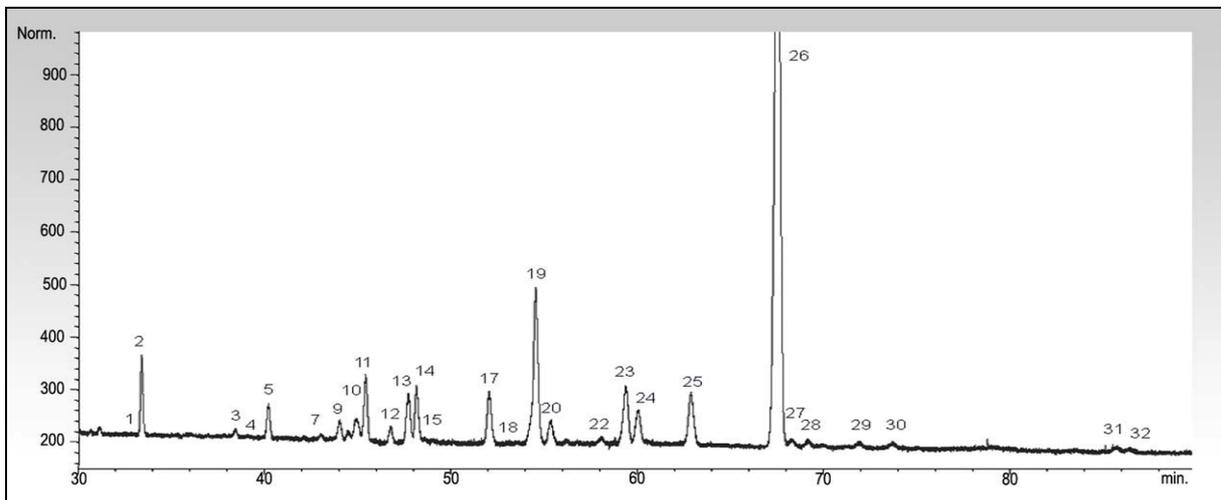


Abb. C-19 GC-FID-Chromatogramm der Sterole und Triterpenalkohole aus Ringelblumenblüten [Peakbenennung siehe Tab. C-18]

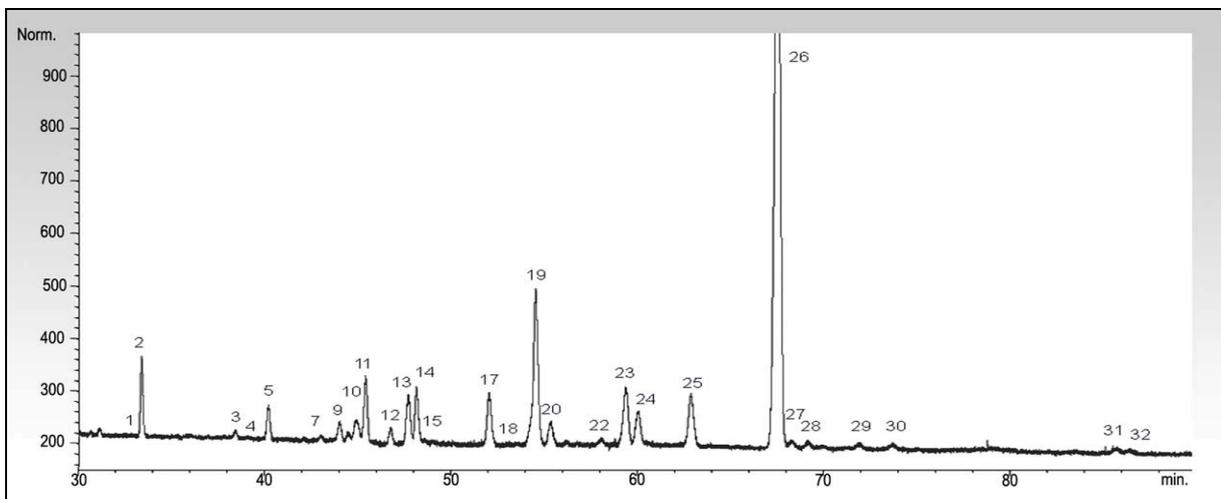


Abb. C-20 GC-FID-Chromatogramm der Sterole und Triterpenalkohole aus dem Ringelblumenblüten-Ölauszug W 10%. [Peakbenennung siehe Tab. C-18]

Tab. C-18 Sterole und Triterpenalkohole in Ringelblumenblüten und Olivenöl

	Verbindung	Retentionszeit [min]	rel. Retentionszeit ^a	Molekülmasse	theoretischer Response	rel. Responsefaktor ^b
1	Cholesterol	32,6	0,740	386,66	1,239	0,995
2	Cholestanol	33,2	0,750	388,68	1,246	1,000
3	Campesterol	38,3	0,870	400,69	1,237	0,993
4	Campestanol	39,1	0,890	402,71	1,243	0,998
5	Stigmasterol	40,1	0,910	412,70	1,228	0,986
6	Δ7-Campesterol	41,2	0,940	400,69	1,237	0,993
7	Δ5,23-Stigmastadienol	42,2	0,960	412,70	1,228	0,986
8	Clerosterol	43,5	0,990	412,70	1,228	0,986
9	β-Sitosterol	44,0	1,000	414,72	1,234	0,991
10	Sitostanol	45,0	1,020	416,74	1,240	0,996
11	β-Amyrin	45,4	1,030	426,72	1,226	0,984
12	Δ5-Avenasterol	46,8	1,060	414,72	1,234	0,991
13	Lupeol	47,7	1,080	426,72	1,226	0,984
14	α-Amyrin	48,3	1,100	426,72	1,226	0,984
15	Δ7-Stigmasterol	48,6	1,100	412,69	1,228	0,986
16	Δ7-Avenasterol	50,7	1,150	412,69	1,228	0,986
17	Ursadiol	52,1	1,180	442,72	1,318	1,058
18	Erythrodiol	53,6	1,220	442,72	1,318	1,058
19	ψ-Taraxasterol	54,6	1,240	426,72	1,226	0,984
20	Taraxasterol	55,4	1,260	426,72	1,226	0,984
21	Uvaol	57,0	1,290	442,72	1,318	1,058
22	Maniladiol	58,2	1,320	442,72	1,318	1,058
23	Brein	59,5	1,350	442,72	1,318	1,058
24	Calendualdiol	60,2	1,370	442,72	1,318	1,058
25	Betulin	63,0	1,430	442,72	1,318	1,058
26	Faradiol	67,7	1,540	442,72	1,318	1,058
27	Arnidiol	68,5	1,560	442,72	1,318	1,058
28	Longispinogenin	69,2	1,570	458,74	1,416	1,137
29	Ursatriol	71,9	1,630	458,74	1,416	1,137
30	Heliantriol B2	73,6	1,670	458,74	1,416	1,137
31	Heliantriol C	85,6	1,940	458,74	1,416	1,137
32	Heliantriol F	86,4	1,960	458,74	1,416	1,137

^a bezogen auf β-Sitosterol^b bezogen auf Cholestanol

Zur Überprüfung, ob die Methode zur quantitativen Bestimmung der Sterole und Triterpenalkohole aus Ringelblumenölauszügen geeignet ist, wurde sie mit verschiedenen Substanzen, Cholestanol, Betulin und Cholesterol überprüft. Zu diesem Zweck wurde eine Kalibriergerade des Cholesterols erstellt, die folgender Formel gehorcht:

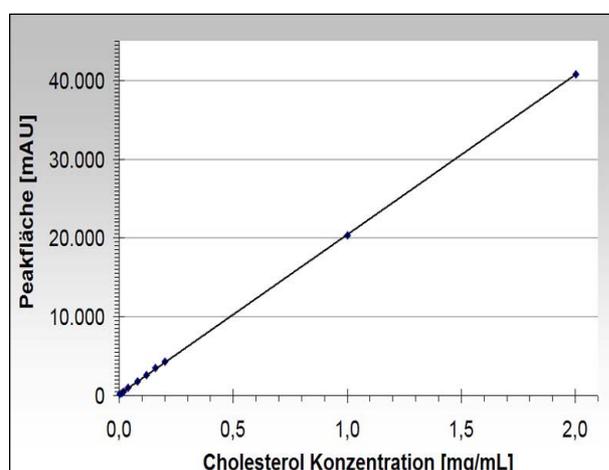


Abb. C-21 Kalibriergerade Cholesterol

$$y = 20.288,30 x + 176,93 \quad (R^2 = 1,000)$$

Jede Verdünnung der Kalibrierlösung enthielt zusätzlich eine gleich bleibende Menge an Cholestanol und Betulin. Daraus ließen sich die Korrekturfaktoren (f_{Korr}) ermitteln und mit den theoretisch berechneten relativen Responsefaktoren zur Umrechnung von Cholesterol auf Cholestanol bzw. Betulin vergleichen (Tab. C-19).

Tab. C-19 Korrekturfaktoren zur Umrechnung von Cholesterol auf Cholestanol bzw. Betulin

	Cholestanol	Betulin
ermittelter f_{Korr}	0,9824	1,0537
Relative Responsefaktoren	0,9948	1,0577

Die Abweichung der ermittelten f_{Korr} von den theoretischen liegt beim Cholestanol bei 1,2% und beim Betulin bei 0,4%. Die Abweichung ist, wie zu erwarten, in beiden Fällen gering. Verwendet wurde schließlich Cholestanol, da in den untersuchten Ringelblumenblüten und den daraus hergestellten Ölauszügen kein Cholestanol, dagegen Spuren an Betulin gefunden wurden.

Zur Ermittlung der Wiederfindung in der beschriebenen Versuchsanordnung (Kap. E.10) wurden beide ISTD (Cholestanol und Betulin) sowie das Sterol Cholesterol verwendet. Mit diesen Substanzen sind die Gruppe der Sterole, der Stanole sowie der Triterpenalkohole repräsentiert. Zur Bestimmung der Konzentration bzw. der Peakflächen der Standards wurden je 50 μL jeder Standardlösung in ein Reaktionsgefäß pipettiert, das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom abgeblasen und anschließend derivatisiert. Zur Ermittlung der Wiederfindung werden je 50 μL dieser Standardlösungen in ein Pyrexglas pipettiert, ebenfalls unter einem Stickstoffstrom eingeeengt und in ca. 250 mg Olivenöl wieder gelöst. Diese Mischung wurde verseift und die Standards wie oben beschrieben isoliert, derivatisiert und mittels GC analysiert. Es wurden sowohl die reinen Standards, als auch die Öldotierungen je sechsmal aufgearbeitet und zur GC verwendet.

Beim verwendeten Olivenöl handelt es sich zwar um raffiniertes Olivenöl von pharmazeutischer Qualität (Ph. Eur. 5.0), aber auch dieses enthält noch Reste an Sterolen und Triterpenalkoholen (Kap. B.4). Deshalb wurde das reine Olivenöl als Blindwert ebenfalls analysiert und die erhaltenen Peakflächen von denen der dotierten Öle subtrahiert. Aus den Soll-Konzentrationen der Standardlösungen und den ermittelten Standard-Konzentrationen der Öldotierungen (Tab. H-20 und Tab. H-21) errechnet sich für Cholesterol eine prozentuale Wiederfindungsrate von $96,9 \pm 4,8\%$, für Cholestanol von $95,1 \pm 4,8\%$ und $99,5 \pm 4,5\%$ für Betulin. Damit ergibt sich eine gemittelte prozentuale Wiederfindungsrate der Methode von $97,4 \pm 4,7\%$, womit diese zur Isolierung und quantitativen Bestimmung der Sterole, Stanole und Triterpenalkohole im Olivenöl, in den Ölauszügen und in der Droge geeignet ist.

6.2 Quantitative Bestimmung der Sterole und Triterpenalkohole im Olivenöl

Der Sterol- und Triterpenalkoholgehalt des zur Herstellung der Ölauszüge verwendeten Olivenöls wurde untersucht (Abb. C-22 und Tab. H-22), da diese Werte bei der Berechnung der Übergangsraten aus Ringelblumenblüten berücksichtigt werden müssen. Einige der Verbindungen kommen sowohl im Olivenöl, als auch in den Ringelblumenblüten vor, weswegen zur Ermittlung der Übergangsrate der Sterole und der Triterpenalkohole aus den Blüten in das Öl der Gehalt dieser Substanzen im Olivenöl vom dem Gehalt in den Ölauszügen subtrahiert wurde.

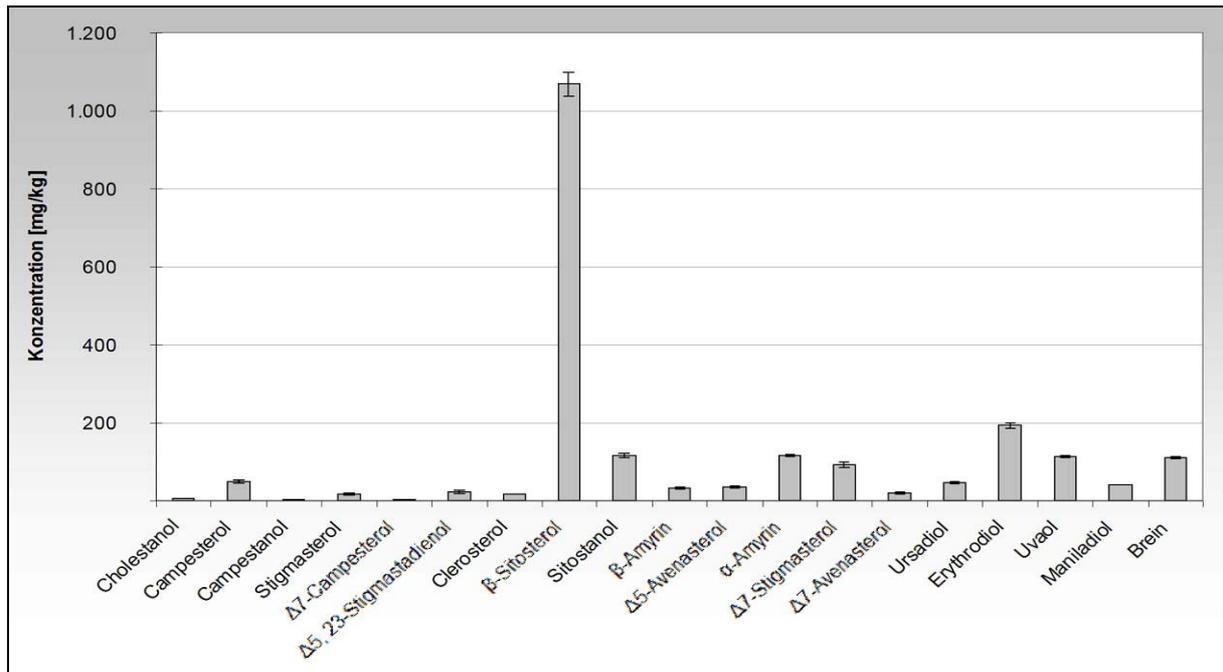


Abb. C-22 Zusammensetzung und Gehalte der Sterole und Triterpenalkohole im reinen Olivenöl (n = 4)

6.3 Quantitative Bestimmung der Sterole und Triterpenalkohole in der Droge

Für die Aufarbeitung der Droge konnten die beiden Schritte Extraktion und Verseifung in

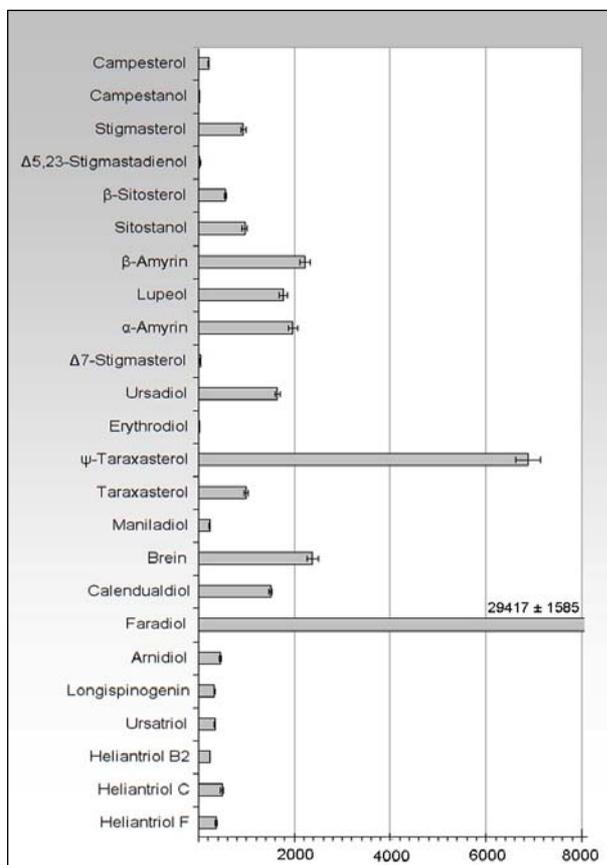


Abb. C-23 Gehalte der Sterole und Triterpenalkohole in Ringelblumenblüten [mg/kg] (n = 6)

einem erfolgen. Die verwendeten Ringelblumenblüten enthalten 1881 ± 94 mg/kg Sterole (n = 6). Diese setzen sich zusammen aus 52% Stigmasterol, 32% β -Sitosterol, 12% Campesterol, 2% Δ^7 -Stigmasterol und 2% $\Delta^5, 23$ -Stigmastadienol (Abb. C-23 und Tab. H-23). Andere Sterole, wie $\Delta^5, 23$ -Stigmastadienol oder Δ^5 -Avenasterol sind nur in Spuren nachweisbar. Damit deckt sich die ermittelte Sterolzusammensetzung gut mit den Werten von WOJCIECHOWSKI et al (1972). Der Gesamtsterolgehalt wich jedoch von den publizierten Werten von 600 bis 800 mg/kg ab (WILKOMIRSKI und KASPRZYK, 1979).

Die Gruppe der Triterpenalkohole wird nach der Anzahl von Hydroxylgruppen im Molekül getrennt betrachtet. Der Gesamtgehalt an Triterpen-Monoalkoholen

in den Ringelblumenblüten wurde zu 11558 ± 499 mg/kg ($n=6$) bestimmt. Diese Fraktion setzt sich zusammen aus 50% ψ -Taraxasterol, 16% β -Amyrin, 14% α -Amyrin, 13% Lupeol und 7% Taraxasterol. Mengenmäßig dominieren jedoch die Triterpen-Dialkohole mit 34344 ± 1300 mg/kg, bestehend aus 84% Faradiol, 6% Brein, 4% Ursadiol, 4% Calenduladiol, 1% Maniladiol und 1% Arnidiol. Die Triterpen-Trialkohole wurden in den Ringelblumenblüten zu 857 ± 36 mg/kg bestimmt und setzten sich aus 27% Heliantriol C, 21% Heliantriol F, 19% Longispinogenin, 19% Ursatriol und 14% Heliantriol B2 zusammen. Das Triterpenalkohole-Muster deckt sich sehr gut mit den in der Literatur veröffentlichten Daten (Kap. B.2.9.2).

Tab. C-20 Gruppen der Sterole und Triterpenalkohole und deren Vertreter

Sterole	Triterpen-Monoole	Triterpen-Diole	Triterpen-Triole
Stigmasterol 52%	ψ -Taraxasterol 50%	Faradiol 84%	Heliantriol C 27%
β -Sitosterol 32%	β -Amyrin 16%	Brein 6%	Heliantriol F 21%
Campesterol 12%	α -Amyrin 14%	Calenduladiol 4%	Ursatriol 19%
Δ^7 -Stigmasterol 2%	Lupeol 13%	Ursadiol 4%	Longispinogenin 19%
$\Delta^5,23$ -Stigmastadienol 2%	Taraxasterol 7%	Maniladiol 1%	Heliantriol B2 14%
		Arnidiol 1%	

6.4 Übergangsraten der Sterole und Triterpene in die Ölauszüge

Der Übergang der einzelnen Gruppen (Tab. C-20) bietet ein sehr heterogenes Bild, wie Abb. C-24 sowie die Daten aus Tab. C-21 und Tab. C-22 verdeutlichen. In den Ölauszügen wurden Sterolgehalte von $20,5 \pm 0,5$ mg/kg (W 10%; $n = 8$) bzw. $5,7 \pm 0,1$ mg/kg (H 10%; $n = 8$) bestimmt. Unter Berücksichtigung des DEV von 1:10 bei der Herstellung der Ölauszüge entspricht dies prozentualen Übergängen der identifizierten und quantifizierten Sterole aus den Ringelblumenblüten in die Ölauszüge W 10% von $11,3 \pm 2,5\%$ bzw. $3,1 \pm 2,4\%$ Ölauszüge H 10%.

Die Triterpene werden vom Öl effizienter extrahiert als die Sterole. Je mehr Hydroxylgruppen enthalten sind, desto höher ist die Übergangsrate aus der Droge ins Öl. Der Gehalt an Diolen in den Ölauszügen W 10% ist mit $1679,8 \pm 47,3$ mg/kg ($n = 8$) am höchsten, gefolgt von den Monoolen mit $347,5 \pm 10,8$ mg/kg ($n = 8$) und den Triolen mit $73,2 \pm 2,2$ mg/kg ($n = 8$). Die prozentualen Übergangsraten der Triterpenalkohole in die Ölauszüge W 10% steigt erstaunlicherweise mit zunehmender Hydroxylierung in der Reihe von den Monoolen mit $30,1 \pm 3,1\%$, über die Diole mit $48,9 \pm 2,8\%$ zu den Triolen mit $85,4 \pm 3,4\%$ an. Bei dieser Betrachtungsweise muss jedoch bedacht werden, dass mit steigendem Hydroxylierungsgrad der Triterpenalkohole auch die Veresterung mit Fettsäureester, bei Monoolen mit kurzkettigen, bei Di- und Triolen mit langkettigen, ansteigt (Kap. B.2.9.2). Dies wirkt sich naturgemäß positiv auf deren Lipophilie aus.

Tab. C-21 Ermittelte Sterol- und Triterpenalkohol-Konzentrationen im Ölauszug W 10%, bereinigt um die Verbindungen des Olivenöls (n=8)

	ermittelte Konzentration [mg/kg]	Standardabweichung [mg/kg]	rel. Standardabweichung
Campesterol	-	-	-
Stigmasterol	10,6	0,2	2,3%
β-Sitosterol	-	-	-
Sitostanol	9,9	0,3	3,2%
β-Amyrin	51,0	1,5	3,0%
Lupeol	39,4	1,7	4,4%
α-Amyrin	43,7	0,7	1,6%
Ursadiol	52,0	1,1	2,1%
ψ-Taraxasterol	200,7	5,3	2,6%
Taraxasterol	12,7	0,5	4,1%
Maniladiol	-	-	-
Brein	90,8	3,4	3,8%
Calenduldiol	56,6	1,6	2,8%
Faradiol	1.475,8	38,1	2,6%
Arnidiol	4,5	0,2	3,7%
Longispinogenin	10,9	0,3	2,8%
Ursatriol	13,5	0,6	4,1%
Heliantriol B2	3,9	0,2	4,3%
Heliantriol C	27,4	0,8	2,8%
Heliantriol F	17,5	0,5	3,1%
Summe	2.121,0	57,0	2,7%

Tab. C-22 Ermittelte Sterol- und Triterpenalkohol-Konzentrationen im Ölauszug H 10%, bereinigt um die Verbindungen des Olivenöls (n=8)

	ermittelte Konzentration [mg/kg]	Standardabweichung [mg/kg]	rel. Standardabweichung
Campesterol	-	-	-
Stigmasterol	5,7	0,1	1,8%
β-Sitosterol	-	-	-
Sitostanol	-	-	1,9%
β-Amyrin	33,4	0,8	2,5%
Lupeol	35,7	1,3	3,6%
α-Amyrin	30,6	1,3	4,3%
Ursadiol	25,8	0,6	2,4%
ψ-Taraxasterol	149,9	5,6	3,7%
Taraxasterol	8,3	0,3	4,1%
Maniladiol	-	-	-
Brein	50,7	1,3	2,6%
Calenduldiol	33,2	0,9	2,8%
Faradiol	963,0	32,4	3,4%
Arnidiol	-	-	-
Longispinogenin	9,9	0,4	4,3%
Ursatriol	9,0	0,3	3,2%
Heliantriol B2	3,3	0,1	3,5%
Heliantriol C	24,9	0,8	3,2%
Heliantriol F	15,7	0,5	3,2%
Summe	1.399,3	46,9	3,3%

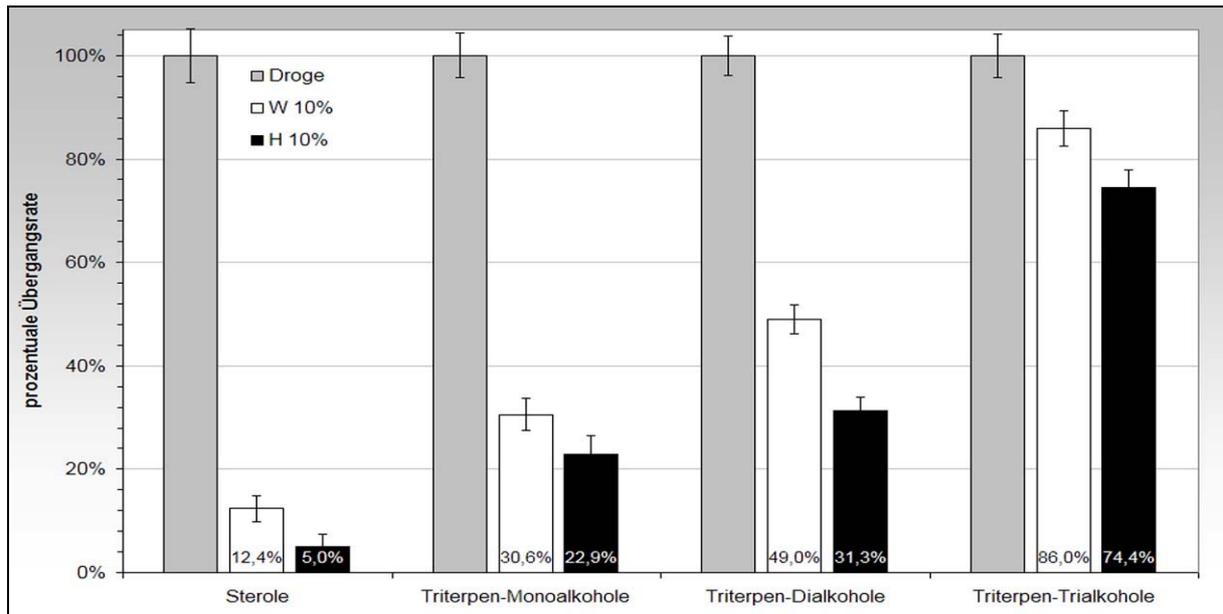


Abb. C-24 Prozentualer Übergang der Sterole und Triterpenalkohole aus den Ringelblumenblüten in die Ölauszüge W 10% und H 10%, zusammengefasst in die einzelnen Stoffgruppen (n=8)

Die Ölauszüge H 10% weisen durchgehend geringere Gehalte an Triterpenalkoholen und demzufolge geringere Übergangsraten auf, wiederum in Abhängigkeit vom Hydroxylierungsgrad. Mit $1072,6 \pm 28,3$ mg/kg (n = 8) sind wieder die Dirole die am stärksten vertretene Fraktion, gefolgt von den Monoolen mit $258,0 \pm 9,4$ mg/kg (n = 8) und mit $63,0 \pm 2,2$ mg/kg (n = 8) von den Triolen. Dies entspricht prozentualen Übergangsraten von $22,3 \pm 3,6\%$ für Monoole, $31,2 \pm 2,6\%$ für Dirole und $73,4 \pm 3,5\%$ für Triole.

Das Sterol- bzw. Triterpenalkoholmuster der beiden Ölauszügen W 10% und H 10% unterscheidet sich praktisch nicht. Wie aus Abb. C-25 zu entnehmen ist, kommt es beim Übergang der Sterole und der Triterpenalkohole zu keiner Diskriminierung einzelner Verbindungen.

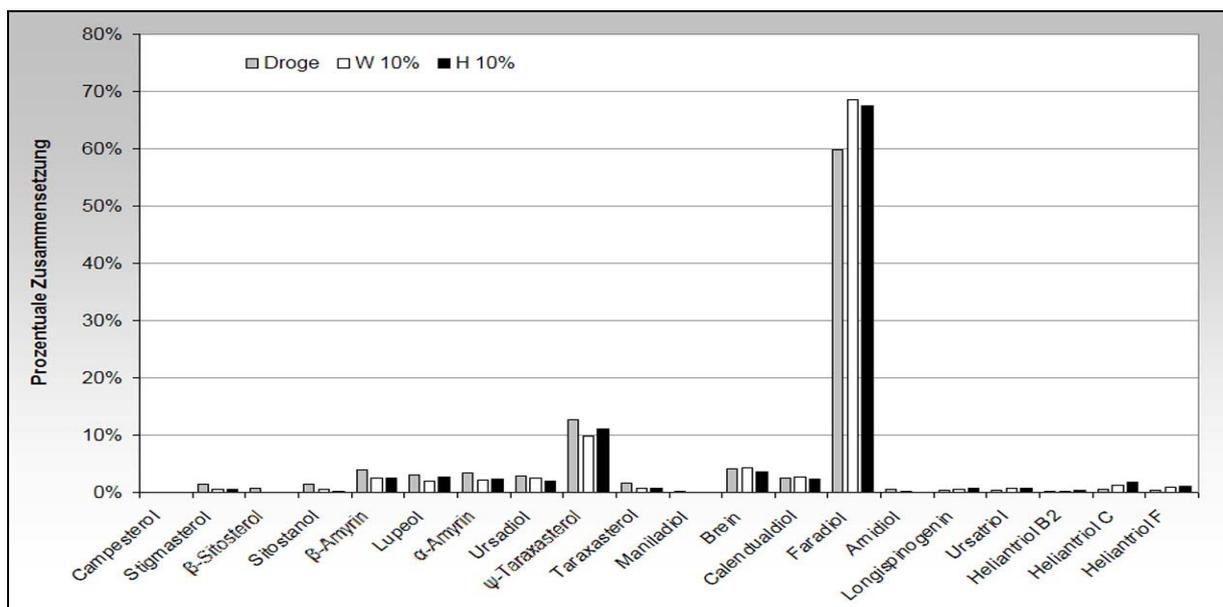


Abb. C-25 Zusammensetzung der Sterole und Triterpenalkohole der Ringelblumenblüten und der daraus hergestellten Ölauszüge W 10% und H 10%

7. CAPSAICINOIDE AUS CAYENNEPFEFFERFRÜCHTEN

7.1 Methodenentwicklung

Im letzten Jahrzehnt wurden viele Arbeiten über Capsaicinoide aus Paprika- und Cayennepfefferfrüchten veröffentlicht, die sich mit dem chromatographischen und spektralen Verhalten der Capsaicinoide beschäftigten. Nach eingehender Auswertung dieser Literatur konnte deshalb eine sehr effektive instrumentelle Capsaicinoid-Analytik mittels HPLC etabliert werden. Mit Hilfe eines Standards („Capsaicin“, 65%, natürlich, Roth, Karlsruhe) wurden die HPLC-Bedingungen an das vorliegende Trennproblem angepasst. Die Identifizierung der Peaks im HPLC-Chromatogramm erfolgte durch Vergleich des chromatographischen Profils der Capsaicinoide mit Daten der Literatur (KOZUKUE et al., 2005; SCHWEIGGERT et al., 2006; THOMPSON et al., 2005a) (Tab. C-23 und Abb. C-26). Dies war möglich, weil das Capsaicinoid-Muster in Cayennepfefferfrüchten sehr konstant ist.

Die Extraktion der Capsaicinoide aus der Droge war unproblematisch. In Voruntersuchungen erwies sich eine Extraktion mit 80%iger alkoholisch-wässriger Lösung als am effizientesten. Schwieriger zu lösen war das Problem der effektiven Entfernung der Ölmatrix aus den Ölauszügen. Dazu wurden die Ölauszüge zunächst in Petrolether gelöst und die Capsaicinoide daraus mit Methanol (80%) extrahiert. Zur weiteren Aufreinigung und Isolierung der Capsaicinoide wurde die methanolische Lösung eingeeengt, auf eine Extrelut NT-Säule gegeben und nach einer kurzen Einwirkzeit mit Ethylacetat eluiert.

Tab. C-23 Identifizierte Capsaicinoide im „Capsaicin-Standard“; Benennung der Peaks nach (KOZUKUE et al., 2005; SCHWEIGGERT et al., 2006)

Peak	Retentionzeit (min)	Identität	HPLC-DAD-UV Spektrum, λ_{\max} (nm)
1	5,0	Capsaicinoid ^a	230, 279
2	7,1	Capsaicinoid ^a	228sh, 280
3	8,2	Capsaicinoid ^a	230sh, 280
4	9,6	Nornorcapsaicin	227, 238sh, 280
5	14,7	Nornordihydrocapsaicin	228sh, 280
6	15,3	Caprylsäurevanillylamid	228, 280
7	16,2	Capsaicinoid ^a	228, 280
8	17,1	Nordihydrocapsaicin	227sh, 280
9	17,6	Capsaicin	228sh, 280
10	18,0	Nonivamid	-
11	19,9	Dihydrocapsaicin	227sh, 280
12	20,3	Homocapsaicin I	227sh, 280
13	20,5	Homocapsaicin II	227sh, 280
14	22,5	Homodihydrocapsaicin I	228, 280
15	22,8	Homodihydrocapsaicin II	226sh, 280

^a: nach (SCHWEIGGERT et al., 2006) nicht genauer identifiziertes Capsaicinoid

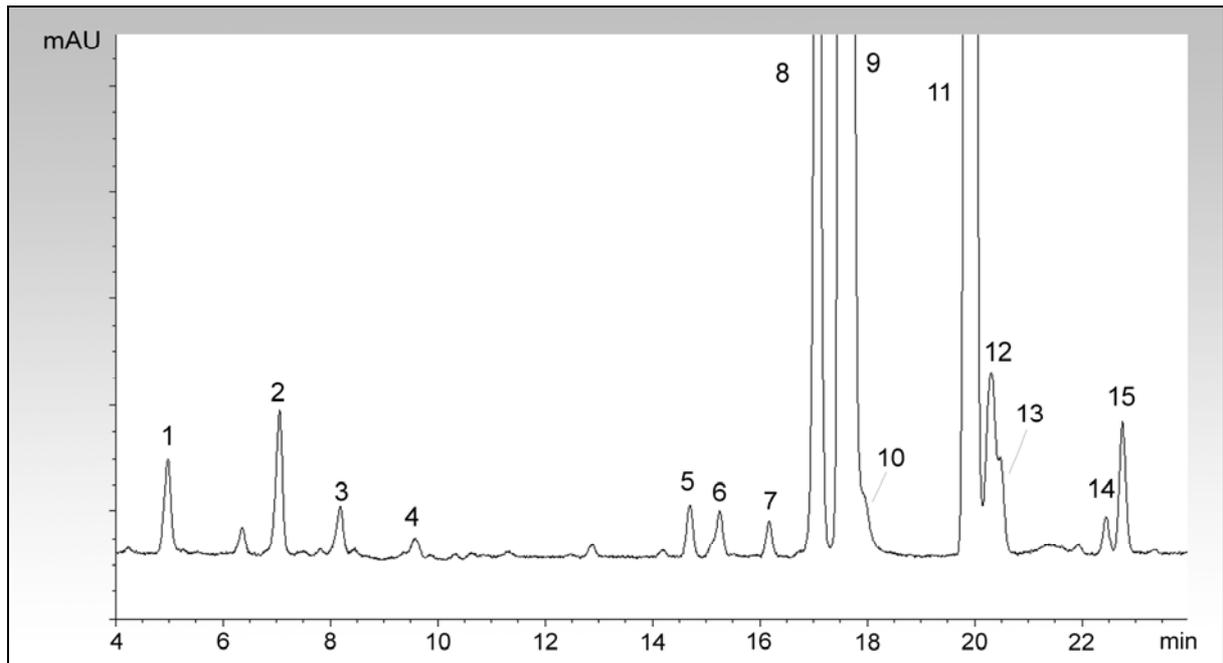


Abb. C-26 HPLC-DAD Chromatogramm der Capsaicinoide in Cayennepfefferfrüchten [Peakidentifizierung siehe Tab. C-23]

Die Eignungsprüfung der Methode zur Bestimmung der Capsaicinoide in Ölauszügen aus Cayennepfefferfrüchten erfolgte mit Hilfe des Standards Nonivamid. Zu diesem Zweck wurde eine Kalibriergerade des Standards in Methanol erstellt (Abb. C-27 und Tab. H-24), welche folgender Gesetzmäßigkeit gehorchte:

$$y = 7,44 x + 22,85 \quad (R^2 = 0,9999)$$

Die Kalibriergerade war über den gesamten Bereich (40,4 bis 202,0 mg/L) linear auswertbar, wobei die Nachweisgrenze für Nonivamid bei 4,4 mg/L in der Messlösung lag und die Bestimmungsgrenze bei 8,7 mg/L. Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurde Nonivamid direkt mit Olivenöl vermischt und diese Lösung dann wie ein Cayennepfefferfrucht-Ölauszug aufgearbeitet. Es wurden sechs dotierte Öle analysiert.

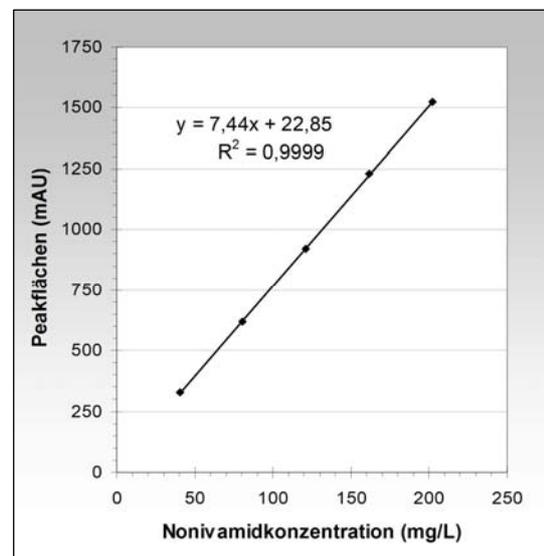


Abb. C-27 Kalibriergerade Nonivamid

Tab. C-24 Ergebnisse und Berechnung der Wiederfindung des eingesetzten Nonivamid-Standards in die Olivenöle

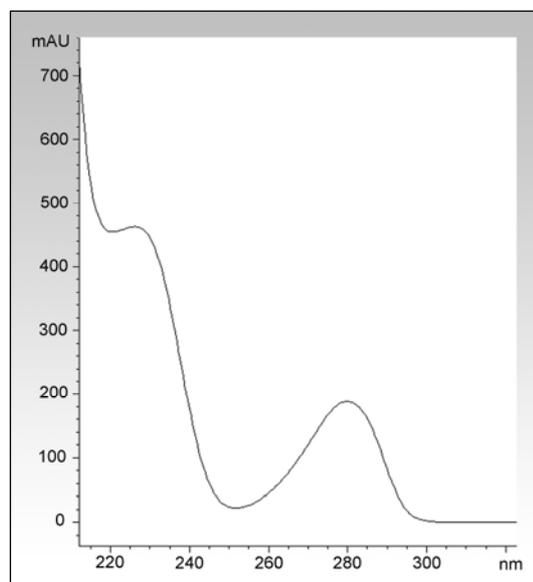
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	gemittelt
Peakfläche (mAU)	748,7	737,9	738,8	742,3	736,5	736,0	740,0
Ermittelte Konz. (mg/L)	97,6	96,1	96,2	96,7	95,9	95,9	96,4
Sollkonz. (mg/L)	101,0	101,0	101,0	101,0	101,0	101,0	101,0
Wiederfindung	96,6%	95,2%	95,3%	95,8%	95,0%	94,9%	95,5%

Aus den Werten der Tab. C-24 ergibt sich eine gemittelte Wiederfindungsrate der Methode von $95,5 \pm 0,6\%$. Damit war die Methode zur Isolierung und Bestimmung der Capsaicinoide aus den Ölauszügen geeignet.

Der verwendete Capsaicinoid-Standard ist ein mittels HPLC aus „natürlicher Quelle“ isolierter Cayennepfeffer-Extrakt. Bei der chromatographischen Trennung konnten, wie in der Droge, alle Hauptcapsaicinoide und einige Nebenbestandteile des Standards auf Grund ihres chromatographischen Verhaltens und ihres UV-Spektrums zugeordnet werden. Da alle Capsaicinoide das gleiche Chromophor enthalten und die Acylseitenkette das spektroskopische Verhalten nicht beeinflusst, besitzen alle Capsaicinoide fast den gleichen molaren Absorptionskoeffizienten (SCHWEIGGERT et al., 2006). So konnte die quantitative Zusammensetzung des „Capsaicin-Standards“ mittels der „100%-Methode“ (Normalisierung der Peakflächen) ermittelt werden:

Nordihydrocapsaicin	2,56% ± 0,03%
Capsaicin	76,21% ± 0,22%
Dihydrocapsaicin	20,08% ± 0,07%
Homocapsaicin I	0,60% ± 0,06%
Homocapsaicin II	0,21% ± 0,02%
Homodihydrocapsaicin I	0,09% ± 0,00%
Homodihydrocapsaicin II	0,33% ± 0,04%

Für jedes im Standard enthaltene Capsaicinoid wurde eine Kalibriergerade erstellt, auf deren Basis die Capsaicinoid-Konzentrationen in der Droge und den daraus hergestellten Ölauszügen ermittelt wurden (Tab. H-25 bis Tab. H-27).

**Abb. C-28 UV-Spektrum von Capsaicin**

7.2 Quantitative Bestimmung der Capsaicinoide in der Droge

Der Capsaicinoid-Gehalt der Cayennepfefferfrüchte wurde in der Summe zu $629,6 \pm 5,4$ mg/kg ($n = 6$) bestimmt. In Tab. C-25 sind die gemittelten Gehalte der einzelnen Capsaicinoide aufgelistet (Tab. H-28). Dieser Gehalt kann nach MANIRAKIZA et al. (2003) durch Multiplikation mit Umrechnungsfaktoren (9,3 für Nordihydrocapsaicin und 16,1 für Capsaicin und Dihydrocapsaicin; die anderen Capsaicinoide bleiben unberücksichtigt) in die Scoville-Schärfe-Einheit umgerechnet werden (Kap. B.2.10.2). Für die verwendete Droge ergab sich ein Wert von ca. 9.000 Scoville-Einheiten, womit die Cayennepfefferfrüchte als mittelscharf klassifiziert werden können. Dies bedeutet, dass die Cayennepfefferfrüchte in einer Verdünnung 1 : 9 000 (in Wasser) immer noch als scharf empfunden werden.

Tab. C-25 Gemittelte Capsaicinoid-Konzentrationen in der verwendeten Droge (n=6)

Peak-Nr.	Capsaicinoid	Konzentration
1	Nordihydrocapsaicin	$55,0 \pm 0,6$ mg/kg
2	Capsaicin	$343,4 \pm 2,6$ mg/kg
3	Dihydrocapsaicin	$187,1 \pm 2,1$ mg/kg
4	Homocapsaicin I	$9,8 \pm 0,3$ mg/kg
5	Homocapsaicin II	$10,2 \pm 0,3$ mg/kg
6	Homodihydrocapsaicin I	$3,2 \pm 0,1$ mg/kg
7	Homodihydrocapsaicin II	$21,4 \pm 0,7$ mg/kg
	Summe	$629,6 \pm 5,4$ mg/kg

7.3 Übergangsraten der Capsaicinoide in die Ölauszüge

Der Capsaicinoidgehalt der Ölauszüge W 10% wurde in der Summe zu $42,9 \pm 0,3$ mg/kg ($n = 4$) bestimmt. In Tab. C-26 sind die gemittelten Gehalte der einzelnen Capsaicinoide aufgelistet. Unter Berücksichtigung des DEV von 1:10 bei der Herstellung der Ölauszüge berechnet sich die prozentuale Übergangsrate der Capsaicinoide aus den Cayennepfefferfrüchten in die Ölauszüge W 10% zu $68,1 \pm 3,2\%$ (Abb. C-29).

Tab. C-26 Gemittelte Capsaicinoid-Konzentrationen in den Ölauszügen W 10% (n=4)

Peak-Nr.	Capsaicinoid	Konzentration
1	Nordihydrocapsaicin	$3,8 \pm 0,0$ mg/kg
2	Capsaicin	$237 \pm 0,1$ mg/kg
3	Dihydrocapsaicin	$12,9 \pm 0,2$ mg/kg
4	Homocapsaicin I	$0,6 \pm 0,0$ mg/kg
5	Homocapsaicin II	$0,5 \pm 0,0$ mg/kg
6	Homodihydrocapsaicin I	$0,2 \pm 0,0$ mg/kg
7	Homodihydrocapsaicin II	$1,3 \pm 0,0$ mg/kg
	Summe	$42,9 \pm 0,3$ mg/kg

Der Capsaicinoidgehalt der Ölauszüge H 10% wurde in der Summe zu $53,2 \pm 1,8$ mg/kg ($n = 4$) bestimmt. In Tab. C-27 sind die gemittelten Gehalte der einzelnen Capsaicinoide aufgelistet. Damit berechnet sich die prozentuale Übergangsrate der Capsaicinoide aus den Cayennepfefferfrüchten in die Ölauszüge H 10% zu $84,4 \pm 3,3\%$ (Abb. C-29).

Tab. C-27 Gemittelte Capsaicinoid-Konzentrationen in den Ölauszügen H 10% ($n=4$)

Peak-Nr.	Capsaicinoid	Konzentration
1	Nordihydrocapsaicin	$4,8 \pm 0,2$ mg/kg
2	Capsaicin	$29,5 \pm 0,9$ mg/kg
3	Dihydrocapsaicin	$15,4 \pm 0,6$ mg/kg
4	Homocapsaicin I	$0,8 \pm 0,0$ mg/kg
5	Homocapsaicin II	$0,8 \pm 0,0$ mg/kg
6	Homodihydrocapsaicin I	$0,2 \pm 0,0$ mg/kg
7	Homodihydrocapsaicin II	$1,7 \pm 0,1$ mg/kg
	Summe	$53,2 \pm 1,7$ mg/kg

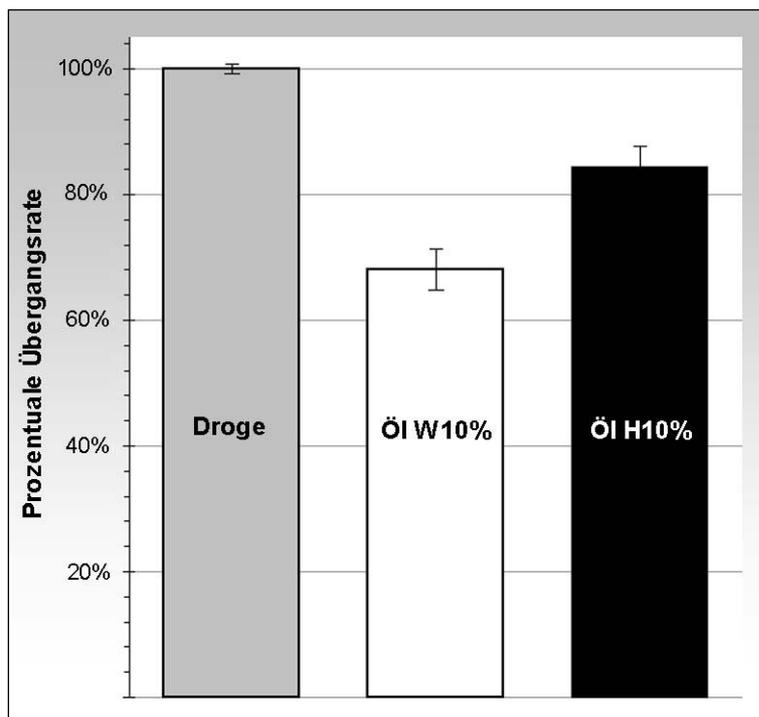


Abb. C-29 Übergangsraten der Capsaicinoide aus den Cayennepfefferfrüchten in die Ölauszüge

In Abb. C-30 sind die Capsaicinoid-Muster der Cayennepfefferfrüchte und der daraus hergestellten Ölauszüge graphisch dargestellt. Man erkennt, dass die Capsaicinoid-Muster der Droge und der Ölauszüge nahezu deckungsgleich sind. Daraus kann abgeleitet werden, dass es beim Übergang aus der Droge in die Ölauszüge zu keiner Diskriminierung einzelner Capsaicinoide kommt.

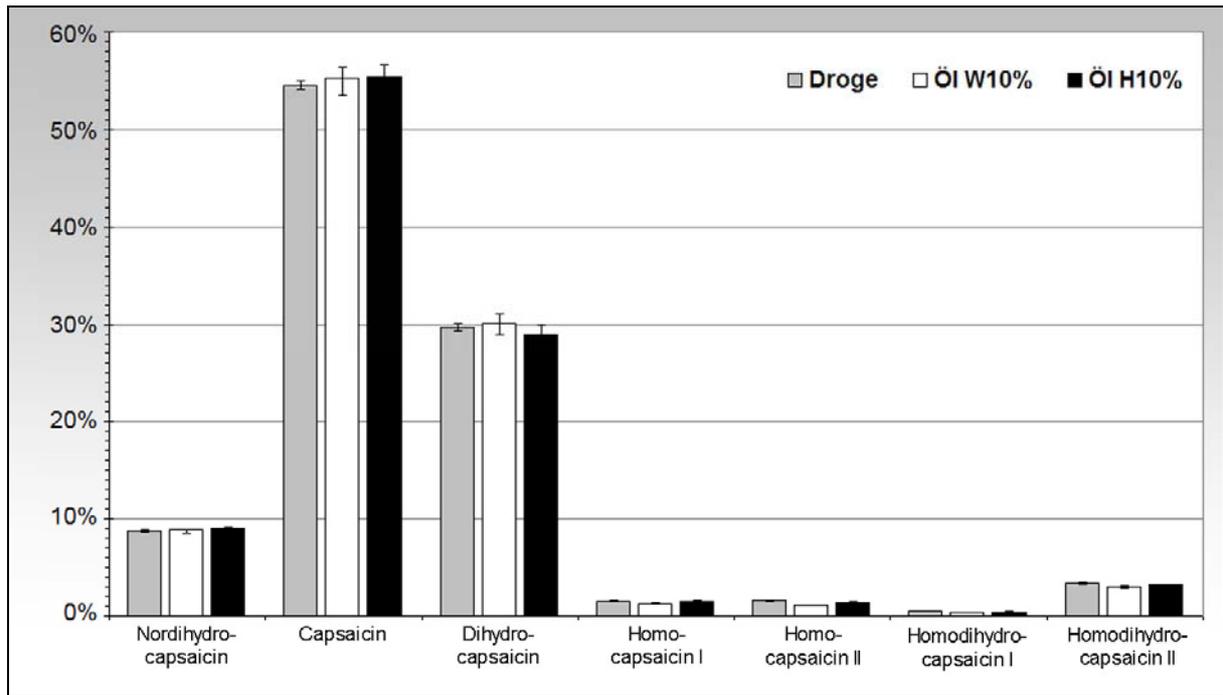


Abb. C-30 Prozentuale Capsaicinoid-Zusammensetzung der Droge und der daraus hergestellten Ölauszüge

8. ALKALOIDE AUS BERBERITZENWURZELRINDE

8.1 Methodenentwicklung

Die Entwicklung der HPLC-Methode erfolgte in Anlehnung an die Methode von WEBER et al. (2001). Die Trennung der stark basischen Protoberberine erfolgte dabei auf RP-18 als stationärer Phase; als Fließmittelsystem wurde eine Mischung von wässrigem Ammoniumacetat-Puffer und Acetonitril verwendet. Der Gradient wurde dabei so eingestellt, dass trotz Tailing eine gute Trennung der einzelnen Alkaloide gewährleistet war (Abb. C-32). Auf einen Zusatz an Ionenpaar-Reagenz zum Fließmittel wurde ausdrücklich verzichtet, um eine Übertragung der entwickelten Methode auf die LC-MS zu ermöglichen. Die Identifizierung der einzelnen Peaks gestaltete sich aufgrund des überschaubaren Chromatogramms und guter publizierter Datenlage als unproblematisch, so dass auf eine Absicherung mittels LC-MS letztlich verzichtet werden konnte (VILLINSKI et al., 2003). Zwar lassen sich die vier Protoberberine Columbamin, Jatrorrhizin, Palmatin und Berberin spektralphotometrisch nicht voneinander unterscheiden (sehr ähnliche UV/VIS-Spektren), die Elutionsreihenfolge in der HPLC wurde von PITEA et al. (1972) übernommen. Daraus ergibt sich eine in Abb. C-32 und Tab. C-28 aufgeführte Zuordnung der Peaks.

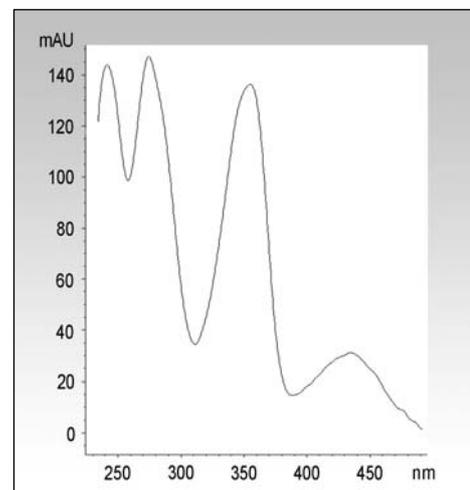


Abb. C-31 UV/VIS-Spektrum von Berberin

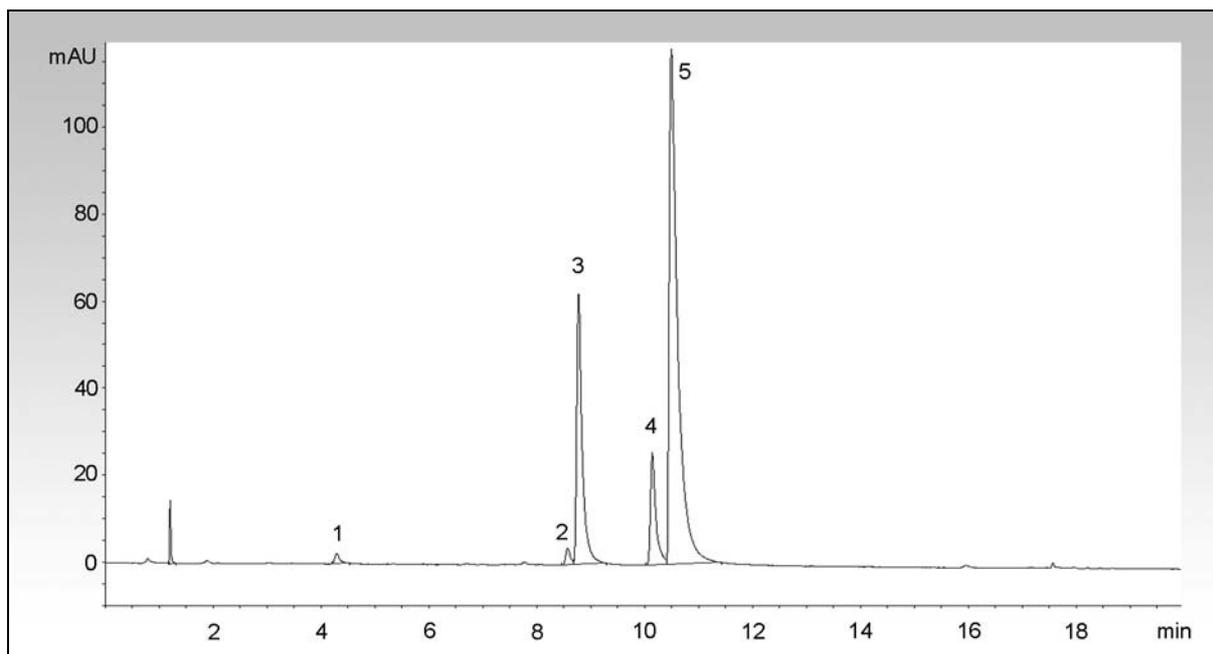


Abb. C-32 HPLC der Protoberberine aus Berberitzenwurzelrinde [Peakidentifikation Tab. C-28]

Tab. C-28 Identifizierte Protoberberine in Berberitzenwurzelrinde

Peak	Retentionszeit (min)	Identität	HPLC-UV/VIS Spektrum, λ_{\max} (nm)
1	4,3	Berbamin/Oxyacanthin	-*
2	8,5	Columbamin	-*
3	8,5	Jatrorrhizin	244, 276, 354, 436
4	10,2	Palmatin	242, 276, 352, 436
5	10,5	Berberin	244, 276, 354, 434

* kein Spektrum, da Peak zu klein

Die Alkaloide wurden mittels einer Berberin-Kalibriergeraden quantifiziert. Diese wurde in einer Mischung aus Acetonitril und 10 mM Ammoniumacetat-Puffer (25+75 VT) aufgenommen (Tab. H-31). Daraus ergab sich für Berberin folgender formelmäßiger Zusammenhang:

$$y = 48,70 x - 1,28 \quad (R^2 = 0,9995)$$

Die Formel enthält einen Umrechnungsfaktor, um vom Hydrochlorid auf die freie Base umzurechnen (Faktor 0,902). Außerdem musste der Wassergehalt des Standards von 5,6% berücksichtigt werden. Die Kalibriergerade ist über den gesamten Bereich (0,45 bis 17,92 mg/L) linear auswertbar, wobei die Nachweisgrenze bei einer Berberinkonzentration der Messlösung von 0,20 mg/L und die Bestimmungsgrenze bei 0,74 mg/L liegen.

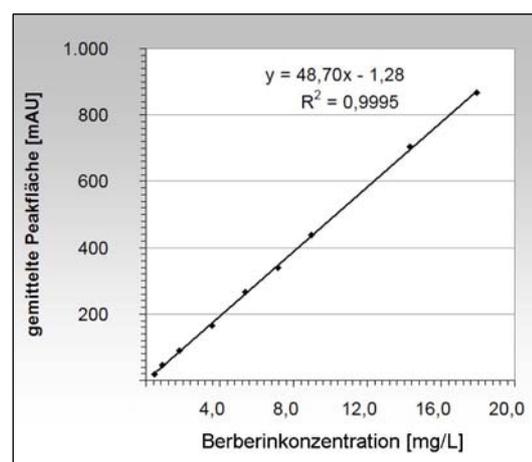


Abb. C-33 Kalibriergerade Berberin

Zur Überprüfung, ob die Extraktions- und Bestimmungsmethode zur Analyse der Protoberberine geeignet ist, wurde Berberin-hydrochlorid in Olivenöl eingewogen und anschließend auf die gleiche Weise bestimmt wie in den Ölauszügen (Kap. C.8.3). Da sich Berberin in der protonierten Form nur sehr schlecht im Öl löste, wurden nur 10 mg Standardsubstanz in 50 g Olivenöl eingewogen und der Ansatz über Nacht homogenisiert. Die Berberinwiederfindungsrate konnte in einer Serie von zwölf Untersuchungen zu $96,7 \pm 1,7$ % bestimmt werden (Tab. H-32). Die Methode ist damit zur Bestimmung geeignet der Isochinolinalkaloide aus Berberitzenwurzelrinde.

8.2 Quantitative Bestimmung der Alkaloide in der Droge

Quantitative Untersuchungen von Berberitzenwurzelrinde sind in der Literatur rar. Daher wurden keine Angaben zur effizienten Extraktion der Alkaloide gefunden. Da andere Arbeitsgruppen insbesondere bei anderen Wurzelrogen gute Erfahrungen mit einer Ultraschall-unterstützten Extraktion machten (Kap. B.2.11.2), sollte in einer Serie von Analysen dafür das beste Lösungsmittelsystem ermittelt werden.

Die Extraktion wurde mit Methanol und Ethanol, sowohl rein als auch in verschiedenen wässrigen Mischungen und unter Zusatz von Säure oder Lauge, durchgeführt. In Tab. C-29 sind die Gesamt-Alkaloidgehalte der Berberitzenwurzelrinde, berechnet als Berberin, in der Summe dargestellt (Tab. H-33 und Tab. H-34). Den Werten liegen Doppelbestimmungen zugrunde, die Werte des effizientesten Extraktionsmittels, 75%iges Methanol mit 1% Ameisensäure, wurden durch achtfache Wiederholung abgesichert. Der Gehalt an den drei Protoberberinen Jatrorrhizin, Palmatin und Berberin in den verwendeten Berberitzenwurzelrinden konnte damit zu $1,7 \pm 0,1$ g/100 g ($n = 8$) ermittelt werden (berechnet als Berberin). Dieser Wert stimmt gut mit dem analysierten Wert von (VILLINSKI et al., 2003) überein, die einen Gesamtalkaloidgehalt von 2,2 g/100 g in den getrockneten Wurzeln bestimmt haben (berechnet als Berberin).

Tab. C-29 Gemittelte Alkaloid-Konzentration in Abhängigkeit vom gewählten Extraktionsmittel (berechnet als Berberin)

Lösungsmittelmischung	Konzentration
Methanol	1,5 ± 0,1 g/100 g
Methanol (75%)	1,3 ± 0,0 g/100 g
Methanol (50%)	1,0 ± 0,0 g/100 g
Methanol (25%)	0,8 ± 0,0 g/100 g
Wasser	0,4 ± 0,0 g/100 g
Methanol (50%) + Ameisensäure [100+1 VT]	1,6 ± 0,0 g/100 g
Methanol (50%) + Ammoniak (konz.) [100+1 VT]	0,9 ± 0,0 g/100 g
Ethanol (75%)	1,3 ± 0,0 g/100 g
Ethanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	1,5 ± 0,0 g/100 g
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	1,7 ± 0,1 g/100 g

8.3 Übergangsrate der Alkaloide in die Ölauszüge

In den Ölauszügen W 10% konnte ein Alkaloidgehalt, berechnet als Berberin, von $49 \pm 2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ($n = 4$) ermittelt werden (Tab. C-30). Unter Berücksichtigung des DEV von 1:10 bei der Herstellung der Ölauszüge, berechnet sich die prozentuale Übergangsrate damit zu unter 0,05%. Der Gesamtalkaloidgehalt der Ölauszüge H 10% wurde zu $0,33 \pm 0,01 \text{ mg}/\text{kg}$ ($n = 4$) bestimmt (Tab. C-31). Damit errechnet sich die prozentuale Übergangsrate hier ebenfalls zu unter 0,05%.

Tab. C-30 Ermittelte Alkaloid-Konzentrationen im Ölauszug W 10% [$\mu\text{g}/100 \text{ g}$]

	Öl 1	Öl 2	Öl 3	Öl 4	Gemittelt
Jatrorrhizin	10,6	10,7	10,1	10,1	10,4
Palmatin	4,4	4,5	4,6	4,7	4,5
Berberin	36,2	36,2	33,1	34,0	34,9
Summe	51,3	51,4	47,8	48,8	49,8

Tab. C-31 Ermittelte Alkaloid-Konzentrationen im Ölauszug H 10% [$\mu\text{g}/100 \text{ g}$]

	Öl 1	Öl 2	Öl 3	Öl 4	Gemittelt
Jatrorrhizin	17,7	17,4	14,0	13,7	15,7
Palmatin	6,1	6,1	4,8	5,0	5,5
Berberin	56,5	55,0	40,1	40,4	48,0
Summe	80,3	78,5	59,0	59,0	69,2

9. VARIATION DER HERSTELLUNGSBEDINGUNGEN DER ÖLAUSZÜGE

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Ölauszüge W 10% und H 10% des HAB mit einander verglichen. In diesem Kapitel soll der Einfluss der Extraktionsbedingungen und Extraktionsmethoden (Extraktionstemperatur und -dauer, kontinuierliches Rühren, Vorbehandlung der Droge) auf die Qualität der Ölauszüge genauer beleuchtet werden. Als Kriterium für diese Qualität gelten die Übergangsraten und die Zusammensetzung der Pflanzeninhaltsstoffe sowie die Beschaffenheit der Ölauszüge. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ermöglichen Aussagen darüber, wie die Herstellung von Ölauszügen generell optimiert werden können und zeigen, wo die Herstellungsvorschriften des HAB im Bezug zum Qualitätsoptimum stehen.

Es wurden die Parameter Extraktionstemperatur (20, 35, 50 und 65°C) und Extraktionszeitraum (2, 4, 12, 24, 48, 168 und 336h) variiert. Auch die Drogenvorbehandlung (Zusatz von Ethanol 94%) und die Art der Durchmischung des Extraktionsansatzes wurden verändert. Als Öl wurde raffiniertes Olivenöl und als Droge Kamillenblüten verwendet, deren lipophile und hydrophile Inhaltsstoffe am besten bekannt sind. Betrachtet werden dabei das ätherische Öl, die phenolischen Komponenten (Cumarine, Phenolcarbonsäure-Derivate, Flavonoidglykoside und Flavonoidaglyka) sowie die Carotinoide. Die analytischen Methoden zur Erfassung der Pflanzeninhaltsstoffe in den Ölauszügen, sind in den Kapiteln 2, 3 und 5 bereits dargestellt. Insgesamt wurden so 42 Ölauszüge hergestellt und untersucht (Tab. C-32).

Tab. C-32 Variation der Extraktionsbedingungen bei der Herstellung der Ölextrakte

		Extraktionstemperatur →					
		20°C	20°C	35°C	35°C	50°C	65°C
← Extraktionsdauer	2 h	rühren	schütteln	schütteln, EtOH	schütteln	schütteln	schütteln
	4 h	rühren	schütteln	schütteln, EtOH	schütteln	schütteln	schütteln
	12 h	rühren	schütteln	schütteln, EtOH	schütteln	schütteln	schütteln
	24 h	rühren	schütteln	schütteln, EtOH	schütteln	schütteln	schütteln
	48 h	rühren	schütteln	schütteln, EtOH	schütteln	schütteln	schütteln
	168 h	rühren	schütteln	schütteln, EtOH	schütteln	schütteln	schütteln
	336 h	rühren	schütteln	schütteln, EtOH	schütteln	schütteln	schütteln

Rühren: kontinuierliches Rühren über die gesamte Extraktionsdauer hinweg

Schütteln: alle 24h kräftiges Schütteln des Extraktionsansatzes für ca. 5 min.

EtOH: Vorbehandlung der Droge mit Ethanol (94%)

9.1 Beschaffenheit der Ölauszüge

Zur Beurteilung der Ergebnisse ist es notwendig, zunächst die Beschaffenheit der Ölauszüge nach der Extraktion zu betrachten. Nach einer 168 bzw. 336 h dauernden Extraktion bei 65°C war sensorisch ein stark ranziger Geruch wahrnehmbar. Außerdem veränderte sich die Farbe von ursprünglich gelblich-grün in dunkelbraun. Bei diesen Bedingungen traten offenbar starke Veränderungen bis hin zum Verderb der Ölbestandteile auf, die auch die zu extrahierende Droge in Mitleidenschaft zogen. Daraus resultierten analytische Probleme, insbesondere bei der Bestimmung des prozentualen Übergangs der phenolischen Komponenten, so dass diese Werte nicht ausgewertet wurden. Das kontinuierliche Rühren des Extraktionsansatzes verursachte nach längerer Zeit eine starke Trübung der resultierenden Ölauszüge, die auch durch mehrmaliges Kolieren nicht beseitigt werden konnte. Diese Trübung führte auch zu Problemen bei der Analytik, insbesondere bei der photometrischen Bestimmung der Carotinoide. Aus diesem Grund konnten die Ergebnisse der 168 und 336h dauernden Extraktion unter kontinuierlichem Rühren ebenfalls nicht ausgewertet werden.

9.2 Ätherisches Öl

Der Gehalt an ätherischem Öl in der Ausgangsdroge betrug 6,8 mL/kg. In den Ölauszügen wurden Gehalte von 4,8 mL/kg bis 6,3 mL/kg ermittelt (Tab. H-35). Dies entspricht bezogen auf die Ausgangsdroge (DEV 1:10) einem prozentualen Übergang von 70 bis 92%. In Abb. C-34 sind die Übergangsraten des ätherischen Öls, aus der Droge in die Ölauszüge, in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen dargestellt. In zwei Messreihen konnten jeweils ein Messwert nicht ermittelt werden (35°C +EtOH für 2h und 65°C für 168h). Über die beiden fehlenden Messpunkte wurden die Kurven in Abb. C-34 hinweg extrapoliert.

Bei der Betrachtung der asymptotischen Kurvenverläufe in Abb. C-34 wird ein starker Einfluss der Extraktionstemperatur und Extraktionsdauer deutlich. Je höher die Extraktionstemperatur, desto höher lag der maximal erreichbare Gehalt an ätherischem Öl im Ölauszug. So wurden bei den Ölauszügen, die bei 65°C extrahiert wurden, die höchsten Gehalte an ätherischem Öl im Ölauszug nachgewiesen. Diese Gehalte konnten bei 20°C oder 35°C selbst nach 14 Tagen Extraktion nicht erreicht werden. Bemerkenswert ist, dass durch kontinuierliches Rühren bei 20°C nach 14 Tagen ähnlich hohe Gehalte an ätherischem Öl im Ölauszug erreicht wurden wie bei einer ebenso lang dauernden Extraktion bei 65°C ohne Rühren. Die Vorbehandlung der Droge mit Ethanol erhöht ebenfalls den Gehalt an ätherischem Öl in den Ölauszügen.

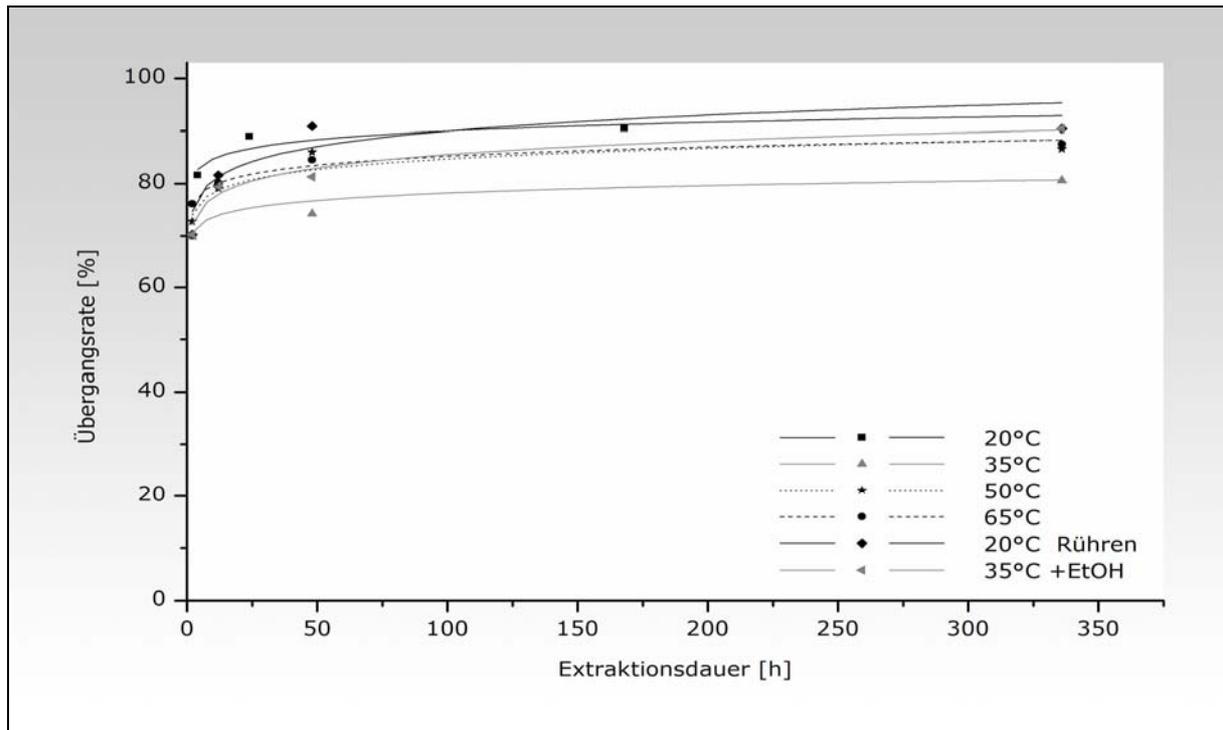


Abb. C-34 Übergangsraten des ätherischen Öls aus der Droge in die Ölauszüge in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen

Parallel zur quantitativen Bestimmung des Gehaltes an ätherischem Öl wurde die Zusammensetzung der ätherischen Öle untersucht (Kap. 2.6 und 2.7). Zur Präsentation der Ergebnisse wurden jeweils für die acht Hauptverbindungen (Farnesen, Spathulenol, Bisabololoxid B, Bisabolonoxid A, Bisabolol, Chamazulen, Bisabololoxid A und Spiroether) die prozentualen Zusammensetzungen der ätherischen Öle ermittelt. Diese sind für die verwendeten Kamillenblüten in Abb. C-35 dargestellt (Tab. H-36). Man erkennt, dass die Hauptkomponente Bisabololoxid A ist, d.h. es handelt sich bei der verwendeten Droge wieder um den Bisabololoxid A-reichen Typus.

Die Zusammensetzung der ätherischen Öle der Pressrückstände werden in den Abb. C-36 bis Abb. C-41 präsentiert (Tab. H-37 bis Tab. H-42). Man erkennt, dass diese sich innerhalb einer Messreihe (Extraktion bei gleicher Temperatur) bei länger andauernder Extraktion immer mehr voneinander entfernen. Auch veränderten sich prozentual die Werte der Ölkompnenten in Abhängigkeit von der Extraktionstemperatur.

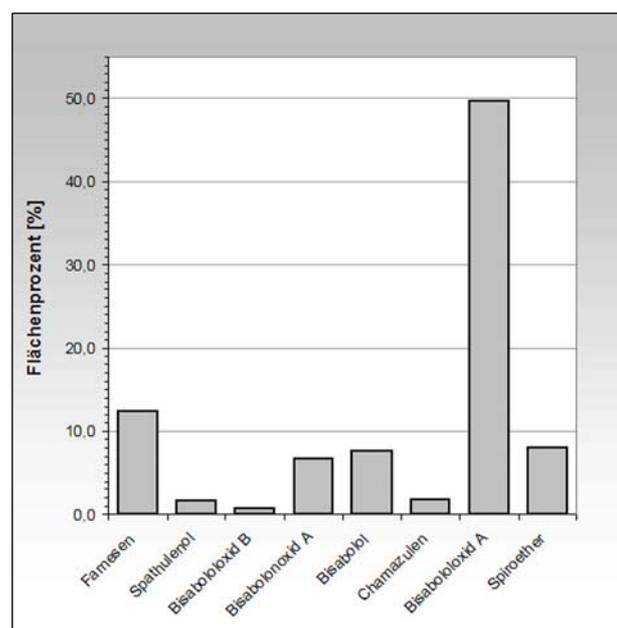


Abb. C-35 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Droge

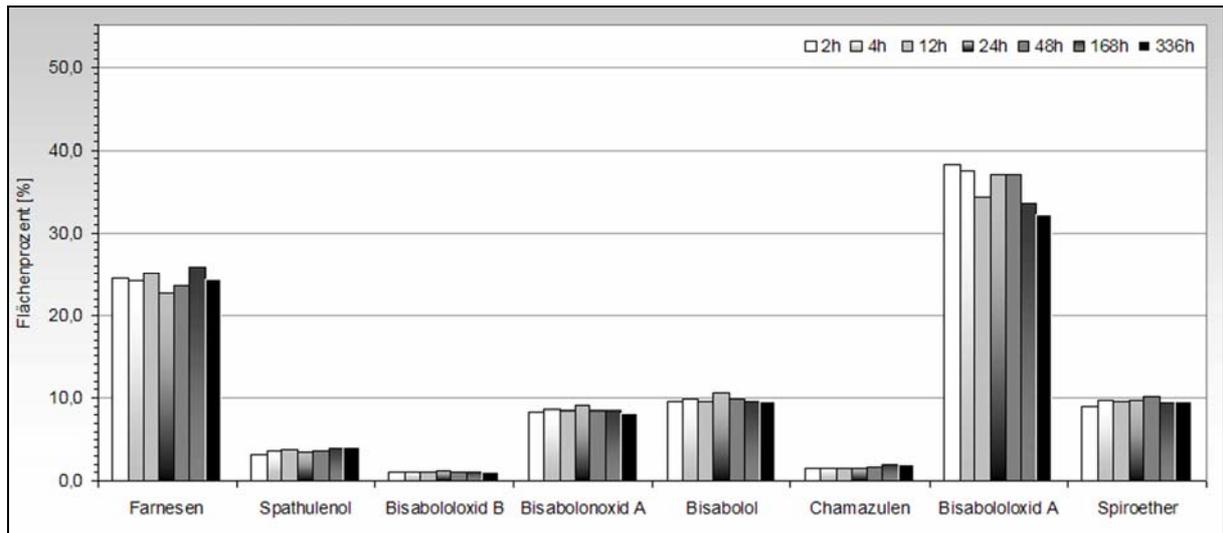


Abb. C-36 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Pressrückstände, bei 20°C

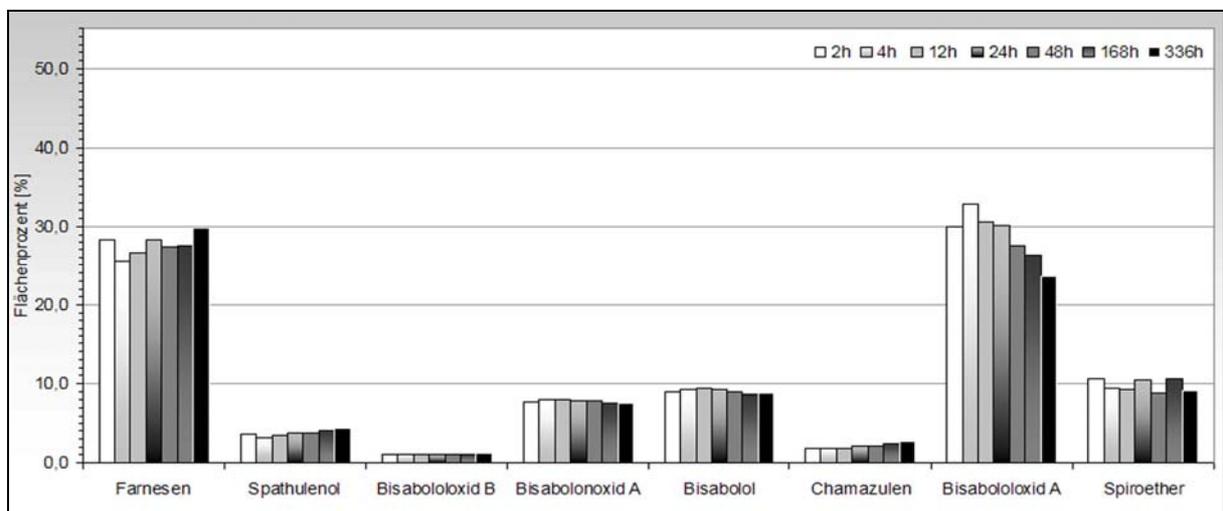


Abb. C-37 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Pressrückstände, bei 35°C

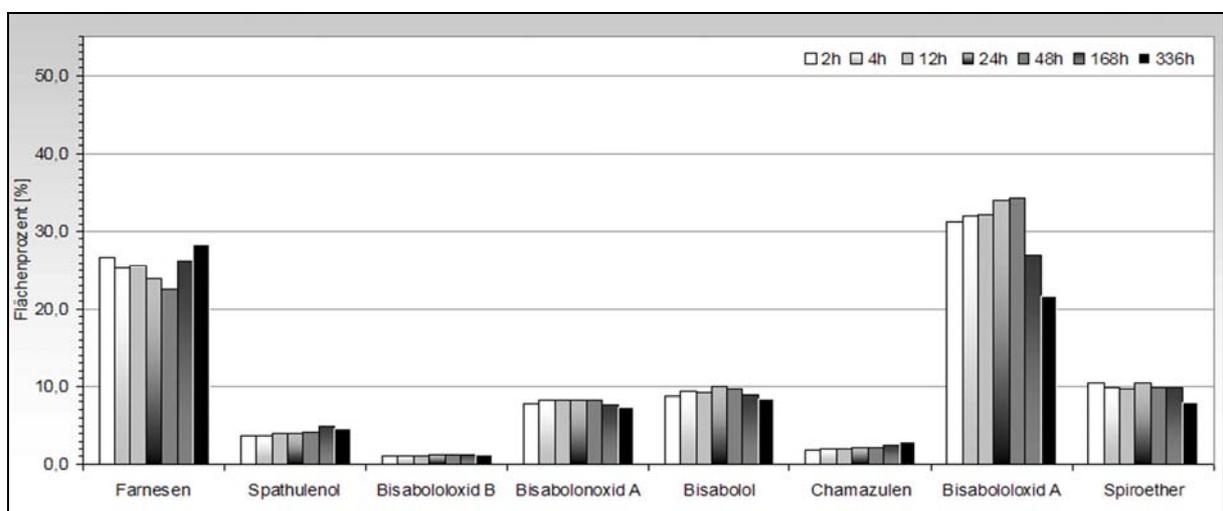


Abb. C-38 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Pressrückstände, bei 50°C

C ERGEBNISSE

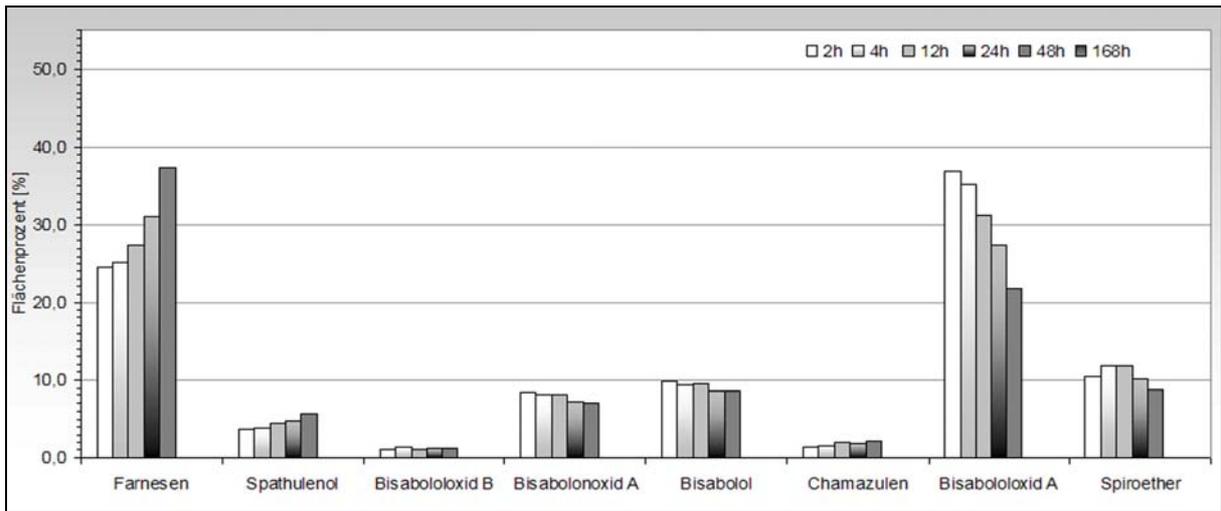


Abb. C-39 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Pressrückstände, bei 65°C

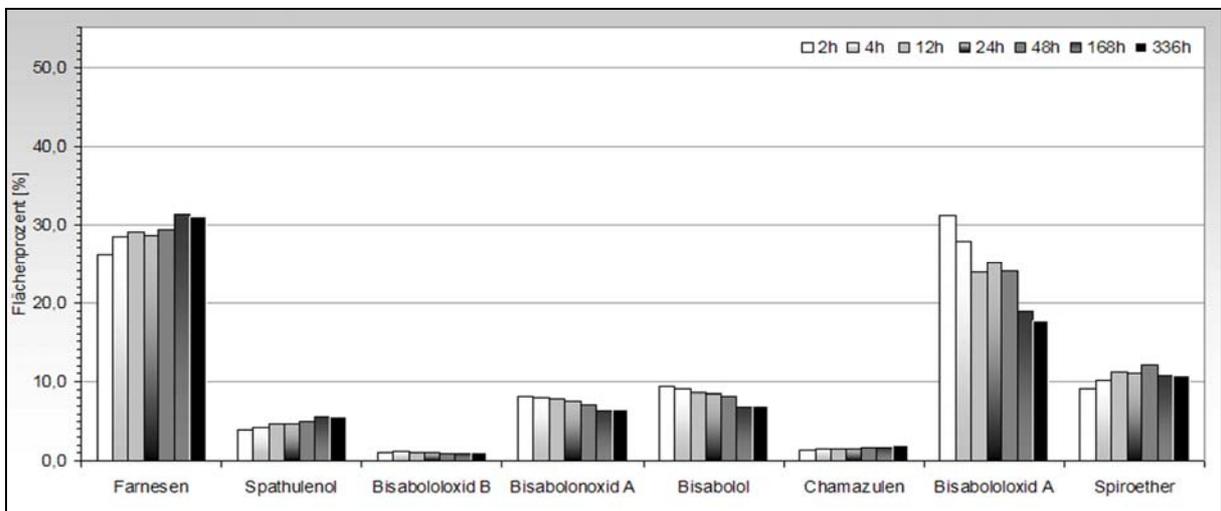


Abb. C-40 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Pressrückstände, bei 20°C unter kontinuierlichem Rühren

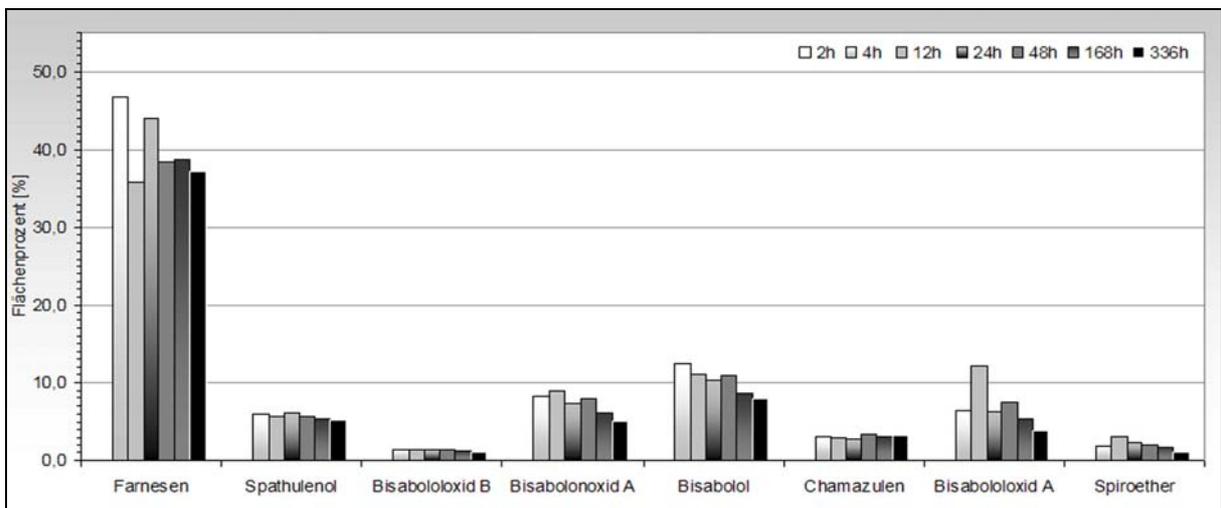


Abb. C-41 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Pressrückstände, bei 35°C nach Vorbehandlung der Droge mit Ethanol 94%

Da es sich bei diesen Experimenten nur um eine indirekte Bestimmung handelte, lässt sich damit keine Aussage darüber machen, ob das ätherische Öl in den Ölauszügen auch diesen Veränderungen der Zusammensetzung unterworfen ist. Um dies festzustellen, wurden die Ölauszüge verseift und das ätherische Öl anschließend extrahiert und direkt mittels GC analysiert. In den folgenden Abbildungen Abb. C-42 bis Abb. C-47 sind die Zusammensetzungen der ätherischen Öle aus den Ölauszügen in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen zusammengestellt (Tab. H-43 bis Tab. H-48):

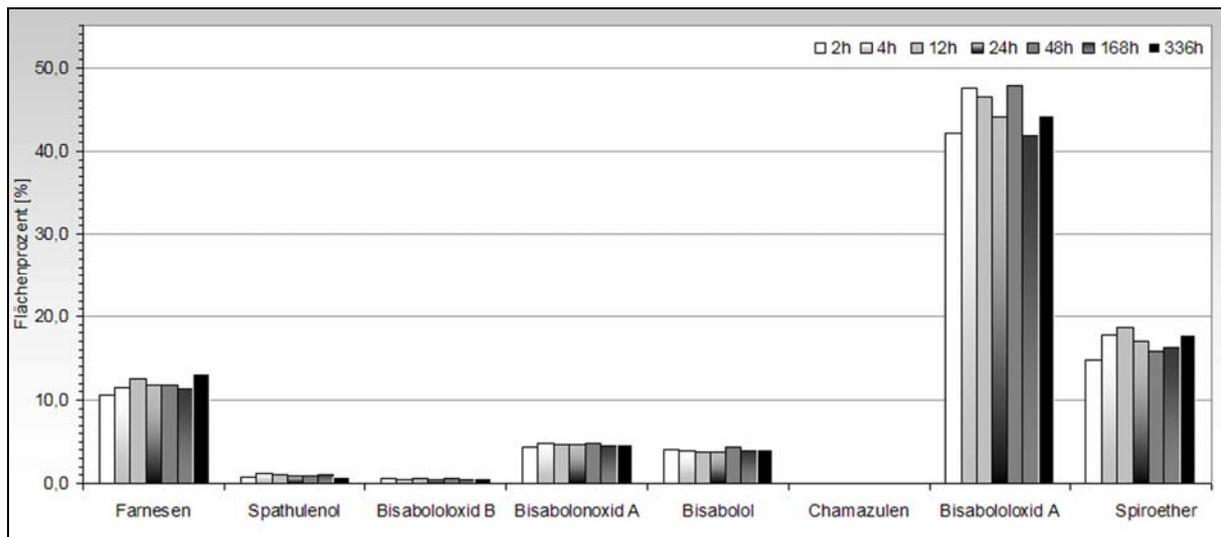


Abb. C-42 Zusammensetzung des ätherischen Öls der Ölauszüge nach Verseifung, bei 20°C

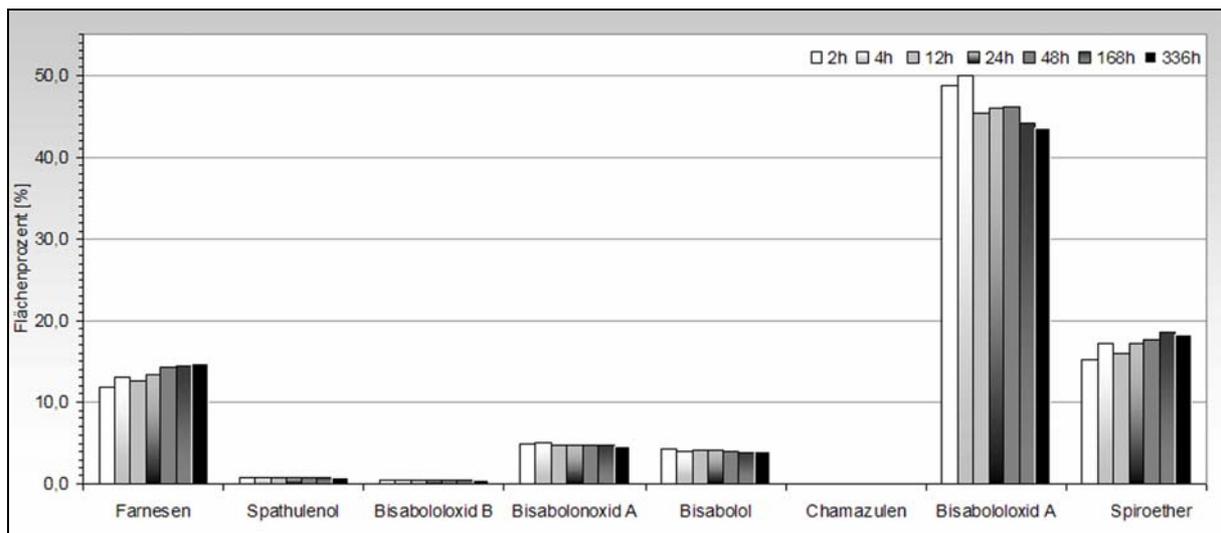


Abb. C-43 Zusammensetzung des ätherischen Öls der Ölauszüge nach Verseifung, bei 35°C

C ERGEBNISSE

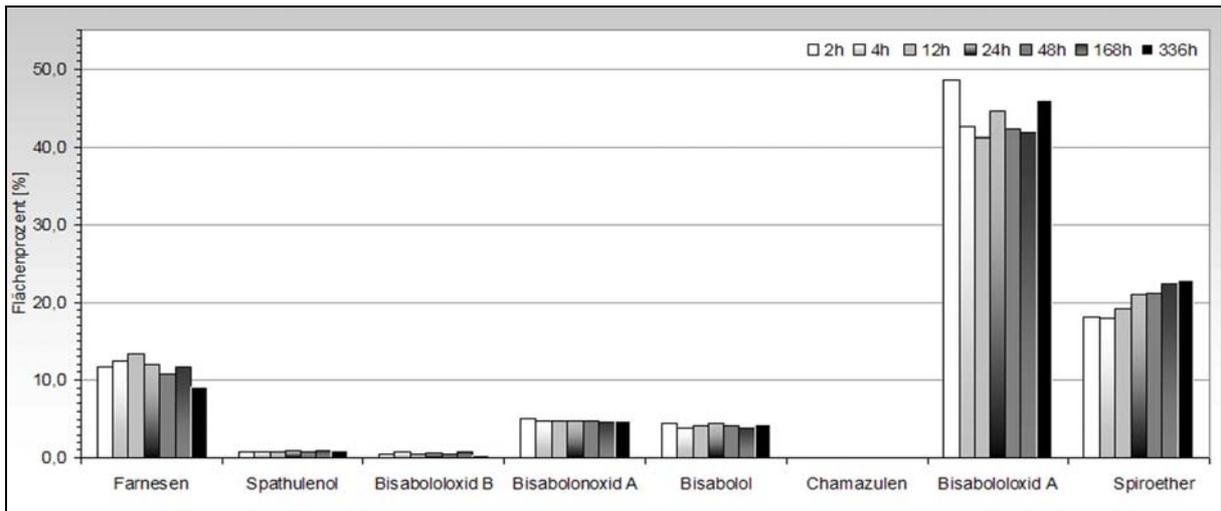


Abb. C-44 Zusammensetzung des ätherischen Öls der Ölauszüge nach Verseifung, bei 50°C

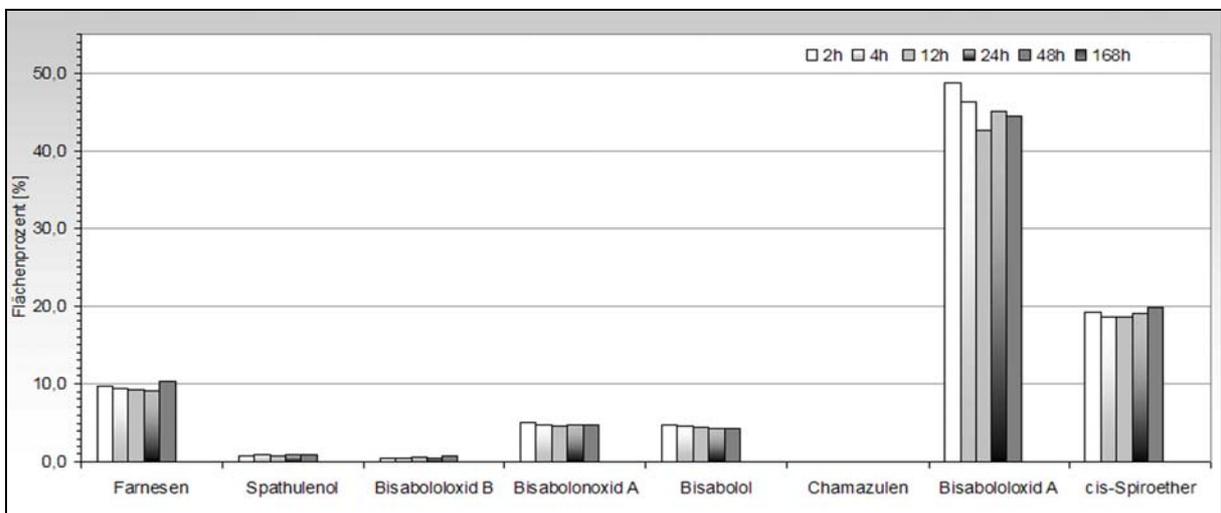


Abb. C-45 Zusammensetzung des ätherischen Öls der Ölauszüge nach Verseifung, bei 65°C

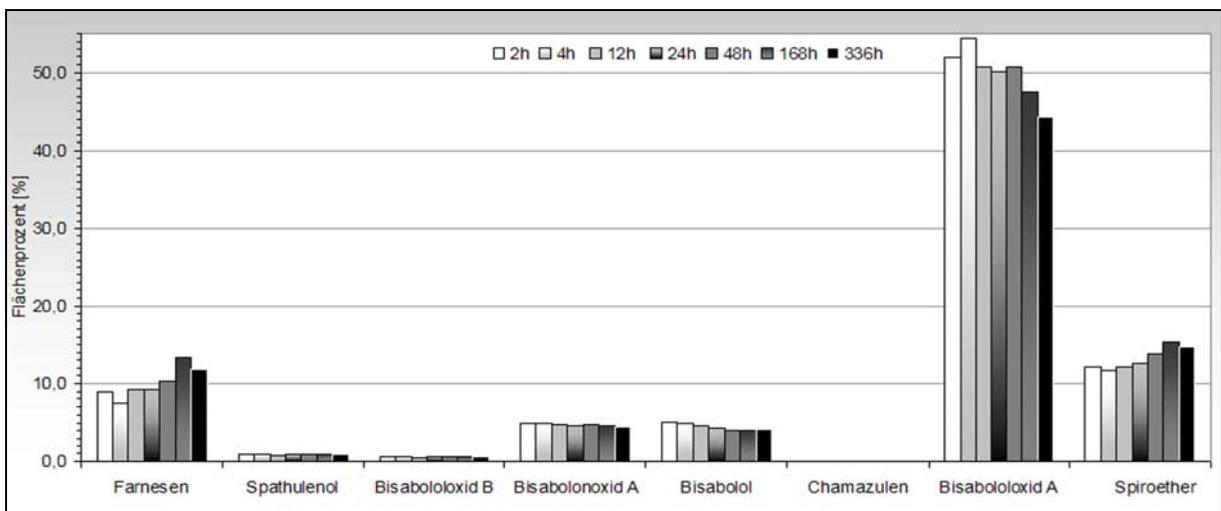


Abb. C-46 Zusammensetzung des ätherischen Öls der Ölauszüge nach Verseifen, bei 20°C unter kontinuierlichem Rühren

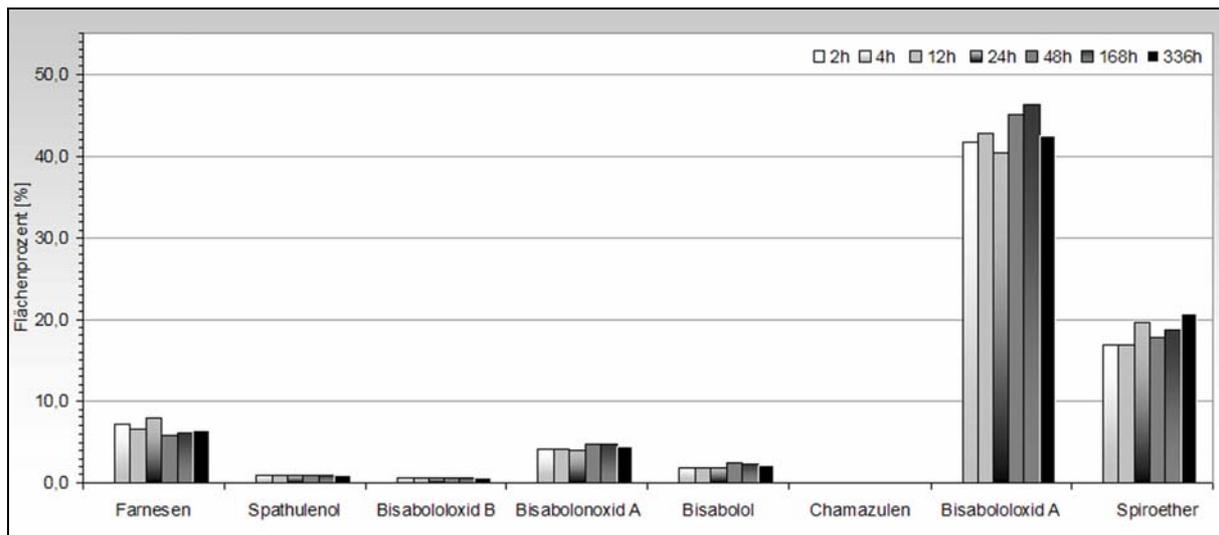


Abb. C-47 Zusammensetzung des ätherischen Öls der Ölauszüge nach Verseifung, bei 35°C nach Vorbehandlung der Droge mit Ethanol 94%

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass sich die Zusammensetzung der ätherischen Öle aus den Ölauszügen vom dem der Ausgangsdroge unterscheiden (Abb. C-42 bis Abb. C-47 und Abb. C-35). Jedoch sind diese Veränderungen geringer, als man nach den Experimenten mit den Pressrückständen erwarten würde. So variiert beispielsweise der Anteil der Spiroether in den ätherischen Ölen der Ölextrakte von 12 bis 25%, im ätherischen Öl der Kamillenblüten besitzen die Spiroether jedoch nur einen Anteil von 8%. Auch der Gehalt der Hauptkomponente Bisabololoxid A schwankt stark von 40 bis 54% im Vergleich zu den Kamillenblüten, in denen es zu fast 50% enthalten ist.

9.3 Phenolischen Komponenten

Die Gruppe der phenolischen Komponenten aus Kamillenblüten beinhaltet Phenolcarbonsäuren, Cumarine, Flavonoidglyka und Flavonoidglykoside (Tab. C-12). Die Phenolcarbonsäuren und deren Derivate sowie die Flavonoidglykoside konnten selbst in den bei 65°C hergestellten Ölauszügen nur in Spuren gefunden werden. Die in die Ölauszüge übergehenden phenolischen Komponenten wurden in vier Gruppen zusammengefasst (Tab. C-12, Kap C.3.2). Dabei stellen die methoxylierten Flavonoidglyka mit sechs Vertretern die größte Gruppe und den größten Anteil an phenolischen Komponenten in den Ölauszügen dar. Die Kurven der ermittelten Übergangsraten (Abb. C-48 bis Abb. C-51) zeigen alle einen asymptotischen Verlauf: mit steigender Extraktionsdauer steigt die Übergangsrate meist steil an und flacht ab einem bestimmten Zeitpunkt ab (Tab. H-49 bis Tab. H-54). In den folgenden Absätzen sind die Ergebnisse der phenolischen Gruppen im Einzelnen genauer dargestellt.

Die Cumarine der Kamillenblüten, Herniarin und Umbelliferon, sind zusammen in den Kurven in Abb. C-48 anhand ihrer prozentualen Übergangsraten aus der Droge in die Ölauszüge dargestellt. In Abhängigkeit von den Herstellungsbedingungen konnten für die beiden Cumarine prozentuale Übergangsraten von 10 bis 98 % ermittelt werden. Je höher die Extraktionstemperatur und je länger die Extraktionsdauer, desto höher lagen die Übergangsraten. Dauerhaftes Rühren über den gesamten Extraktionszeitraum zeigte keine positiven Effekte, die Vorbehandlung der Droge mit Ethanol dagegen erhöhte die Übergangsrate drastisch auf bis zu 75 % im Vergleich zu 35 % ohne Vorbehandlung.

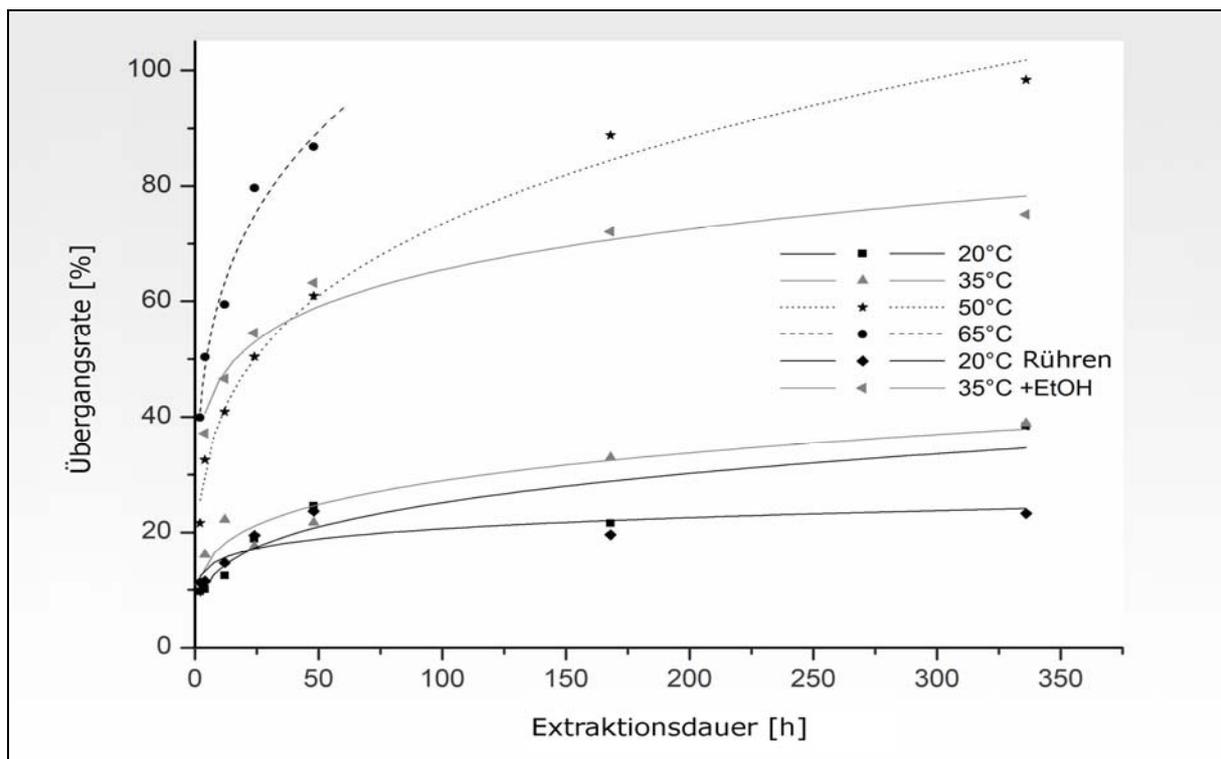


Abb. C-48 Übergangsraten der Cumarine aus Kamillenblüten in die Ölextrakte in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen

Die Übergangsraten der Flavonoide sind in Abb. C-49 bis Abb. C-51 in drei Gruppen aufgeschlüsselt: die methoxylierten, die nicht methoxylierten Flavonoidaglyka und die acylierten Flavonoidglucoside (vgl. Tab. C-12). Grundsätzlich kann festgestellt werden, dass Extraktionen bei höheren Temperaturen und längerer Dauer effizienter waren. Die höchsten prozentualen Übergangsraten konnten bei den methoxylierten Flavonoidaglyka mit 24 bis 79 % bestimmt werden (Abb. C-49). Ein positiver Effekt durch das permanente Rühren über die gesamte Extraktionsdauer hinweg wurde ebenfalls beobachtet. So erhöhte sich der höchste Gehalt durch das Rühren von 55 auf 65 %, verbunden mit einem deutlich steileren Anstieg der Übergangsrate innerhalb der ersten Tage der Extraktion. Aber auch die Vorbehandlung der Droge mit Ethanol hatte einen bemerkenswerten Anstieg des Gehaltes der methoxylierten Flavonoidaglyka in den Ölauszügen zur Folge.

Die prozentualen Übergangsraten der acylierten Flavonoidglucoside in Abb. C-50 lagen deutlich unter den Werten der methoxylierten Flavonoidaglyka (siehe auch Kap. C.3.2). Die Spanne der Übergangsraten reichte hier von 3 bis 46 %. Dabei überstiegen die Übergangsraten bei 20°C und 35°C kaum 10 %. Dauerhaftes Rühren zeigte auch nur am ersten Tag der Extraktion einen schwachen positiven Effekt, danach brachte es keine weitere Erhöhung der Übergangsraten. Je höher die Temperatur während der Extraktion, desto höher war der Gehalt an acylierten Flavonoidglucosiden in den Ölauszügen. So konnten beispielsweise in den Ölauszügen, die bei 50°C hergestellt wurden, prozentuale Übergangsraten von bis zu 41 % ermittelt werden. Ein ähnlicher Wert wurde bei 65°C bereits nach zwei Tagen erreicht.

Die Übergangsraten der nicht methoxylierten Flavonoidaglyka fallen mit 2 bis 35 % am geringsten aus (Abb. C-51). Dabei lagen die Übergangsraten bei 20°C und 35°C unter 10%. Die höchsten Werte wurden wieder bei höheren Temperaturen erreicht. Dauerhaftes Rühren hatte keinen Effekt; die Vorbehandlung der Droge mit Ethanol erhöhte jedoch die prozentuale Übergangsrate nahezu um das Vierfache. Es wurden dadurch Werte von bis zu 35 % erreicht.

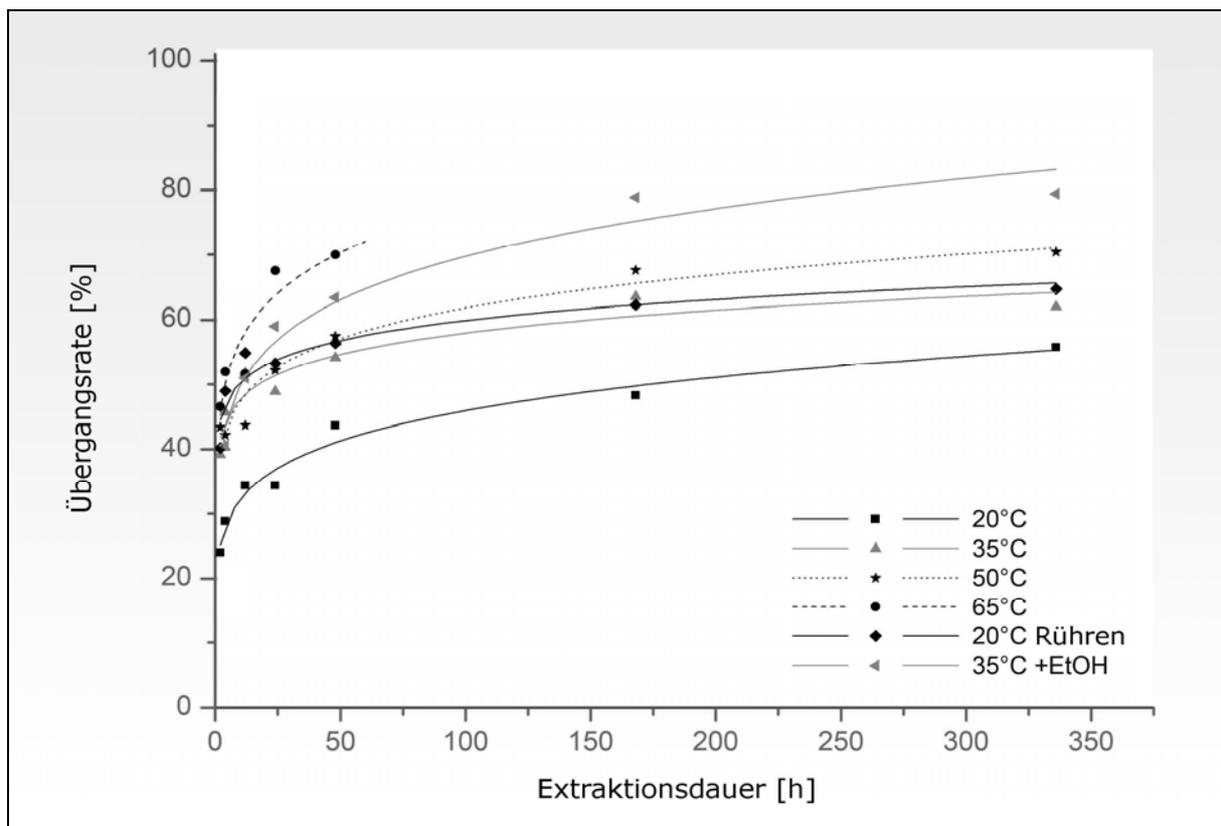


Abb. C-49 Übergangsraten der methoxylierten Flavonoidaglyka aus Kamillenblüten in die Ölextrakte in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen

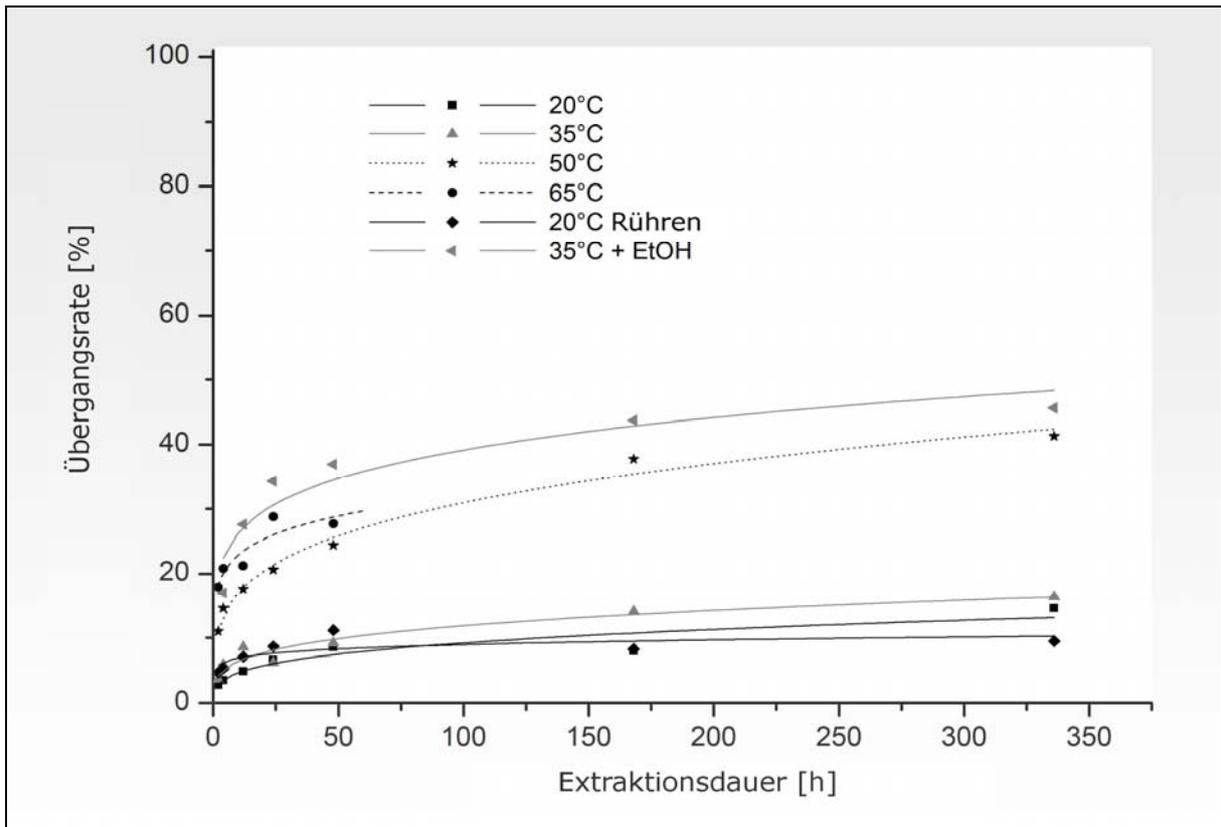


Abb. C-50 Übergangsraten der acylierten Flavonoidglucoside aus Kamillenblüten in die Ölextrakte in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen

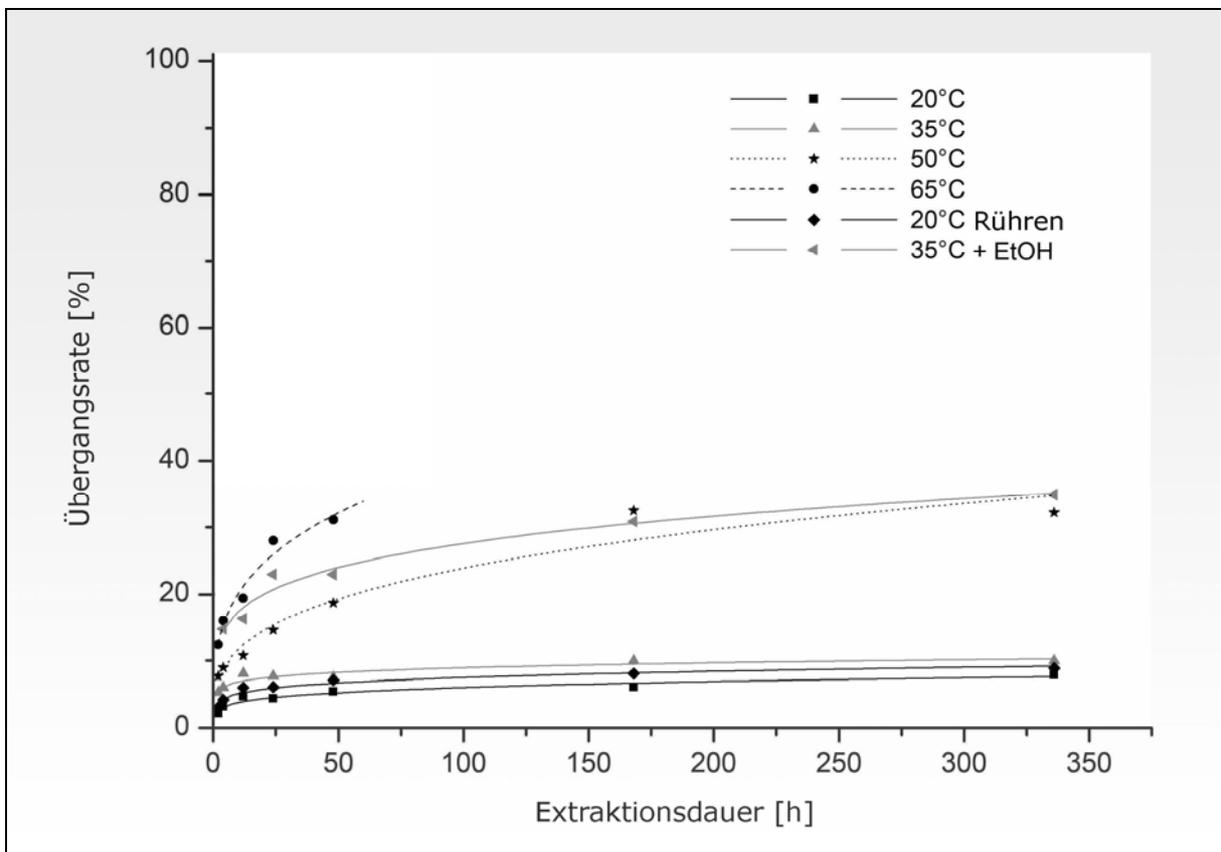


Abb. C-51 Übergangsraten der Flavonoidaglyka (nicht methoxyliert) aus Kamillenblüten in die Ölextrakte in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen

9.4 Carotinoide

Zur Bestimmung der Carotinoide wurden die Ölauszüge in tert-Butyl-methylether (TBME) verdünnt und in der Summe mittels UV/VIS-Spektralphotometrie bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt (vgl. Kap. C.5). Der Carotinoidgehalt der verwendeten Kamillenblüten wurde zu 83,6 mg/kg (berechnet als β -Carotin) bestimmt. In den untersuchten Ölauszügen konnten Gehalte von 2,6 bis 7,3 mg/kg ermittelt werden. Bezogen auf die Ausgangsdroge (DEV 1:10) entspricht dies prozentualen Übergangsraten von 31 bis 87%. Aus den in Abb. C-52 dargestellten Kurven ist zu entnehmen, dass wiederum hohe Temperaturen und lange Dauer der Extraktion den Carotinoidgehalt der Ölauszüge erhöhten. Permanentes Rühren über einen längeren Zeitraum erhöhte zwar auch den Carotinoidgehalt, jedoch entstanden dabei durch mechanischen Abrieb starke Trübungen, die eine Messung unmöglich machte (vgl. Kap. C.9.1). Vorbehandlung der Droge beschleunigte den Übergang der Carotinoide der aus den Ringelblumenblüten in die Ölauszüge insbesondere innerhalb der ersten Tage der Extraktion, jedoch konnte die Ausbeute damit nicht erhöht werden.

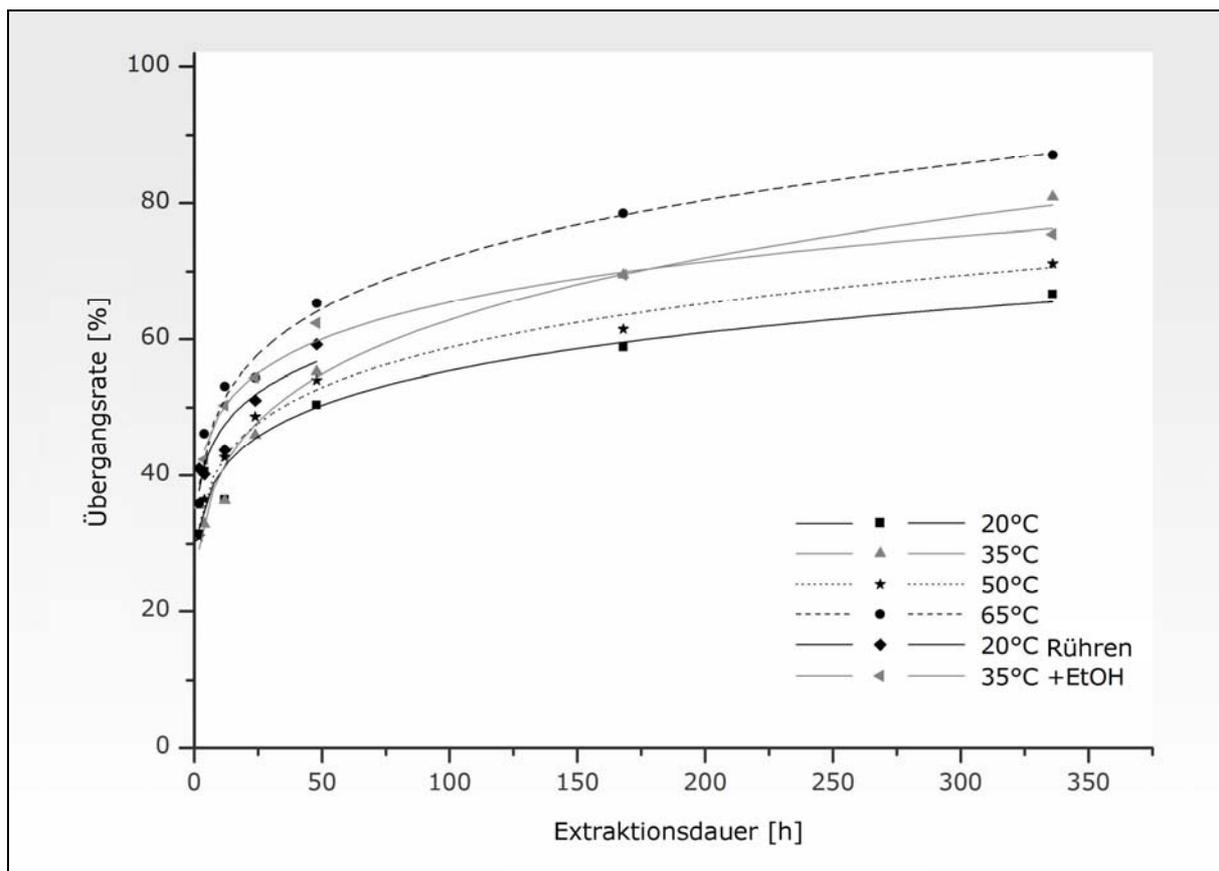


Abb. C-52 Prozentuale Übergangsraten der Carotinoide aus den Kamillenblüten in die Ölauszüge in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen

10. ZUSAMMENFASSUNG DER EXPERIMENTELLEN DATEN

Tab. C-33 Zusammenfassung der Übergangsraten der untersuchten Stoffgruppen aus der Droge in die Ölauszüge W 10% bzw. H 10%

Stoffgruppe	Droge	Ölauszüge W 10%	Ölauszüge H 10%	Kap.
Sesquiterpenlactone	Arnikablüten	81,2 ± 1,0 %	70,9 ± 0,9 %	1.3
ätherisches Öl	Kamillenblüten	83,8 ± 2,4 %	79,5 ± 2,4 %	2.3
Phenolcarbonsäuren	Kamillenblüten	-	-	3.2
Flavonoidglykoside	Kamillenblüten	-	-	3.2
acylierte Flavonoidglucoside	Kamillenblüten	22,7 ± 2,7 %	38,4 ± 4,5 %	3.2
hydroxylierte Flavonoidalgyka	Kamillenblüten	11,0 ± 5,3 %	26,5 ± 5,6 %	3.2
methoxylierte Flavonoidaglyka	Kamillenblüten	61,3 ± 6,6 %	71,5 ± 5,3 %	3.2
Cumarine	Kamillenblüten	37,1 ± 3,8 %	61,1 ± 5,6 %	3.2
Anthocyane	Stockrosenblüten	0,10 ± 0,02%	0,09 ± 0,02%	4.2
Carotinoide	Ringelblumenblüten	50,0 ± 1,6 %	40,8 ± 1,0%	5.2
Sterole	Ringelblumenblüten	11,3 ± 2,5%	3,1 ± 2,4%	6.4
Triterpen-monoalkohole	Ringelblumenblüten	30,1 ± 3,1%	22,3 ± 3,6%	6.4
Triterpen-dialkohole	Ringelblumenblüten	48,9 ± 2,8%	31,2 ± 2,6%	6.4
Triterpen-trialkohole	Ringelblumenblüten	85,4 ± 3,4%	73,4 ± 3,5%	6.4
Capsaicinoide	Cayennpfefferfrüchte	68,1 ± 3,2%	84,4 ± 3,3%	7.3
Alkaloide	Berberitzen wurzelrinde	unter 0,05%	unter 0,05%	8.3

10.1 Sesquiterpenlactone aus Arnikablüten

In den Arnikablüten wurden zwölf Sesquiterpenlactone detektiert. Von der Gesamtmenge der in der Droge enthaltenen Sesquiterpenlactone gingen 81% in die Ölauszüge W 10% und 71% in die Ölauszüge H 10% über. Demnach besitzt das Olivenöl eine sehr gute Extraktionskraft für Sesquiterpenlactone. Die niedrigere Übergangsrate beim Ölauszug H 10% zeigt, dass eine Extraktionsdauer von 4 h nicht ausreicht um die Sesquiterpenlactone effizient zu extrahieren. Bemerkenswert ist, dass die Sesquiterpenlacton-Muster im Vergleich zur Droge in beiden Ölauszügen fast gleich sind.

10.2 Ätherisches Öl aus Kamillenblüten

In den Kamillenblüten wurde ein Gehalt an ätherischem Öl von 4,65 mL/kg ermittelt. In den Pressrückständen der Ölauszüge wurden Gehalte von 0,75 mL/kg (W 10%) bzw. 0,95 mL/kg (H 10%) ermittelt. Daraus errechnen sich Übergangsraten des ätherischen Öls aus der Droge in die Ölauszüge W 10% von 84% und in die Ölauszüge H 10% von 80%.

Dies bedeutet, dass die Extraktionskraft von Olivenöl für ätherisches Öl ebenso gut ist wie für Sesquiterpenlactone. Die nahezu gleichen Werte für beide Ölauszüge zeigen, dass hier eine kurze Extraktionsdauer durch die hohe Temperatur nahezu ausgeglichen wird. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Muster der ätherischen Öle der beiden Ölauszüge ähneln, sich jedoch von der Droge, aufgrund von einander unterscheidender Analysemethoden (Wasserdampfdestillation bzw. Verseifung und Extraktion), unterscheiden.

10.3 Phenolische Komponenten aus Kamillenblüten

Als phenolische Inhaltsstoffe der Kamillenblüten wurden Phenolcarbonsäure-Derivate, Flavonoide und Cumarine bestimmt. Die Phenolcarbonsäure-Derivate und Flavonoidglykoside gehen nicht in die Ölauszüge über. Lediglich das im Zuckerteil acylierte Flavonglucosid Apigenin-7-(4''-acetyl)-glucosid, die Flavonoidaglyka sowie die Cumarine waren in den Ölauszügen zu finden. Die quantitative Betrachtung zeigt, dass die Übergangsraten in der Reihenfolge Flavonoidaglyka < acyliertes Flavonoidglucosid < methoxylierte Flavonoidaglyka zunehmen. So geht beispielsweise Apigenin zu 11% (W 10%) bzw. 26% (H 10%) über, Apigenin-7-(4''-acetyl)-glucosid zu 23% (W 10%) bzw. 38% (H 10%) und Chrysopterin zu 69% (W 10%) bzw. 79% (H 10%). Die Ölauszüge H 10% weisen bei allen phenolischen Komponenten höhere Übergangsraten auf. Ebenso bei den Cumarinen: Herniarin geht zu 38% (W 10%) bzw. 63% (H 10%), Umbelliferon zu 33% (W 10%) bzw. 51% (H 10%) in die Ölauszüge über.

10.4 Anthocyane aus Stockrosenblüten

Die Anthocyane aus Stockrosenblüten liegen im leicht sauren Zellsaft kationisch vor. Erwartungsgemäß gingen die Anthocyane nur in Spuren in die Ölauszüge über: 0,06% (W 10%) bzw. 0,10% (H 10%). Dies entspricht dem Verhalten der Flavonoidglykoside der Kamillenblüten.

10.5 Carotinoide aus Ringelblumenblüten

Der Gesamt-Carotinoidgehalt in Ringelblumenblüten betrug 83 mg/100 g Droge (berechnet als β -Carotin). In den Ölauszügen wurden Gehalte von 41 mg/100 g (W 10%) bzw. 34 mg/100 g (H 10%) ermittelt, was Übergangsraten von 50% (W 10%) bzw. 41% (H 10%) entspricht. Diese geringen Übergangsraten überraschen, da es sich bei den Carotinoiden um eher lipophile Verbindungen handelt.

10.6 Sterole aus Ringelblumenblüten

Aus den Ringelblumenblüten gehen vier Sterole in nennenswertem Maße in die Ölauszüge über. Von der Gesamtmenge der Droge gingen nur 11% in die Ölauszüge W 10% bzw. 3% in die Ölauszüge H 10% über. Demnach besitzt das Olivenöl keine gute Extraktionskraft für Sterole. Bemerkenswert ist, dass die Sterol-Muster sowohl in den beiden Ölauszügen, als auch in der Droge fast gleich sind. Bei den Sterolen tritt der Effekt, der schon bei den Carotinoiden beobachtet wurde, noch deutlicher hervor: trotz guter lipophiler Eigenschaften sind die ermittelten Übergangsraten gering.

10.7 Triterpenalkohole aus Ringelblumenblüten

In den Ringelblumenblüten wurden 16 Triterpenalkohole identifiziert. Bei der Untersuchung des Übergangs aus der Droge in die Ölauszüge konnte mit steigender Anzahl an Hydroxylgruppen und damit verbundener Veresterung mit kurz- oder langkettigen Fettsäuren höhere Übergangsraten beobachtet werden. So stiegen die Übergangsraten von den Monoolen mit 30% (W 10%) bzw. 22% (H 10%), über die Dirole mit 49% (W 10%) bzw. 31% (H 10%) zu den Triolen mit 85% (W 10%) bzw. 73% (H 10%) an.

10.8 Capsaicinoide aus Cayennepfefferfrüchten

In den Cayennepfefferfrüchten wurden sieben Capsaicinoide identifiziert. Von der Gesamtmenge der in der Droge enthaltenen Capsaicinoide gingen 68% (W 10%) bzw. 84% (H 10%) in die Ölauszüge über. Demnach besitzt das Olivenöl eine sehr gute Extraktionskraft für Capsaicinoide. Die höhere Übergangsrate beim Ölauszug H 10% zeigt, dass eine höhere Temperatur und vor allem die Drogenvorbehandlung mit Ethanol die Übergangsrate steigerten. Die Capsaicinoid-Muster in den Ölauszügen und der Droge sich sehr ähnlich waren.

10.9 Alkaloide aus Berberitzenwurzelrinde

Die Alkaloide aus Berberitzenwurzelrinde liegen in der Droge basisch vor. Erwartungsgemäß gingen sie nur in Spuren zu kleiner 0,05% in die Ölauszüge W 10% bzw. H 10% über. Dies entspricht dem Verhalten der Anthocyane der Stockrosenblüten.

D. DISKUSSION

Die Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen an pflanzlichen Ölauszügen nach Methoden des Homöopathischen Arzneibuchs (HAB 2006, Vorschriften 12d und f) wurden in Kap. C.10 zusammenfassend dargestellt. Im Folgenden sollen diese Ergebnisse im Hinblick auf die Qualität der Extraktionsmethode diskutiert werden, wobei als Qualitätsmaßstab in erster Linie die Effizienz der Extraktion dient. Diese kann am besten durch die prozentuale Übergangsrate der einzelnen Pflanzeninhaltsstoffe oder Inhaltsstoffgruppen beurteilt werden. Die Qualität der Extraktionsmethode drückt sich weiterhin durch eine gute Übereinstimmung der Inhaltsstoffmuster von Ausgangsdroge und entsprechendem Ölauszug aus.

Die Ergebnisse sollen auch im Hinblick auf bestimmte Gesetzmäßigkeiten bei der Extraktion von Drogen mit Olivenöl durchleuchtet werden. Dabei muss im Auge behalten werden, dass die Ölauszüge W 10% und H 10% nur „phytochemische Momentaufnahmen“ liefern, mit Hilfe derer man allerdings auf die Gesetzmäßigkeiten der verschiedenen Extraktionsbedingungen und -methoden schließen kann. Erkenntnisse zum Verhalten der Pflanzeninhaltsstoffe bei der Extraktion mit Olivenöl sollen zusammengetragen werden, um daraus möglichst Vorhersagen für Extraktionen anderer Drogen abzuleiten.

1. EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE EFFIZIENZ DES ÜBERGANGS VON PFLANZENINHALTSSTOFFEN IN DIE ÖLAUSZÜGE

Im Folgenden sollen die Einflussfaktoren, welche sich auf die stoffliche Zusammensetzung der Ölauszüge auswirken, eingehender beleuchtet werden. Zu diesen Faktoren zählen:

Eigenschaften der untersuchten Stoffgruppen: Lipophilie

Drogenbezogene Voraussetzungen: Lokalisation

Methodische Parameter: Extraktionstemperatur
Extraktionsdauer
kontinuierliches Rühren

Vorbehandlung der Droge : Vorbehandlung der Droge mit Ethanol
Zerkleinerungsgrad der Droge

Lipophilie der Stoffgruppe als wesentlicher Faktor

Die Lipophilie eines Pflanzeninhaltsstoffs bzw. einer Inhaltsstoffgruppe bestimmt als wichtigste Einflussgröße deren Übergangsrate ins Olivenöl. Wie vorauszusehen war, galt folgende Gesetzmäßigkeit: je lipophiler die Stoffgruppe ist, desto höher ist die Übergangsrate. Aus den Ergebnissen der Tab. C-33 lässt sich diese Gesetzmäßigkeit anhand der hohen Übergangsraten der lipophilen Inhaltsstoffe ablesen. So liegen die Übergangsraten der Sesquiterpenlactone bei 70 bis 81%, des ätherischen Öls bis 84% und der Capsaicinoide bei 68 bis 85%. Im Gegensatz dazu gehen die hydrophilen Flavonoidglykoside, die kationischen Anthocyane und die basischen Alkaloide sowie die Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate nicht oder nur in Spuren in die Ölauszüge über.

Die Extraktion der Flavonoide soll als Beispiel dafür herangezogen werden, dass durch alleiniges Betrachten der Polarität der Inhaltsstoffgruppen die Extraktionseffizienz von Olivenöl nicht unbedingt abgeschätzt werden kann. Die Polarität (Anzahl der OH-Gruppen am Molekül; Abb. B-8) korreliert gut mit der Elutionsreihenfolge in der HPLC bei Verwendung von RP-18-Phasen (reine Kohlenwasserstoffe). So eluieren zunächst die polaren acylierten Flavonoidglucoside, dann die weniger polaren Flavonoidaglyka und zuletzt die am wenigsten polaren methoxilierten Flavonoidaglyka. Mit abnehmender Polarität steigt jedoch nicht zwangsläufig ihre Löslichkeit in fetten Ölen, da sich Öle durch ihre Chemie (Triglyceridgemische) selektiver verhalten als eine RP-18 Phase in der HPLC (reiner Kohlenwasserstoff). So spiegeln die Übergangsraten dieser Flavonoidgruppen die Löslichkeit dieser Stoffgruppen im Olivenöl wider, die eben nicht der oben dargestellten Vorstellung einer Korrelation zwischen Polarität und Lipophilie, hier im eigentlichen Sinn des Wortes als „Ölfreundlichkeit“ verstanden, folgt.

Sie steigen von den Flavonoidglyka (weniger polar) mit 11 bis 27%, über die acylierten Flavonoidglucoside (polar) mit 23 bis 38% zu den methoxylierten Flavonoidglyka (am wenigsten polar) mit 61 bis 72% an. Daraus kann geschlossen werden, dass Olivenöl als ein Triglyceridgemisch sich im Vergleich zu einer RP-18-Phase (C18-Kohlenwasserstoffe) selektiver verhält und die Flavonoide differenzierter extrahiert. Die Elutionsreihenfolge in der HPLC auf RP-18-Phasen und die damit korrelierende Polarität kann also nicht einfach als Maßstab für die Extraktionseffizienz von Olivenöl gewertet werden.

Unter Berücksichtigung der Lipophilie als wichtigste Einflussgröße beim Übergang von Pflanzeninhaltsstoffen ins Olivenöl überrascht auch der Befund der steigenden Übergangsraten der Triterpenalkohole mit steigendem Hydroxylierungsgrad (siehe Bemerkung in Kap C.10.7). Dies rührt daher, dass in der Pflanze die Monoalkohole nur zu 10% mit kurzkettigen Fettsäuren verestert sind, wohingegen die Di- und Triole steigende Veresterungsgrade mit langkettigen Fettsäuren und damit steigende Lipophilie aufweisen.

Lokalisation in der Droge als modifizierender Faktor

Die oben formulierte Gesetzmäßigkeit zur Korrelation von Lipophilie und Übergangsraten ließe erwarten, dass die lipophilen Carotinoide mit hoher Übergangsraten aus der Droge ins Olivenöl übergehen. Diese zeigen wider Erwarten eine Übergangsraten von nur 40 bis 50%. Dies erklärt sich durch die Tatsache, dass Carotinoide in Zellorganellen (Chromoplasten) subepidermalen Schichten lokalisiert sind. Dadurch wird der Zugang und damit das Lösungsvermögen des Olivenöls für die Carotinoide herabgesetzt. Noch deutlicher wird dieser Effekt bei den Sterolen, die vorwiegend in den Membranen der Zellkompartimente eingelagert vorliegen. Dadurch gehen diese nur zu 3 bis 11% aus der Droge in die Ölauszüge über.

Bei den methoxylierten Flavonoidglyka (REPCA et al., 1999) oder dem ätherischen Öl, die auf der Oberfläche des Pflanzenmaterials lokalisiert sind, überlagern sich demnach zwei Effekte, die den Übergang dieser Pflanzeninhaltsstoffe ins Olivenöl beeinflussen. Zum einen die hohe Lipophilie, zum anderen die exponierte Lokalisation, so dass die Übergangsraten von 80 bis 84 % beim ätherischen Öl und von 61 bis 72 % bei den methoxylierten Flavonoidglyka als Summe der beiden Effekte zu werten sind.

Die Lokalisation einer Substanz in tiefer liegendem Gewebe setzt die Übergangsraten herab, wie die relativ niederen Werte der lipophilen Cumarine (37 bis 61%) zeigen. Dies wird noch eine Rolle bei der Betrachtung der Vorbehandlung der Droge mit Ethanol spielen.

Extraktionstemperatur als entscheidender Extraktionsparameter

Die Extraktion von Pflanzeninhaltsstoffen mit Olivenöl folgt in Bezug auf die Extraktionstemperatur der natürlichen Gesetzmäßigkeit: je höher die Extraktionstemperatur desto effizienter ist die Extraktion. Dies lässt sich aus den Untersuchungen mit variierten Extraktionsbedingungen und –methoden ableiten. Aus den Daten kann geschlossen werden, dass mit höheren Extraktionstemperaturen, höhere Übergangsraten erreicht werden. Dies gilt für alle untersuchten Stoffgruppen, ob lipophil oder hydrophil. Der Grund dafür ist, dass Olivenöl bei höheren Temperaturen eine niedrigere Viskosität besitzt und dadurch besser ins Gewebe eindringen kann (BASALO et al., 2006). Besonders deutlich wird dies bei den Carotinoiden (Abb. C-52), bei denen die Übergangsraten bei 65°C im Vergleich zu denen bei 20°C nahe zu verdoppelt sind, und bei den Cumarinen (Abb. C-48), deren Übergangsraten vierfach erhöht sind (50°C zu 20°C). Demgegenüber macht sich dieser Effekt bei lipophilen Stoffgruppen, die auf der Oberfläche der Droge lokalisiert sind, wie dem ätherischen Öl (Abb. C-34), kaum bemerkbar.

Begrenzender Faktor für die Extraktionstemperatur ist die Haltbarkeit des Olivenöls. Bei 65°C trat bereits nach zwei Tagen eine erhebliche sensorische Veränderung durch Ranzigwerden des Öls ein.

Extraktionsdauer als weniger wichtiger Extraktionsparameter

Der steile Anstieg der Kurven in den Abb. C-34 und Abb. C-48 bis Abb. C-52 innerhalb der ersten zwei Tage und der flache weitere Kurvenverlauf deutet darauf hin, dass ein Großteil der Pflanzeninhaltsstoffe in den ersten zwei Tagen, unabhängig von der Extraktionstemperatur, aus der Droge in das Öl übergeht.

Kontinuierliches Rühren - eine zweiseitige Extraktionsmethode

Kontinuierliches Rühren über den gesamten Extraktionszeitraum hinweg zeigte nur bei den methoxylierten Flavonoidglyka einen positiven Effekt. Sie liegen auf der Oberfläche der Kamillenblüten, wodurch das Rühren deren Übergang aus dem Kutikularwachs in die Ölauszüge mechanisch unterstützt und beschleunigt. Beim ätherischen Öl, bei dem ein positiver Effekt durch Zerstörung der Asteraceen-Drüenschuppen auch zu erwarten wäre, ist dies nicht erkennbar. Dessen Übergang ist ohnehin effizient und durch Rühren offensichtlich nicht weiter zu steigern. Kontinuierliches Rühren zeigt auch geringen Einfluss auf den Übergang von Stoffgruppen, die in tieferen Geweben lokalisiert sind. Damit bleibt das geringe Penetrationsvermögen des Olivenöls der limitierende Faktor (BASALO et al., 2006).

Das kontinuierliche Rühren ist, trotz des beschriebenen positiven Effekts auf einzelne Stoffgruppen, problematisch, da sich nach spätestens zwei Tagen ein sehr feiner mechanischer Abrieb des Pflanzenmaterials bemerkbar macht, der eine Trübung verursacht, die auch durch Kolieren des Ölauszugs nicht mehr zu entfernen ist.

Vorbehandlung der Drogen mit Ethanol steigert die Extraktionseffizienz

Die Vorbehandlung der Droge mit Ethanol erhöht die Übergangsraten aller Stoffgruppen in den Versuchsreihen mit variierten Extraktionsbedingungen und -methoden, wie die Kurven der Abb. C-34 und Abb. C-48 bis Abb. C-52 zeigen. Dabei wurden die Übergangsraten der Pflanzeninhaltsstoffe bei 35°C mit und ohne Vorbehandlung der Droge mit Ethanol verglichen. Am stärksten war die Steigerung der Übergangsraten bei den Cumarinen, die von maximal 39% (ohne Ethanol) auf über 75% (mit Ethanol) stieg. Am schwächsten dagegen war der Effekt bei den Carotinoiden.

Die vor der Extraktion erfolgende Vorbehandlung der Droge mit Ethanol bewirkt offensichtlich den „Aufschluss“ des Gewebes und ermöglicht es dem Olivenöl, in tiefere Gewebeschichten vorzudringen. Darüber hinaus könnte das Ethanol als eine Art „Lösungsvermittler“ fungieren. Beides zusammen würde erklären, warum der Effekt bei solchen Inhaltsstoffen stärker ist, die weniger lipophil und in tieferen Gewebeschichten lokalisiert sind (z.B. Cumarine, acylierte Flavonglykoside und Flavonoidaglyka). Bei lipophilen Substanzen wie Sesquiterpenlactonen, methoxylierten Flavonoidaglyka und ätherischem Öl, die auf der Blattoberfläche lokalisiert sind, erhöht eine Vorbehandlung der Droge mit Ethanol die Ausbeute nicht bemerkenswert.

Bei der Betrachtung dieser positiven Eigenschaften der Drogenvorbehandlung mit Ethanol muss jedoch berücksichtigt werden, dass damit auch eine Veränderung der Stoffmuster im Vergleich zur Droge verbunden ist, was später noch diskutiert wird.

Zerkleinerungsgrad der Droge

Da die Lokalisation der Pflanzeninhaltsstoffe auf die Effizienz der Ölextraktion einen starken Einfluss nimmt, spielt der Zerkleinerungsgrad der Droge zur Extraktion eine entscheidende Rolle. Je feiner die Droge zermahlen ist, desto besser ist der Kontakt des Olivenöls mit den Pflanzeninhaltsstoffen. Bei Blütendrogen erübrigt sich eine Zerkleinerung; hier gewährleistet eine große spezifische Oberfläche die Effizienz der Extraktion. Drogen mit einer geringen Oberfläche, wie Wurzeln, Rinden und Samen müssen zerkleinert werden. Die Drogenteile müssen jedoch grob genug bleiben, um nach dem Kolieren klare Ölauszüge zu erhalten.

2. INHALTSSTOFFMUSTER DER ÖLAUSZÜGE

Als wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Ölauszüge dient neben der Extraktionseffizienz auch die Ähnlichkeit der Inhaltsstoffmuster von Droge und Ölauszug. D.h. es wird untersucht, ob es zur Diskriminierung einzelner Pflanzeninhaltsstoffe kommt. Aus den Ergebnissen der Untersuchungen des Kap. C.9 lassen sich die Inhaltsstoffmuster des ätherischen Öls und der phenolischen Komponenten aus den Ölauszügen und der Droge statistisch miteinander vergleichen.

Zur Visualisierung der Unterschiede wurde die Datenmenge mittels Hauptkomponenten-Analyse (principle component analysis, PCA) reduziert und damit ein System mit einer großen Zahl an Variablen in einem zweidimensionalen Koordinatensystem, einem sog. Scores plot, dargestellt. {Massart & Vander Heyden 2004 572 /id}.

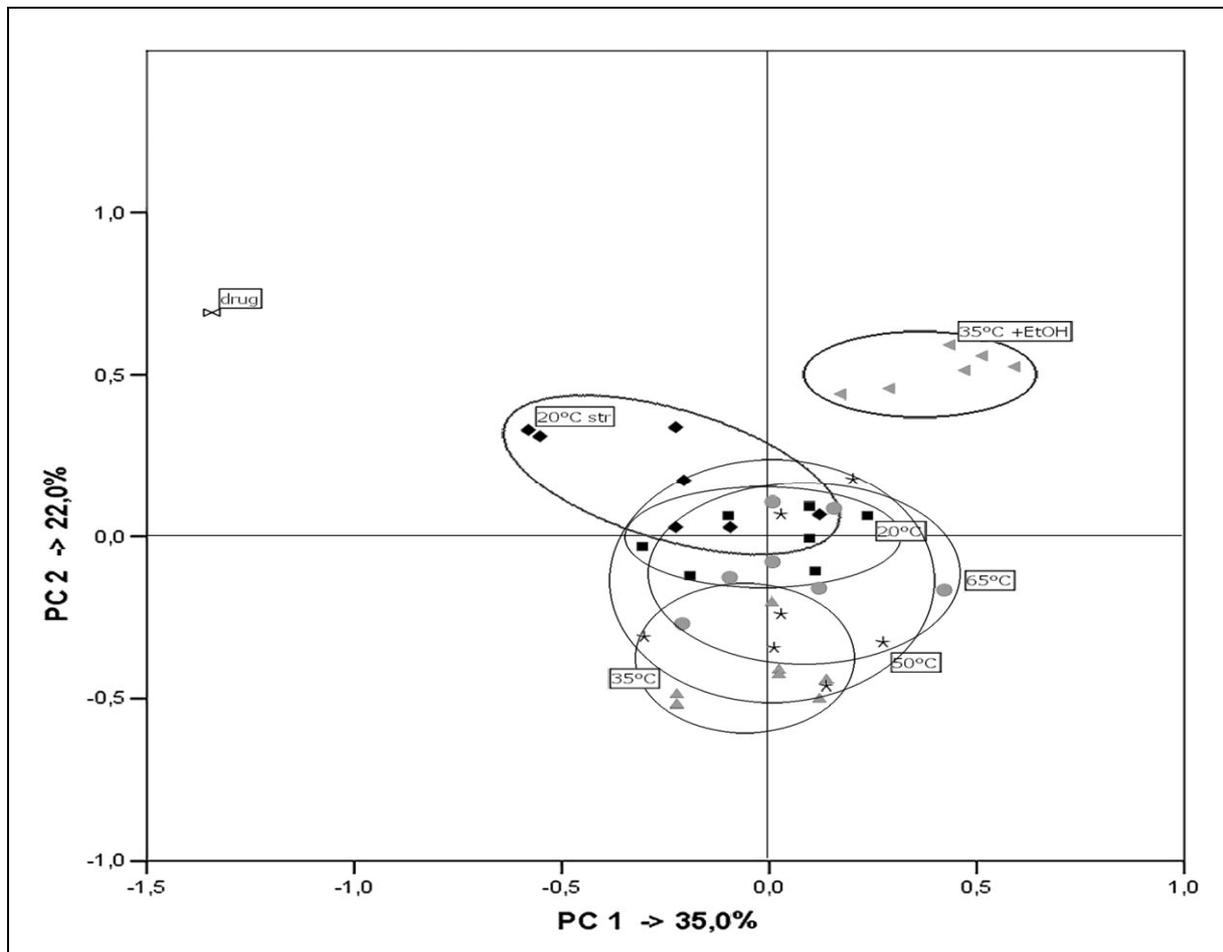


Abb. D-1 Scores plot zur Darstellung der Muster des ätherischen Öls in den Ölauszügen und der Droge in Abhängigkeit von den Herstellungsbedingungen

Der Scores plot in Abb. D-1 wird definiert durch die zwei Hauptkomponenten (PC1: 35,0% and PC2: 22,0%). Jeder Datenpunkt in der Abbildung repräsentiert das Ätherisch-Öl-Muster eines Ölauszugs bzw. der Ausgangsdroge. Je näher die Datenpunkte in der Abbildung zueinander liegen, desto ähnlicher sind die zugrunde liegenden Daten, d.h. desto ähnlicher sind die entsprechenden Ätherisch-Öl-Muster. Zusätzlich sind die Datenpunkte der ätherischen Öle, die unter gleichen Bedingungen hergestellt wurden, sich aber in der Extraktionsdauer unterscheiden, in ein Cluster zusammengefasst (dargestellt durch ringförmige Umrandung).

Der Datenpunkt des ätherischen Öls der Ausgangsdroge liegt weit abgetrennt von denen der Ölauszüge. Dieser Unterschied im Muster der ätherischen Öle ist durch die unterschiedlichen Isolierungsmethoden (Wasserdampfdestillation der Droge bzw. Verseifung und Extraktion der Ölauszüge) begründet (siehe Kap.C.2.7). Die meisten Datenpunkte der untersuchten Ölauszüge, mit Ausnahme der Ölauszüge, die nach Vorbehandlung der Droge mit Ethanol hergestellt wurden, gruppieren sich in der Nähe des Schaubild-Ursprungs. Das bedeutet, dass die Muster der ätherischen Öle aus diesen Ölauszügen kaum durch die Extraktionstemperatur, -dauer oder das kontinuierliche Rühren beeinflusst wurden. Offensichtlich verändert dagegen die Vorbehandlung der Droge mit Ethanol das Muster des ätherischen Öls, was durch das abgetrennte Cluster in Abb. D-1 deutlich wird.

Analysiert man den Einfluss einzelner Bestandteile des ätherischen Öls auf die Unterschiede im Muster (graphisch nicht dargestellt), so stellt man fest, dass die beiden Hauptbestandteile des ätherischen Öls, Spiroether und Bisabololoxid A, die größten Variationen entlang der Abszisse verursachen. Der Einfluss des Chamazulens, des Bisabolonoxids und des Bisabolols entlang dieser Achse ist eher gering. Die Variationen entlang der Ordinate (PC2) werden vor allem durch Farnesen, Spathulenol und Bisabololoxid B verursacht.

Für die phenolischen Komponenten ergibt sich Abb. D-2. Hier ist der Scores plot dargestellt, der durch die zwei Hauptkomponenten (PC1: 60,8% and PC2: 18,7%) aufgespannt wird. Die größten Variationen entlang der Abszisse (PC1) werden einerseits durch die methoxylierten Flavonoidaglyka Chryso-splenetin, Chryso-splenol und Jaceidin, andererseits durch die Cumarine Herniarin und Umbelliferon sowie auch die Flavonoidaglyka Isorhamnetin und Luteolin verursacht (graphisch nicht dargestellt). Die Variationen entlang der Ordinate (PC2) beruhen vor allem auf Apigenin und Kämpferol.

In Abb. D-2 ist zu erkennen, dass die Datenpunkte und Cluster der phenolischen Komponenten aus den Ölauszügen, die bei niedrigeren Extraktionstemperaturen hergestellt wurden (20°C, 35°C und 20°C unter kontinuierlichem Rühren), sehr nahe zusammen liegen. Dies lässt auf ähnliche Muster an phenolischen Komponenten in diesen Ölauszügen schließen. Dagegen liegen die Datenpunkte und die Cluster der Öle, die bei höheren Temperaturen (50 und 65°C) extrahiert wurden sowie der Öle, deren Droge mit Ethanol vorbehandelt wurde, auf dem anderen Ende der Abszisse, d.h. sie unterscheiden sich stark voneinander. Der Datenpunkt der Droge ist zusätzlich entlang der Ordinate deutlich nach oben verschoben. Dies bedeutet, dass das Muster an phenolischen Komponenten in der Droge vom dem der Ölauszüge, die bei niedrigeren Temperaturen extrahiert wurden, sehr stark und von denen die bei höheren Temperaturen extrahiert wurden, weniger stark abweicht. Je höher die Extraktionstemperatur, desto ähnlicher wird das Komponentenmuster der Ölauszüge dem der Droge. Dabei fördert die Vorbehandlung der Droge mit Ethanol vor der Extraktion diesen Effekt. Kontinuierliches Rühren über den gesamten Extraktionszeitraum hat dagegen keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der phenolischen Komponenten in den Ölauszügen, d.h. die Zusammensetzung unterscheidet sich praktisch kaum von den Ölauszügen, die ebenfalls bei 20°C, jedoch ohne Rühren hergestellt wurden.

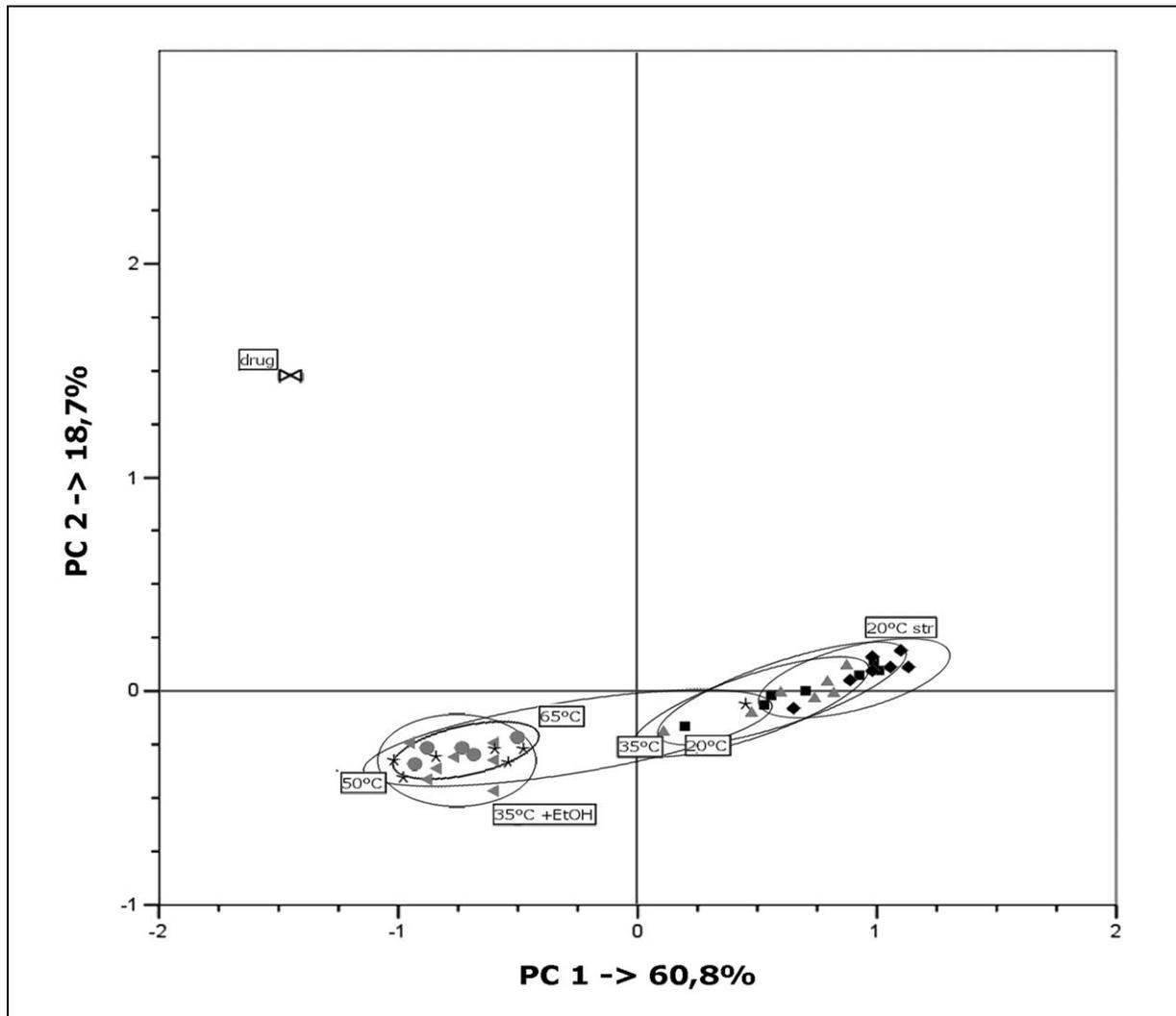


Abb. D-2 Scores plot zur Darstellung der Muster der phenolischen Komponenten in den Ölauszügen und der Droge in Abhängigkeit von den Herstellungsbedingungen

Bezüglich der anderen Stoffgruppen stehen für eine solche Beurteilung des Einflusses der Extraktionsbedingungen auf die Stoffmuster nur punktuelle Daten zur Verfügung, nämlich die Muster der Ölauszüge W 10% und H 10% im Vergleich zur Droge, quasi phytochemische Momentaufnahmen. Wie in den Kap. C.10.1, C.10.6, C.10.7 und C.10.8 dargestellt, sind für die Sesquiterpenlactone, die Sterole und Triterpenalkohole, sowie die Capsaicinoide kaum Unterschiede in den Mustern feststellbar. Dieser Eindruck müsste mit detaillierten Untersuchungen weiter erhärtet werden.

3. BEURTEILUNG DER EXTRAKTIONSMETHODEN DES HAB

Bei beiden Verfahren des HAB, Mazeration (W 10%) und Digestion (H 10%), handelt es sich nicht um erschöpfende Extraktionen. Die maximalen Übergangsraten wurden zu ca. 80% bestimmt, meist liegen sie deutlich darunter (Tab. C-33). Aus den Untersuchungen mit variierten Extraktionsbedingungen und Extraktionsmethoden kann geschlossen werden, dass optimale Resultate im Sinne hoher Gehalte an Pflanzeninhaltsstoffe in den Ölauszügen durch zwei unterschiedliche Extraktionsstrategien erreicht werden können: einerseits durch eine niedrige Extraktionstemperatur (35°C) über einen langen Zeitraum (mindestens 48h), andererseits durch eine hohe Temperatur (65°C) für eine kurze Zeit (maximal 24h). Beide Prozeduren sind mehr oder weniger in den Herstellungsvorschriften Nr. 12 f und g (W 10%, W 5%) und Nr. 12 d und e (H 10%, H 5%) des Homöopathischen Arzneibuches (HAB 2006) realisiert (Tab. B-1). Die Extraktionsdauern beider Methoden müssen aufgrund der vorliegenden Daten jedoch angepasst werden. So sollten die Ölauszüge W 10% und W 5% etwas kürzer der Mazeration unterworfen werden, bei der Digestion der Ölauszüge H 10% und H 5% ist eine längere Extraktionsdauer vorteilhafter.

Das gelegentliche Schütteln, wie es im HAB vorgeschrieben ist, reicht aus, denn kontinuierliches Rühren über den gesamten Extraktionszeitraum hinweg ist, wie gezeigt werden konnte, nicht sinnvoll und verursacht aufgrund des feinen Abriebs am Pflanzenmaterial Schwierigkeiten. Die Vorbehandlung der Droge mit Ethanol (H 10%, H 5%) erhöht den Gehalt an Pflanzeninhaltsstoffen, vor allem der in tieferen Gewebeschichten liegenden Inhaltsstoffen, in den Ölauszügen, jedoch muss bei einzelnen Pflanzeninhaltsstoffen (z.B. dem ätherischen Öl, siehe Kap. 2) mit leichten Veränderungen des Inhaltsstoffmusters im Vergleich zur Ausgangsdroge gerechnet werden. Vor diesem Hintergrund betrachtet, stellen die Herstellungsvorschriften des HAB sehr gute Extraktionsbedingungen pflanzlicher Drogen mit Olivenöl dar, mit denen eine gute Qualität der Ölauszüge erreicht werden kann.

Ergänzend soll noch die Ölgrundlage als solches bedacht werden, die nach den Herstellungsvorschriften des HAB entweder aus Olivenöl, Erdnussöl oder Sesamöl bestehen darf. Die Frage, ob dadurch Unterschiede in der Qualität der Ölauszüge zu erwarten ist, wurde beispielhaft an den Sesquiterpenlactonen aus Arnikablüten untersucht (Ergebnisse nicht dargestellt). Da die zur Extraktion verwendeten Öle, Olivenöl und Erdnussöl sehr ähnliche Fettsäurezusammensetzungen aufweisen, konnten erwartungsgemäß praktisch keine Unterschiede zwischen der Extraktionskraft der beiden Pflanzenöle festgestellt werden.

E. MATERIAL UND METHODEN

1. PFLANZENMATERIAL

1.1 Drogen- und Pflanzenbezeichnungen

Tab. E-1 Verwendete pflanzliche Drogen

Droge	Lateinische Bezeichnung	Pflanze
Arnikablüten Kamillenblüten	Arnicae flos cum calycibus Chamomillae flos, ägyptisch	<i>Arnica montana</i> L. <i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert
Stockrosenblüten	Malvae arboreae flos cum calycibus	<i>Alcea rosea</i> L. var. <i>nigra</i>
Ringelblumenblüten Cayennepfefferfrüchte	Calendulae flos sine calycibus Capsici acer fructus	<i>Calendula officinalis</i> L. <i>Capsicum annuum</i> var. <i>minimum</i> (Mill.) Heiser; <i>Capsicum frutescens</i> L.
Berberitzenwurzel	Berberidis radix cortex	<i>Berberis vulgaris</i> L.

Tab. E-2 Drogenbezeichnung und -herkunft

Droge	Bezeichnung	Herkunft	Charge
Arnikablüten*	Arnika Blüten und Kelch	Kneipp-Werke, Würzburg	0312297
Kamillenblüten*	Flores Chamomillae, ägyptisch	Caesar & Lorenz, Hilden	27395225 (Kap. C.2) 42665225 (Kap. C.9)
Stockrosenblüten	Flores Malvae arbo- reae cum Calycibus	Caesar & Lorenz, Hilden	23130192
Ringelblumenblüten	Flores Calendulae sine Calycibus	Heinrich Klenk, Schwebheim	1241 A 05041906
Cayennepfeffer- früchte*	Chilli, crushed	Werner & Co. Gewürze, Gelsenkirchen	Muster
Berberitzenwurzel*	Berberidis radix	WALA Heilmittel, Bad Boll	0458156A

* wurden uns freundlicherweise kostenlos zur Verfügung gestellt

1.2 Vorbereitung der Drogen

Die getrockneten Drogen wurden zerkleinert und dabei von makroskopisch erkennbarem Fremdbesatz befreit. Um homogene Ausgangsmaterialien zu erhalten, wurden die Drogen zum Teil klassiert, indem sie auf einen Siebturm mit einem oder zwei Sieben (Siebweite siehe Tab. E-3) gegeben wurden. Drogen, bei denen nur ein Sieb verwendet wurde, sind von groben Teilen befreit; bei Verwendung zweier Siebe wurde auch der zu feine Drogenanteil verworfen und nur die mittlere Fraktion verwendet. Die Identität und Reinheit der zerkleinerten Droge wurde lichtmikroskopisch überprüft und bestätigt.

Tab. E-3 Zerkleinerungsgrad der verwendeten pflanzlichen Drogen

Droge	Zerkleinerungsgrad	Siebweite
Arnikablüten	concisus (geschnitten)	3 mm
Kamillenblüten	gerebelt	0,75 mm
Stockrosenblüten	concisus (geschnitten)	3 mm
Ringelblumenblüten	concisus (geschnitten)	3 mm
Cayennepfefferfrüchte	pulvis	0,15-0,3 mm
Berberiswurzel	pulvis	0,15-0,3 mm

2. HERSTELLUNG DER ÖLAUSZÜGE

Die Herstellung der Ölauszüge erfolgte gemäß der Vorschrift Nr. 12 f (W 10%) bzw. Nr. 12 d (H 10%) des Homöopathischen Arzneibuchs (HAB 2006) in Mengen zu je ca. 500 g (Tab. E-4). 1 Teil der zerkleinerten Droge wurden mit 10 Teilen Pflanzenöl versetzt und der Ansatz mit Stickstoff überschichtet. Im Fall der Ölauszüge H 10% wurde die Droge vor der Extraktion mit 0,25 Teilen Ethanol (94%) über Nacht eingeweicht. Nach intensivem Mischen der Extraktionsansätze wurden die Ölauszüge W 10% bei einer Temperatur von 37°C über einen Zeitraum von einer Woche mazeriert, die Ölauszüge H 10% bei 65°C für vier Stunden digeriert. Der Ansatz der Ölauszüge W 10% wurden zweimal täglich kräftig geschüttelt. Nach erfolgter Extraktion wurden die abgekühlten Ansätze mit Hilfe einer hydraulischen Tinkturenpresse (Hafico, Norf) abgepresst und anschließend durch ein Cellulosetuch kolliert.

Tab. E-4 Extraktionsvorschriften der Ölauszüge gemäß den Vorschriften des HAB

Ölauszug	Extraktionsdauer	Extraktionstemperatur	DEV	Drogenvorbehandlung
W 10%	336 h	37°C	1:10	-
H 10%	4 h	65°C	1:10	EtOH

3. VERWENDETES OLIVENÖL

Als Öl-Auszugsmittel diente raffiniertes Olivenöl (Heess, Stuttgart), das vor der Verwendung nach den Vorgaben des Europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur. 5.4 „Olivenöl, raffiniert“ Nr. 1456) geprüft wurde: Die Säurezahl (Ph. Eur. 5.0 „Säurezahl“ Nr. 2.5.1) wurde zu $0,58 \pm 0,03$ (n=3) bestimmt und entspricht damit den Anforderung des Ph. Eur. nach einer maximalen Säurezahl von 2,0. Auch die Forderung nach einer Peroxidzahl (Ph.Eur. 5.0 „Peroxidzahl“ Nr. 2.5.5) von maximal 20,0 wurde mit $2,85 \pm 0,12$ (n=3) erfüllt.

Die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung erfolgte nach der Vorschrift des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur. 5.0 „Prüfung der Fettsäurezusammensetzung durch Gaschromatographie“ Nr. 2.4.22). Die Analyse der Fettsäuremethylester erfolgte mittels GC (Tab. E-8). Die Temperatur des Säulenofens war konstant bei 190°C. Die Auswertung erfolgte anhand von separat analysierter Fettsäuremethylester-Referenzmischungen sowie im Ph. Eur. angegebener Werte. Die Ergebnisse sind in Tab. E-5 dargestellt. Die Vergleichswerte stammen von der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft (Link: www.dgfett.de/material/fszus.htm). Die Werte sind in Gewichtsprozent angegeben, bezogen auf die Gesamtfettsäuren. NN steht für „nicht nachweisbar“ und wurde definiert als $\leq 0,05\%$.

Tab. E-5 Ermittelte Fettsäuremuster des raffinierten Olivenöls und Vergleich mit Literaturwerten

Fettsäure		Ermittelte Werte [%]	Literaturwerte [%]
Palmitinsäure	C 16:0	12,4	7,5-20,0
Palmitoleinsäure	C 16:1	1,2	0,3-3,5
Stearinsäure	C 18:0	3,4	0,5-5,0
Ölsäure	C 18:1	74,4	55,0-83,0
Linolsäure	C 18:2	8,3	3,5-21,0
Linolensäure	C 18:3	0,6	NN-1,0

Der Nachweis von Sesamol war negativ. Damit entsprach das verwendete raffinierte Olivenöl allen Anforderungen des Europäischen Arzneibuches.

4. INSTRUMENTELLE ANALYTIK

4.1 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Für die Methodenentwicklung und die Routineanalytik wurde eine HPLC-Anlage der Firma Hewlett Packard verwendet (Tab. E-6). Als Eluenten fanden organische Lösungsmittel der Firma Roth in der Qualität RotiSolv Gradient grade sowie Eluenten aus bidestilliertem Wasser (aus einer Milliobor-Anlage) Verwendung. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Integrationsprogramm Hewlett Packard ChemStation. Die Identifizierung erfolgte mittels LC-MS-Kopplung an einer Anlage der Firma Varian (Tab. E-7). Dazu wurden Lösungsmittel der Firma Fisher Scientific (Gradient grade) verwendet. Die Auswertung der Chromatogramme und der Massenspektren erfolgte mit der Software MS Workstation (Version 6.10, Varian).

Tab. E-6 Parameter der HPLC-Anlage

Pumpensystem:	HP 1050 Pumpensystem mit quartärem Gradientenmischer
Injektion:	20 µL, manuell
Entgaser	Gyncotech, online
Säulenofen:	Integriert
Detektor:	FID, 250°C
Säulentemperatur:	30°C
Fluss:	1,0 mL/min
Detektor:	DAD (HP 1040 Series II)

Tab. E-7 Parameter der LC-MS-Anlage

Pumpensystem	Varian ProStar 210
Injektion:	10 µL, ProStar Autosampler 410
Säulenofen:	ProStar 510
Detektor:	FID, 250°C
Säulentemperatur:	30°C
Fluss:	0,4 mL/min
MS-Detektor:	Varian Quadrupole MS/MS 1200L

4.2 Gaschromatographie (GC)

Für die Methodenentwicklung und die Routineanalytik wurden zwei unterschiedliche Systeme verwendet, deren Parameter in Tab. E-8 und Tab. E-9 dargestellt sind. Der Vordruck der Gase (Wasserstoff, Luft und Stickstoff) betrug 3 bar. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software ChemStation von Hewlett Packard. Die Identifizierung erfolgte mittels GC-MS-Kopplung. Die Anlage und die Trennparameter sind in Tab. E-10 zusammengestellt.

Tab. E-8 Parameter des GC-Systems 1

Gaschromatograph:	HP 6890 Series
Injektor:	Split/splitless, 250°C, manuelle Injektion
Split-Verhältnis	1:15
Injektionsvolumen:	1 µL
Trennsäule:	Kapillarsäule (DBWax) (30 m x 0,25 mm I.D., Filmdicke 0,25 µm; J&W)
Detektor:	FID, 250°C
Trärgas:	Stickstoff 5.0 (Westfalen AG, Münster)
Fluss:	0,7 mL/min

Tab. E-9 Parameter des GC-Systems 2

Gaschromatograph:	HP 5890 Series II
Injektor:	Split/splitless, 290°C, Autosampler (HP 7673 GC/SFC Injektor)
Split-Verhältnis	1:30
Injektionsvolumen:	1 µL
Trennsäule:	Kapillarsäule CP-Sil (30 m x 0,25 mm I.D., Filmdicke 0,25 µm; Chrompack)
Detektor:	FID, 310°C
Trärgas:	Stickstoff 5.0 (Westfalen AG, Münster)
Fluss:	0,9 mL/min

Tab. E-10 Parameter der GC-MS-Anlage

Gaschromatograph:	HP 5890 Series II
Injektor:	Split/splitless, manuelle Injektion
Injektortemperatur:	220°C
Split-Verhältnis	1:10
Einspritzvolumen:	1 µL
Trärgas:	Helium 5.0 (Westfalen AG, Münster)
Fluss:	0,7 mL/min
Trennsäule:	Kapillarsäule CP-Sil 5 (30 m x 0,25 mm I.D., Filmdicke 0,1 µm; Chrompack)
MS-Detektor:	HP MSD 5970 B Scanmodus bei 70 eV
Auswertung	Software: Massfinder und Masslib
Datenbanken	NIST MS/MS NIST 05

4.3 Spektralphotometrie

Für die Methodenentwicklung und die Routineanalytik wurde ein Spektralphotometer der Firma Shimadzu verwendet (Tab. E-11). Zur Messung wurden optisch reine Lösungsmittel der Firma VWR International in der Qualität RotiSolv Gradient grade verwendet.

Tab. E-11 Parameter der Spektralphotometrischen Untersuchungen

Spektralphotometer:	Spectrophotometer UV-120-02
Messtemperatur:	Raumtemperatur
Schichtdicke:	10 mm
Küvetten:	PET-Einmal-Küvetten

5. ANALYTIK DER SESQUITERPENLACTONE

5.1 Isolierung der Sesquiterpenlactone aus der Droge und den Ölauszügen

Zur Bestimmung des Sesquiterpenlactongehaltes wurden 5,0 g Droge nach Zugabe von 2,5 mL Internem Standard (ISTD) (10,0 mg Santonin in 10,0 mL Methanol) mit Methanol (50%) wie später beschrieben extrahiert. Zur Bestimmung in den Ölauszügen wurden 25,0 g Ölauszug zunächst in 50 mL Petrolether gelöst und diese Lösung nach Zugabe von 1,0 mL ISTD dreimal mit je 50 mL Methanol (50%) extrahiert. Die vereinigten methanolischen Extrakte wurden mit 50 mL Petrolether gewaschen und anschließend am Vakuum-Rotationsverdampfer auf etwa das halbe Volumen eingeeengt. Zur weiteren Aufreinigung wurde der eingeengte methanolische Extrakt dreimal mit 50 mL Ethylacetat extrahiert, die methanolische Phase verworfen und die organische Ethylacetat-Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 20 mL Dichlormethan ausgezogen, wieder filtriert und nach Einengen zur Trockene in 10 mL Aceton aufgenommen. Diese Lösung wurde über eine mit Aceton vorkonditionierte Kieselgelsäule (ca. 3 g Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm) gegeben. Die Sesquiterpenlactone wurden mit 50 mL Aceton wieder von der Säule eluiert und anschließend zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde mit wenig Methanol in Lösung gebracht, auf 10 mL aufgefüllt und anschließend mit demin. Wasser zur Hälfte verdünnt. Diese Lösung diente nach Membranfiltration (Nylon-Membran: 0,2 µm, 13 mm I.D.; Roth, Karlsruhe) zur Bestimmung des Sesquiterpenlactongehaltes mittels HPLC.

5.2 LC-MS der Sesquiterpenlactone

Die Identifizierung erfolgte mittels LC-MS (Tab. E-7). Die nach Kap. 5.1 isolierte Lösung an einer Trennsäule von MZ-Analytical (Kromasil 100 C18; 5µm; 125 x 4 mm I.D.) und einer Vorsäule von Phenomenex (SequitryGuard® C18; 4 x 3 mm I.D.) chromatographiert. Als Lösungsmittel dienten Acetonitril (Gradientgrade, Fischer Scientific) [Eluent A] und Wasser (bidestilliert, mittels Millibor-Anlage) [Eluent B]. Die Trennung erfolgte mit einem Gradienten (Tab. E-12). Die Detektion erfolgte im positiven ESI-Modus, dabei wurden die Massen von 230 bis 500 m/z abgedeckt; die Scanzeit getrug 0,5 s.

Tab. E-12 Gradient der LC-MS-Analytik der Sesquiterpenlactone

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	15	85
5	25	75
40	30	70
45	40	60
75	50	50
90	100	0
95	100	0

5.3 HPLC-DAD der Sesquiterpenlactone

Die Quantifizierung der Sesquiterpenlactone erfolgte mittels HPLC-DAD (Tab. E-6). Als Trennsäule diente die PurospherStar C18 von Merck (250 x 4 mm I.D.) mit einer Vorsäule aus demselben Material (30 x 3 mm I.D.). Als Lösungsmittel wurde Acetonitril (HPLCgrade, Merck) [Eluent A] und Wasser (bidestilliert, siehe oben) [Eluent B] verwendet. Die Trennung erfolgte mit einem Gradienten (Tab. E-13). Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von

Tab. E-13 Gradient der HPLC-DAD-Analytik der Sesquiterpenlactone

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	15	85
5	25	75
40	30	70
45	40	60
75	50	50
90	100	0
95	100	0

225 nm. Zusätzlich wurde während des gesamten Laufs das UV/VIS-Spektrum von 200 bis 600 nm aufgezeichnet. Die Korrelationsfaktoren sind in Tab. C-2 dargestellt.

5.4 Wiederfindungsrate der Methode

Zunächst wurde eine Santonin-Kalibriergerade erstellt. Dazu wurden 50,0 mg Santonin eingewogen und in 100,0 mL Methanol gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden durch geeignete Verdünnungen die einzelnen Standardlösungen hergestellt (Tab. H-1), die jeweils mindestens fünfmal in die HPLC injiziert wurden (Kap. E.5.3). Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden 50,0 g Olivenöl mit 4,0 mL der Stammlösung vermischt. Dieses Santonin-haltige Öl wurde dreimal nach der oben beschriebenen Methode isoliert und mindestens fünfmal zur HPLC eingesetzt. Die Santonin-Konzentration der dotierten Öle wurde mit Hilfe der Kalibriergeraden berechnet und die prozentuale Wiederfindung des ISTD im Verhältnis zur Soll-Konzentration im Olivenöl ermittelt.

6. ANALYTIK DES ÄTHERISCHEN ÖLS

6.1 Quantitative Bestimmung des ätherischen Öls in der Droge und in den Pressrückständen

Die Wasserdampfdestillation erfolgte nach den Vorschriften des europäischen Arzneibuches (Ph. Eur. 5.0 „Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls in Drogen“, Nr. 2.8.12). Als Destillationsdauer erwiesen sich vier Stunden als effizient, als Hilfsphase diente 0,5 mL Xylol. Anstelle des 30-minütigen Vorversuchs mit Xylol wurden für alle verwendeten Destillationsapparaturen Blindwerte über den gesamten Versuchsverlauf erstellt und regelmäßig überprüft. Zur Bestimmung des ätherischen Öl-Gehalts in der Droge wurden 50,0 g zerkleinerte Kamillenblüten zur Destillation eingesetzt. Zur Herstellung des Arzneiöles wurden ebenfalls 50,0 g zerkleinerte Kamillenblüten eingesetzt. Nach Mazeration und Pressung wurde der gesamte Pressrückstand quantitativ in die Apparatur überführt und ebenfalls nach oben beschriebener Methode destilliert. Die isolierten ätherischen Öle wurden nach Verdünnung mit Xylol (1:10) auch zur gaschromatographischen Untersuchung verwendet.

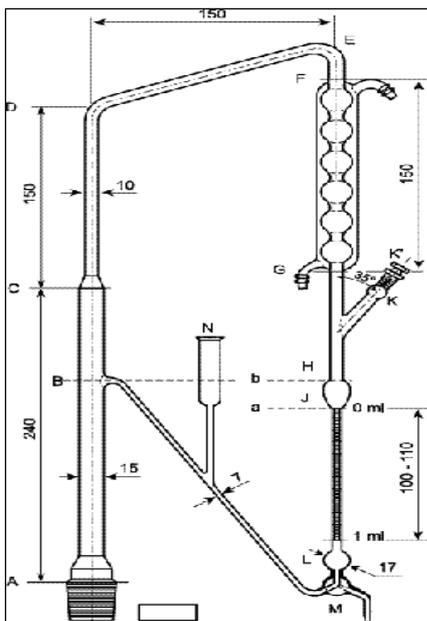


Abb. E-1 Clevenger-Apparatur (Ph. Eur.) zur Bestimmung des Gehalts an ätherischem Öl

6.2 Isolierung des ätherischen Öls aus den Ölauszügen

Zur Untersuchung der Zusammensetzung des ätherischen Öls der Ölauszüge wurden diese verseift und das ätherische Öl als unverseifbarer Anteil isoliert. Dazu wurden 10,0 g Ölauszug, bzw. in den Vorversuchen mit reinem ätherischem Öl dotiertes Olivenöl, mit 100 mL ethanolischer KOH-Lösung (12,0 g KOH in 10 mL dest. Wasser lösen und mit Ethanol (96%) auf 100 mL aufgefüllt) versetzt und unter Rückfluss 2 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz dreimal mit je 100 mL dest. Hexan extrahiert, die vereinigten Hexanphasen anschließend mit Wasser so lange gewaschen, bis die wässrige Phase gegen Indikatorpapier nicht mehr alkalisch reagierte und dann am Vakuumrotationsverdampfer nicht ganz zur Trockene eingengt, mit Hexan in ein 2-mL-Messkölbchen überführt und mit Hexan bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wurde über Nacht im Tiefkühlschrank bei -18°C aufbewahrt, um letzte Fettreste auszufrieren.

6.3 GC-MS des ätherischen Öls

Die Identifizierung der Komponenten des ätherischen Öls erfolgte mittels GC-MS (Tab. E-10). Das Temperaturprogramm des Säulenofens startete bei 80°C und stieg mit $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis 270°C . Zur Detektion wurde ein Massenbereich von 39 bis 310 m/z aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten und durch Datenbankrecherche.

6.4 GC-FID des ätherischen Öls

Die Analyse des ätherischen Öls erfolgte mittels GC (Tab. E-9). Das Temperaturprogramm des Säulenofens startete bei 80°C und stieg mit $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis 270°C . Die quantitative Auswertung erfolgte mittels Normalisierung der detektierten Analytmoleküle („100% Methode“) unter Berücksichtigung spezifischer Responsefaktoren (bei den Ergebnissen detaillierter beschrieben).

7. ANALYTIK DER PHENOLISCHEN KOMPONENTEN

7.1 Isolierung der phenolischen Komponenten aus der Droge und aus den Ölauszügen

Zur Isolierung der phenolischen Komponenten wurden 5,0 g zerkleinerte Kamillenblüten dreimal mit je 100 mL Methanol (70%) unter Rückfluss extrahiert (je 15 min). Aus den vereinigten methanolischen Extrakten wurde das Methanol abdestilliert und die verbleibende Lösung mit Wasser auf 1000,0 mL ergänzt. Ein Aliquot von 20,0 mL dieser Lösung wurde mit insgesamt 75 mL Toluol-Ethylacetat (20+5 VT) extrahiert. Diese Lösung wurde zur Trockene eingengt, der Rückstand in 5,0 mL Methanol aufgenommen, mit 5,0 mL Wasser verdünnt und nach Zentrifugieren für die HPLC verwendet. Zur Isolierung der phenolischen Komponenten aus den Ölauszügen wurden 100,0 g des Ölauszugs zunächst in 100 mL Petrolether gelöst und diese Lösung dreimal mit je 100 mL Methanol (70%) extrahiert. Die vereinigten Methanolextrakte wurden zur Aufreinigung noch einmal mit Petrolether gewaschen und dann wie bei der Droge beschrieben aufgearbeitet.

7.2 LC-MS der phenolischen Komponenten

Die Identifizierung erfolgte mittels LC-MS (Tab. E-7). Dazu wurde die isolierte Lösung (Kap. E.7.1) an einer Trennsäule von MZ-Analytical (Kromasil 100 C18; 5µm; 125x4 mm I.D.) und einer Vorsäule von Phenomenex (SequitrityGuard® C18; 4x3 mm I.D.) chromatographiert.

Tab. E-14 Gradient der LC-MS-Analytik der phenolischen Komponenten

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	10	90
18	18	82
22	30	70
42	45	55
62	100	0
65	100	0
66	10	90

Als Lösungsmittel dienten Acetonitril (Gradientgrade, Fischer Scientific) [Eluent A] und bidestilliertes Wasser + Ameisensäure (500+5 VT) [Eluent B]. Die Trennung erfolgte mit einem Gradienten (Tab. E-14). Die massenspektrometrische Detektion erfolgte im positiven und negativen ESI-Modus. Dabei wurde ein Massebereich von 50 bis 550 m/z abgedeckt.

7.3 HPLC-DAD der phenolischen Komponenten

Die Untersuchung der phenolischen Komponenten erfolgte mittels HPLC-DAD (Tab. E-6). Dazu wurde die nach Kap. 7.1 isolierte Lösung an einer Trennsäule von Merck (PurospherStar C18; 250x4 mm I.D.) und einer Vorsäule aus demselben Material (30x3 mm I.D.) chromatographiert. Als Lösungsmittel dienten Acetonitril (HPLCgrade, Merck) [Eluent A]

Tab. E-15 Gradient der HPLC-DAD-Analytik der phenolischen Komponenten

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	10	90
18	18	82
22	30	70
42	45	55
62	100	0
65	100	0

und 0,1%ige wässrige Ameisensäure [Eluent B]. Die Trennung erfolgte mit einem Gradienten (Tab. E-15). Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm. Zusätzlich wurde während des gesamten Laufes das UV/VIS-Spektrum von 200 bis 600 nm (3 Scans/s; Bandbreite 4 nm) aufgezeichnet.

8. ANALYTIK DER ANTHOCYANE

Die prozentuale Übergangsrate der Anthocyane aus den grob geschnittenen Stockrosenblüten in den Ölauszug wurde bestimmt, indem die Rotfärbung eines Drogenextrakts mit der des Ölauszugs gleicher Drogenkonzentration spektralphotometrisch im VIS bei 521 nm verglichen wurde (Tab. E-11). Aus 1,50 g der Droge wurden die Anthocyane dreimal mit 30 mL einer Mischung aus Methanol-Salzsäure 25% (9+1 VT) erschöpfend extrahiert und die vereinigten Extrakte auf 100 mL aufgefüllt. Aus dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen in Aceton hergestellt, photometrisch vermessen und daraus eine Regressionsgerade erstellt (Tab. H-14). Von den praktisch farblosen Ölauszügen W 10% und H 10% wurden 2,5 g mit Aceton auf 10,0 mL aufgefüllt und direkt photometrisch vermessen (2,5 g reines Olivenöl in Aceton als Kompensationslösung).

Mit diesen Absorptionswerten der Ölauszüge wurde aus der Regressionsgeraden der Droge die theoretische Menge an Droge in der Messlösung der Ölauszüge ermittelt. Diese ermittelte theoretische Menge an Droge wurde mit der tatsächlich eingesetzten ins Verhältnis gesetzt und so die prozentuale Übergangsrate der Anthocyane aus den Stockrosenblüten in die Ölauszüge ermittelt.

9. ANALYTIK DER CAROTINOIDE

Die Carotinoide wurden aus den grob geschnittenen Ringelblumenblüten spektralphotometrisch als Summenparameter bestimmt und berechnet als β -Carotin angegeben. Zur Bestimmung des Gesamtcarotinoid-Gehalts in der Droge wurde eine β -Carotin-Kalibriergerade erstellt. Dazu wurden 20 mg β -Carotin in 50 mL einer Mischung aus Hexan und Aceton (1+1 VT) gemischt und aus dieser Stammlösung geeignete Verdünnungen hergestellt (Tab. H-15), die dann jeweils dreimal photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm vermessen wurden (Tab. E-11).

Da die Carotinoidfraktion aus Ringelblumenblüten sowohl Carotine als auch Xanthophylle enthält und in der Literatur keine einheitliche Extraktionsmethode beschrieben ist, musste die effizienteste Extraktion der Carotinoide aus der Droge ermittelt werden.

Dazu wurden drei Ansätze zu je 2,0 g Droge mit 50 mL der in Tab. E-16 aufgeführten Lösungsmittelgemischen fünfmal über mehrere Stunden extrahiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in 25,0 mL Hexan-Aceton (1+1 VT) gelöst und zur Messung 1:20 verdünnt. Der Gehalt jeder Lösung wurde dreimal photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt und anhand der erstellten Kalibriergerade berechnet.

Zur Bestimmung des Carotinoidgehalts der Ölauszüge wurde eine gesonderte Kalibriergerade erstellt. Um die spektralen Einflüsse des enthaltenen Olivenöls zu kompensieren wurden 10 mg der Referenzsubstanz β -Carotin in 50 mL einer Mischung aus Olivenöl (20,0 g/L) in Hexan-Aceton (1+1 VT) gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden geeignete Verdünnungen hergestellt und je dreimal photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm vermessen (Tab. H-17). Der Carotinoid-Gehalt der Ölauszüge wurde ebenfalls nach Verdünnen direkt spektralphotometrisch bestimmt. Dazu wurden jeweils 0,5 g Ölauszug mit Hexan-Aceton (1+1 VT) auf 25,0 mL verdünnt. Pro Ölauszug wurden drei Verdünnungen erstellt, die jeweils dreimal vermessen wurden.

Tab. E-16 Verwendete Lösungsmittelgemische zur Extraktion der Carotinoide aus Ringelblumenblüten

Lösungsmittelgemische
TBME
Ethanol
Hexan+Aceton (1+1 VT)
Ethylacetat/Methanol/Petrolether (1/1/1 VT)

10. UNTERSUCHUNG DER STEROLE UND TRITERPENALKOHOLE

10.1 Extraktion der Sterole und Triterpenalkohole aus Droge und Ölauszügen

Die Extraktion der Sterole und Triterpenalkohole mit dem unverseifbaren Anteil erfolgte nach der deutschen Standardmethode F-III 1 „Sterine – Isolierung und gaschromatographische Untersuchung“. Dazu wurden 0,025 g Droge in ein Schraubdeckelglas eingewogen, mit 50 µL ISTD-Lösung (100,0 mg Cholestanol in 100,0 mL TBME) versetzt und durch Zugabe von 5 mL ethanolischer KOH-Lösung (3,0 g KOH in 5 mL dest. Wasser gelöst und mit Ethanol (96%) auf 100,0 mL verdünnt) in einem Heizblock (Eurotherm) bei 80°C verseift und gleichzeitig extrahiert. Der Ansatz wurde immer wieder homogenisiert (Vortex). Nach 30 min. wurde der Lösung 5 mL Ethanol zugegeben, erneut homogenisiert und der gesamte Probenansatz auf eine vorbereitete Aluminiumoxid-Säule (20 g Aluminiumoxid 90 [aktiv, neutral, Aktivitätsstufe I] in 40 mL Ethanol suspendiert) gegeben. Der unverseifbare Anteil wurde mit 10 mL Ethanol und anschließend mit 60 mL TBME eluiert, am Vakuum-Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und mit TBME quantitativ in ein 2 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt, das Lösungsmittel mit dem Stickstoff abgeblasen und bis zur gaschromatographischen Untersuchung im Exsikkator bei Raumtemperatur maximal einen Tag gelagert.

Die Isolierung und Verseifung der Pflanzenöle und der Ölauszüge erfolgte wie oben beschrieben analog zur der Ringelblumenblüten unter Verwendung von 0,250 g Probenmaterial.

10.2 GC-FID der Sterole und Triterpenalkohole

Die Derivatisierung der Sterole und Triterpenalkohole erfolgte gemäß der Vorschrift des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur. 5.4 „Sterole in fetten Ölen“ Nr. 2.4.23). Dazu wurden zur getrockneten Probe in das Reaktionsgefäß (nach Kap. E.10.1) 0,5 mL der Derivatisierungslösung (Pyridin + Chlortrimethylsilan + Hexamethyldisilazan: 9+1+3 VT) gegeben und in einem Heizblock (Eurotherm) bei ca. 80°C derivatisiert. Nach Abkühlen des Reaktionsgefäßes wurde zentrifugiert, der klare Überstand in ein GC-Vial überführt und direkt zur GC eingesetzt. Die Analyse der Sterole und Triterpenalkohole erfolgte mittels GC-FID (Tab. E-9) bei einer konstanten Ofentemperatur von 290°C. Die Identifizierung der einzelnen Substanzpeaks erfolgte anhand von Vergleich mit Standardsubstanzen und Literaturdaten. Zusätzlich wurden die Sterol- und Triterpenalkoholzusammensetzung gut bekannter pflanzlicher Öle (Rapsöl, Sonnenblumenöl und Olivenöl) analysiert, mit Literaturdaten verglichen und damit die Peakidentifizierung abgesichert.

10.3 Wiederfindungsrate

Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die Referenzsubstanzen Cholestanol, Betulin, sowie Cholesterol verwendet. Zunächst wurde eine Cholesterol-Kalibriergerade erstellt (Tab. H-20). Für die Wiederfindungsrate der Referenzsubstanzen aus Olivenöl wurden von jedem Standard je 100,0 mg eingewogen und in je 100,0 mL TBME gelöst.

Die direkte Bestimmung der Konzentration der Standards erfolgte mit je 50 µL jeder Standardlösung, die zusammen in ein Reaktionsgefäß pipettiert, das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom abgedampft und anschließend derivatisiert (s.o.) wurden. Anschließend wurde Olivenöl mit diesen Standardlösungen dotiert. Dazu wurden je 50 µL der einzelnen Standardlösungen in ein Schraubdeckelglas pipettiert, unter einem Stickstoffstrom zur Trockene eingengt und in 250 mg Olivenöl gelöst. Diese Mischung wird wie in Kap. E.10.1 und E.10.2 beschrieben verseift, extrahiert, derivatisiert und zur GC eingesetzt. Es wurden sowohl die reinen Standards, als auch die Öldotierungen jeweils sechsmal aufgearbeitet und zur GC verwendet (Tab. H-20 und Tab. H-21).

11. UNTERSUCHUNG DER SCHARFSTOFFE

11.1 Isolierung der Scharfstoffe aus der Droge und den Ölauszügen

Zur Isolierung der Scharfstoffe aus den Cayennepfefferfrüchten wurden 2,5 g Droge in einem Jodzahlkolben eingewogen, dreimal mit je 30 mL MeOH (80%) im Ultraschallbad für 15 min extrahiert und die vereinigten methanolischen Extrakte am Vakuumrotationsverdampfer auf 10 mL eingengt. Die nun wässrige Lösung wurde auf eine mit ca. 10 g Extrelut NT (Merck, Darmstadt) trocken befüllte Chromatographiesäule gegeben und nach 15 min Einwirkzeit mit 100 mL Ethylacetat eluiert. Das Eluat wurde zur Trockene eingengt, in 10,0 mL Methanol aufgenommen und diente nach Membranfiltration (0,2 µm, Nylonmembran, 25 mm Durchmesser, Roth, Karlsruhe) zur Injektion in die HPLC. Es wurden drei Extrakte der Droge hergestellt und jeder Extrakt zweimal chromatographiert.

Die Isolierung der Capsaicinoide der Ölauszügen erfolgte aus 20,0 g Ölauszug, die in 50 mL Petrolether gelöst und dreimal mit je 40 mL MeOH (80%) extrahiert wurden. Die vereinigten methanolischen Phasen wurden anschließend zur Entfernung letzter Fettreste mit ca. 50 mL Petrolether gewaschen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der der Droge. Es wurden je Ölauszug zwei Extrakte hergestellt, die dann jeweils zweimal chromatographiert wurden.

11.2 HPLC-DAD der Scharfstoffe

Die chromatographische Trennung und Quantifizierung der Capsaicinoide erfolgte mittels HPLC-DAD (Tab. E-6). Dazu wurde die nach Kap. 5.1 isolierte Lösung an einer Trennsäule von Merck (PurospherStar C18; 250x4 mm I.D.) und einer Vorsäule aus demselben Material (4x4 mm I.D.) chromatographiert. Als Lösungsmittel dienten Acetonitril (HPLCgrade, Merck) [Eluent A] und 0,1% Ameisensäure in bidestilliertem Wasser (v/v) [Eluent B]. Die Trennung erfolgte mit einem Gradienten (Tab. E-17). Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Zusätzlich wurde während des gesamten Laufs das UV/VIS-Spektrum

Tab. E-17 Gradient der HPLC-DAD-Analytik der Capsaicinoide

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	70	30
22	30	70
23	0	100
27	0	100
29	70	30

von 200 bis 600 nm (3 Scans/s; Bandbreite 4 nm) aufgezeichnet. Zur quantitativen Bestimmung der Capsaicinoide wurde mit Hilfe einer Standard-Mischung (Capsaicin, Roth, Karlsruhe), die mittels HPLC aus „natürlicher Quelle“ isoliert wurde, eine Kalibriergerade erstellt. Dazu wurden 10,0 mg des Capsaicin-Standards in 10,0 mL Methanol gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden durch geeignete Verdünnungen die einzelnen Standardlösungen hergestellt und nach Membranfiltration (s.o.) direkt in die HPLC injiziert (Tab. H-25 und Tab H-26). Aus den erstellten Capsaicinoid-Kalibriergeraden wurden die prozentuale Zusammensetzung des Standardgemisches, die Gehalte der Droge und der Ölauszüge bestimmt.

11.3 Wiederfindungsrate

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurde die Referenzsubstanz Nonivamid (Pelargonic acid vanillyamide, $\geq 97\%$, Fluka) verwendet. Zunächst wurde eine Kalibriergerade erstellt. Dazu wurden 10,0 mg Nonivamid in Methanol (80%) zu 50,0 mL gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden durch geeignete Verdünnungen (Tab. H-24) die einzelnen Standardlösungen hergestellt und nach Membranfiltration (0,2 μm , Nylonmembran, 25 mm Durchmesser, Roth, Karlsruhe) in die HPLC injiziert. Für die Methodenwiederfindung aus dem Olivenöl wurden 2,0 mg Nonivamid in einem Jodzahlkolben mit 20,000 g Olivenöl unter Rühren gelöst und anschließend mit 50 mL Petrolether verdünnt. Diese Lösung wurde dann wie in Kap. E.11.1 beschrieben extrahiert, mit dem Unterschied, dass das resultierende Eluat der säulenchromatographischen Aufreinigung in 20,0 mL Methanol aufgenommen wurde. Auf diese Art wurden sechs Öldotierungen analysiert.

12. UNTERSUCHUNG DER ALKALOIDE

12.1 Isolierung der Alkaloide aus der Droge und aus den Ölauszügen

Die Untersuchung der Effizienz der Extraktion der Alkaloide aus der Droge wurde mit den in Tab. E-18 aufgeführten Lösungsmittelgemischen durchgeführt. Dazu wurden 200 mg grob

Tab. E-18 Lösungsmittelgemische zur Extraktion der Alkaloide aus der Droge

Lösungsmittelgemische
Methanol (75%)
Methanol (50%)
Methanol (25%)
Wasser
Methanol (50%) + Ameisensäure [100+1 VT]
Methanol (50%) + Ammoniak [100+1 VT]
Ethanol (75%)
Ethanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]

geschnittene Berberitzenwurzelrinde dreimal mit je 5 mL des jeweiligen Lösungsmittelgemisches im Ultraschallbad extrahiert, die vereinigten Extrakte zur Trockene eingengt, in 5,0 mL des Elutionsmittels (Acetonitril in 10 mM Acetatpuffer [1 + 3 VT]) aufgenommen und nach Membranfiltration (0,2 μm , Nylonmembran, 25 mm Durchmesser, Roth, Karlsruhe) zur HPLC eingesetzt.

Am effizientesten war eine Mischung aus Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]. Damit wurden 30,00 g Ölauszug zunächst in 50 mL Petrolether gelöst und dann je dreimal mit 50 mL dieser Lösungsmittelmischung extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden zur Entfernung letzter Fettreste mit 100 mL Petrolether gewaschen, am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt und in 1,0 mL des Elutionsmittels (Acetonitril in 10 mM Acetatpuffer [1 + 3 VT]) aufgenommen. Diese Lösung diente nach Membranfiltration (0,2 µm, Nylonmembran, 25 mm Durchmesser, Roth, Karlsruhe) zur HPLC.

12.2 HPLC-DAD der Alkaloide

Die chromatographische Trennung und Quantifizierung der Alkaloide erfolgte mittels HPLC-DAD (Tab. E-6). Dazu wurde die nach Kap. E.12.1 isolierten Lösung an einer Trennsäule von Merck (Luna C18; 250x4 mm I.D.) und einer Vorsäule aus demselben Material (4x4 mm I.D.) chromatographiert. Als Lösungsmittel dienten Acetonitril (HPLCgrade, Merck) [Eluent A] und 10mM Acetatpuffer in bidestilliertem Wasser [Eluent B]. Die Trennung erfolgte mit einem Gradienten (Tab. E-19). Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 235 nm. Zusätzlich wurde während des gesamten Laufes das UV/VIS-Spektrum von 200 bis 600 nm (3 Scans/s; Bandbreite 4 nm) aufgezeichnet.

Tab. E-19 Gradient der HPLC-DAD-Analytik der Alkaloide

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	90	10
15	50	50
17	0	100
22	0	100
24	70	30

Zur quantitativen Bestimmung der Alkaloide wurde mit Hilfe der Referenzsubstanz Berberin eine Kalibriergerade erstellt. Dazu wurden 25,0 mg des Berberin-Standards in 25,0 mL einer Mischung aus Acetonitril in 10 mM Acetatpuffer (1 + 3 VT) gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden durch geeignete Verdünnungen (Tab. H-31) die einzelnen Standardlösungen hergestellt und nach Membranfiltration (s.o.) direkt in die HPLC injiziert.

12.3 Wiederfindungsrate

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate der Methode wurde Olivenöl mit Berberin dotiert. Dazu wurden zunächst 3,0 mg Berberin in 40,00 g Olivenöl gelöst, in einer zweiten Versuchsreihe aufgrund der schlechten Löslichkeit von Berberin im Öl 10,0 mg Berberin in 50,00 g Olivenöl. Der Lösevorgang musste über mehrere Stunden durch intensives Rühren unterstützt werden. Die dotierten Öle wurden dann wie oben beschrieben aufgearbeitet, die Öle der ersten Versuchsreihe in 10,0 mL des Elutionsmittels (Acetonitril in 10 mM Acetatpuffer [1 + 3 VT]) aufgenommen, die Öle der weiteren Versuchsreihen in 5,0 mL. Die prozentuale Wiederfindung berechnet sich aus dem Verhältnis der ermittelten Berberinkonzentration der Öldotierungen zu den eingesetzten Berberinkonzentrationen. Es wurden insgesamt zwölf Öldotierungen aufgearbeitet und zur HPLC verwendet.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der breiten Anwendung öliger Extrakte aus pflanzlichen Drogen in Pharmazie und Kosmetik ist das Wissen über die stoffliche Zusammensetzung dieser Ölauszüge und über die Qualität des Extraktionsverfahrens bislang gering. Ziel dieser Arbeit war es somit, die Extraktionseffizienz mit Olivenöl und die Qualität der Ölauszüge im Hinblick auf die stoffliche Zusammensetzung der Ölauszüge im Vergleich zum pflanzlichen Ausgangsmaterial zu durchleuchten. Dafür wurden zunächst instrumental-analytische Methoden (HPLC-DAD, LC-MS, GC-FID, GC-MS, VIS-Photometrie) entwickelt, mit denen dann die Pflanzeninhaltsstoffe in der Droge und in der öligen Matrix der Ölauszüge qualitativ und quantitativ untersucht wurden. Im Focus waren dabei folgende Drogen und Inhaltsstoffgruppen:

Arnikablüten <i>Arnica montana</i> L.	Sesquiterpenlactone
Kamillenblüten <i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert	ätherisches Öl Phenolcarbonsäure-Derivate Flavonoide Cumarine
Stockrosenblüten <i>Alcea rosea</i> L. var. <i>nigra</i>	Anthocyane
Ringelblumenblüten <i>Calendula officinalis</i> L.	Carotinoide Sterole Triterpenalkohole
Cayennepfefferfrüchte <i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>minimum</i> (Mill.) Heiser <i>Capsicum frutescens</i> L.	Capsaicinoide
Berberitzenwurzelrinde <i>Berberis vulgaris</i> L.	Alkaloide

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Ölauszüge, die nach den Vorschriften des Homöopathischen Arzneibuchs (HAB 2006) entweder warm (37°C über 7 Tage - W 10%) oder heiß (65°C über 4 Std. - H 10%) extrahiert wurden, machen deutlich, dass die Lipophilie eines Inhaltsstoffs dessen Übergang aus der Droge in das Olivenöl entscheidend bestimmt. So werden hohe Übergangsraten für die Sesquiterpenlactone von 70 bis 81%, für das ätherische Öl von 80 bis 84% und für die Capsaicinoide von 68 bis 85% bestimmt. Demgegenüber gehen die hydrophilen Flavonoidglykoside, die kationischen Anthocyane und die basischen Alkaloide sowie die Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate nicht oder nur in Spuren in das Olivenöl über. Die von den Triterpen-monoalkoholen (22 bis 30%) über die Triterpen-dialkohole (31 bis 49%) zu den Triterpen-trialkoholen (73 bis 85%) ansteigenden Übergangsraten begründen sich durch den in dieser Reihenfolge steigenden Veresterungsgrad mit langkettigen Fettsäuren und damit entsprechend ansteigender Lipophilie.

Des Weiteren modifiziert die Lokalisation der Stoffe in der Pflanze die Übergangsrate. So gehen die lipophilen Carotinoide der Chromoplasten nur zu 41 bis 50% und die in den Membranen verankerten Sterole sogar nur zu 3 bis 11% über. Auch die in tieferen Gewebeschichten liegenden Inhaltsstoffe lassen sich weniger effektiv extrahieren. Beispielsweise gehen die lipophilen Cumarine zu nur 37 bis 61% über, umgekehrt ist die relativ hohe Übergangsrate der methoxylierten Flavonoidglyka (61 bis 72%) durch deren Lokalisation auf der Oberfläche begründet, während die relativ geringen Übergangsraten der acylierten Flavonoidglucoside von 23 bis 38% und der hydroxylierten Flavonoidglyka von 11 bis 27% eine Folge der Summe aus geringer Lipophilie und Lokalisation im Gewebe bzw. in der Zelle sind.

Um den Einfluss der Extraktionsbedingungen und Extraktionsmethoden auf die Qualität der Extraktion zu untersuchen, wurden 42 weitere Ölauszüge aus Kamillenblüten hergestellt und diese auf die Effizienz des Übergangs der Pflanzeninhaltsstoffe ins Olivenöl und in Bezug auf die Inhaltsstoffmuster analysiert. Variiert wurden folgende Parameter:

Extraktionstemperatur (20°C, 35°C, 50°C, 65°C)

Extraktionsdauer (2 h, 4 h, 12 h, 24 h, 48 h, 168 h and 336 h)

Kontinuierliches Rühren über den gesamten Extraktionszeitraum

Vorbehandlung der Droge mit Ethanol (94%)

Die Ergebnisse zeigten, dass mit höherer Extraktionstemperatur die Effizienz der Extraktion aller Pflanzeninhaltsstoffe gesteigert werden kann und zwar nahezu unabhängig von der Extraktionsdauer. Begrenzender Faktor für die Extraktionstemperatur ist die Haltbarkeit des Olivenöls, das bei 65°C bereits nach zwei Tagen ranzig wird.

Kontinuierliches Rühren erhöht zwar für weniger lipophile Stoffgruppen, die nicht zu tief im Gewebe lokalisiert sind, die Übergangsrates, führt jedoch zu einem sehr feinen Abrieb der Droge und damit zu trüben Ölauszügen. Die Vorbehandlung der Droge mit Ethanol steigert die Effizienz der Extraktion aller Stoffgruppen, insbesondere derer, die in tieferen Gewebeschichten lokalisiert sind. Diese Vorbehandlung führt aber auch zu leichten Veränderungen der Stoffmuster, beispielsweise des ätherischen Öls.

Überträgt man diese Erkenntnisse auf die Ölauszüge des Homöopathischen Arzneibuchs, so kann festgestellt werden, dass mit den Extraktionsbedingungen in den Herstellungsvorschriften des HAB eine sehr gute Qualität pflanzlicher Ölauszüge erreicht werden kann.

G. SUMMARY

Oil extracts of herbal drugs are widely used in pharmacy and cosmetics. However there is little knowledge about the phytochemical composition of the oil extracts and also the knowledge about the quality of the extraction methods. Therefore the aim of this work is to study the efficiency of several extraction procedures with olive oil and to elucidate the quality of these extracts with regard to their phytochemical composition in comparison with the phytochemical patterns of the herbal drugs used for extraction. For this purpose special analytical methods (HPLC-DAD, LC-MS, GC-FID, GC-MS, VIS-photometry) were developed which were used on the one hand to characterise the qualitative and quantitative compositions of the herbal drugs and on the other hand the compositions of the corresponding oil extracts. The following herbal drugs and groups of constituents were studied:

Arnica flower <i>Arnica montana</i> L.	sesquiterpene lactones
Chamomile flower <i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert	essential oil phenolcarboxylic acids flavonoids coumarins
Rose mallow flower <i>Alcea rosea</i> L. var. <i>nigra</i>	anthocyanes
Calendula flower <i>Calendula officinalis</i> L.	carotenoids sterols triterpene alcohols
Capsicum <i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>minimum</i> (Mill.) Heiser <i>Capsicum frutescens</i> L.	capsaicinoids
Barberry root bark <i>Berberis vulgaris</i> L.	alkaloids

The results of the investigations of oil extracts, which were extracted according to the regulations of the German Homoeopathic Pharmacopoeia (HAB 2006) either warm (37°C over 7 days, W 10%) or hot (65°C over 4 hours, H 10%) reveal that the lipophilic character of the plant constituents mainly determines their transfer into the olive oil. Therefore high transfer rates were found for the sesquiterpene lactones (71 to 81%), for the essential oils (80 to 84%) and for the capsaicinoids (68 to 85%). In contrast the hydrophilic flavonoid glycosides, the kationic anthocyanes and the alkaline alkaloids as well as the phenolcarboxylic acids and their derivatives did not migrate or only in traces into the olive oil. The increasing transfer rates from the triterpene monoalcohols (22 to 30%) over the triterpene dialcohols (31 to 49%) to the triterpene trialcohols (73 to 85%) can be explained by the increasing grade of esterification with long-chain fatty acids in the mentioned order resulting in an increasing lipophily.

It was found that the localisation of the constituents in the plant modifies their transfer rate. Consequently the lipophilic carotenoids situated in the chromoplasts migrate into the oil only with percentages of 41 to 50% and the sterols, which are bound within the membranes only, with percentages of 3 to 11%. Constituents in deeper plant tissues are also extracted less efficiently. For example the lipophilic coumarins show transfer rates only of 37 to 61%, whereas the methoxylated flavonoid aglycones showed relatively high transfer rates (61 to 72%) caused by their localisation on the surface. The relatively low transfer rates of the acylated flavonoid glycosides (23 to 38%) and of the flavonoid aglycones (11 to 27%) is a consequence of the sum of their low lipophily and their localisation in the tissue or in the cells.

In order to investigate the influence of the extraction parameters and extraction methods on the quality of the extraction procedure, 42 further oil extracts of chamomile flowers were produced and were analysed with regard to the efficiency of the transfer of the plant constituents into the olive oil and with regard to the constituent patterns. The following parameters were varied:

extraction temperature (20°C, 35°C, 50°C, 65°C)

extraction period (2h, 4h, 12h, 24h, 48h, 168h, 336h)

permanent stirring over the extraction period

pretreatment of the drug with ethanol (94%)

The results make clear that with higher extraction temperatures the extraction efficiency of all plant constituents can be increased independent of the extraction period. The stability of the olive oil is the only limiting factor for the extraction temperature because olive oil becomes rancid at 65°C after two days. Permanent stirring on the one hand increases the transfer rates of constituents with low lipophily and localised not too deep in the tissue, on the other hand it causes an abrasive dust producing dusty oil extracts. The pretreatment of the drug with ethanol increases the extraction efficiency of all the constituents especially of those which are situated in deeper plant tissues. However the pretreatment with ethanol causes changes of the constituent patterns, e.g. that of the essential oils.

Transferring these findings on the oil extracts which are produced according to the regulations of the HAB, it can be stated that with these extraction procedures oil extracts of high quality can be obtained.

H. ANHANG

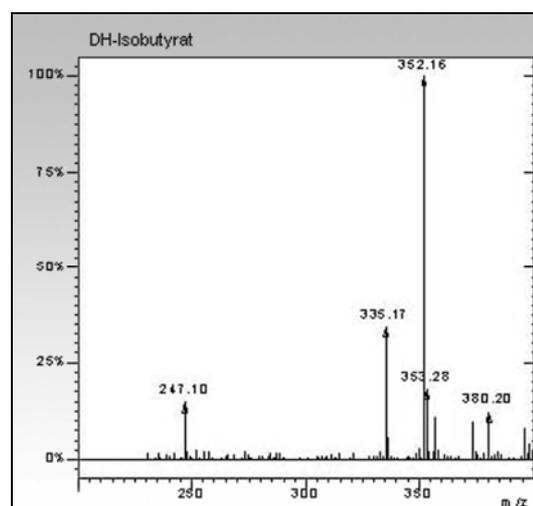
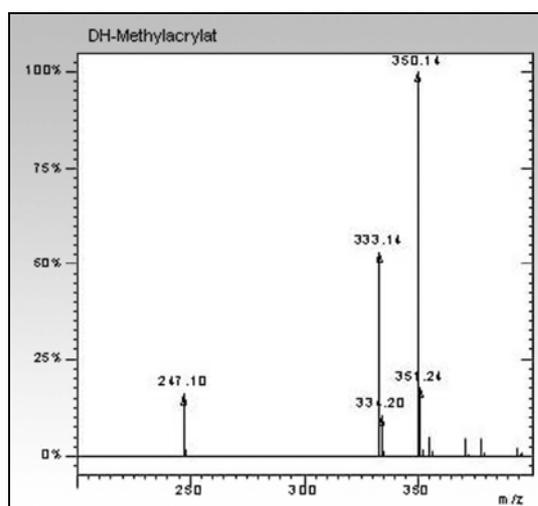
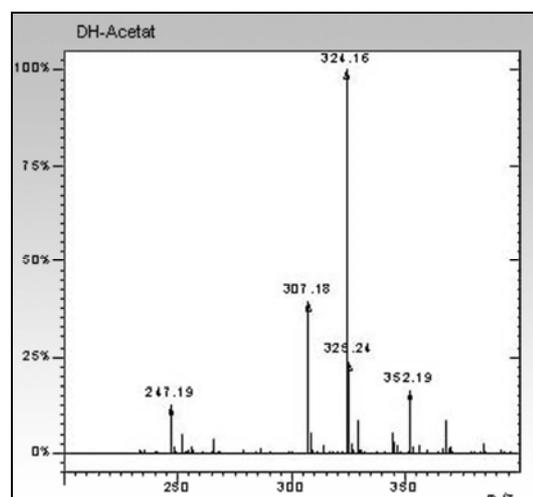
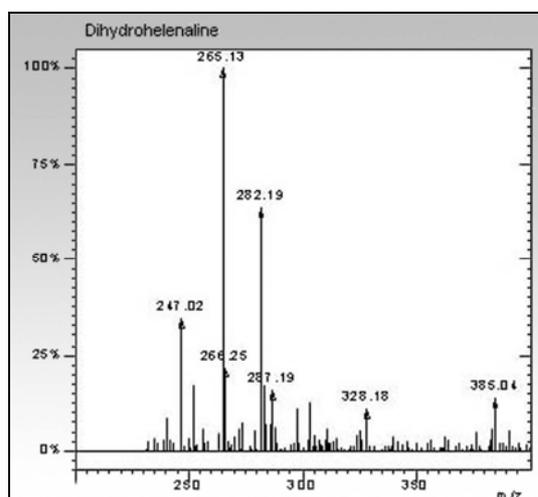


Abb. H-1 Massenspektren der in Arnikablüten identifizierten Sesquiterpenlactone (DH: Dihydrohelenalin, H: Helenalin)

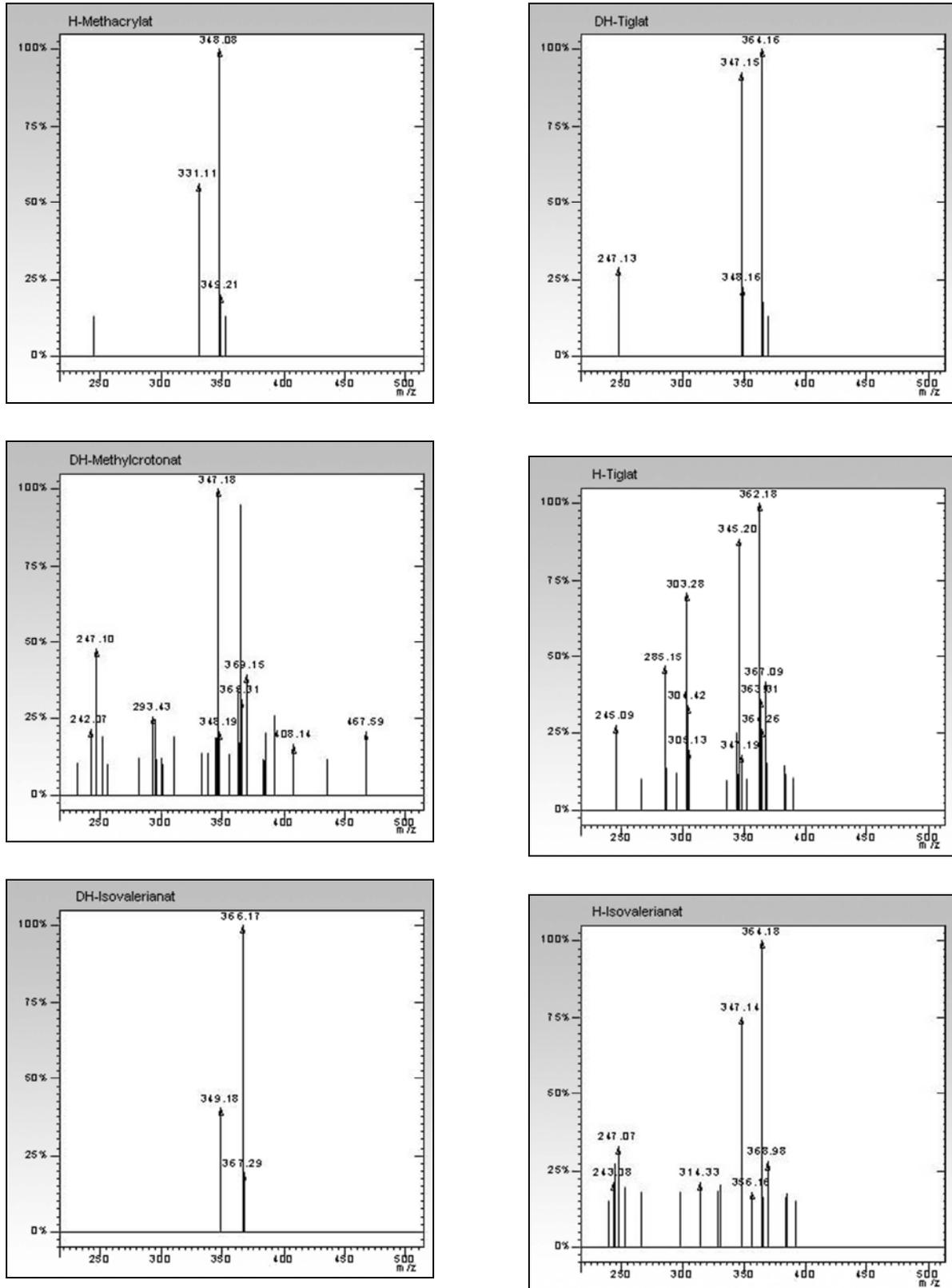


Abb. H-1 Massenspektren der in Arnikablüten identifizierten Sesquiterpenlactone (Fortsetzung) (DH: Dihydrohelenalin, H: Helenalin)

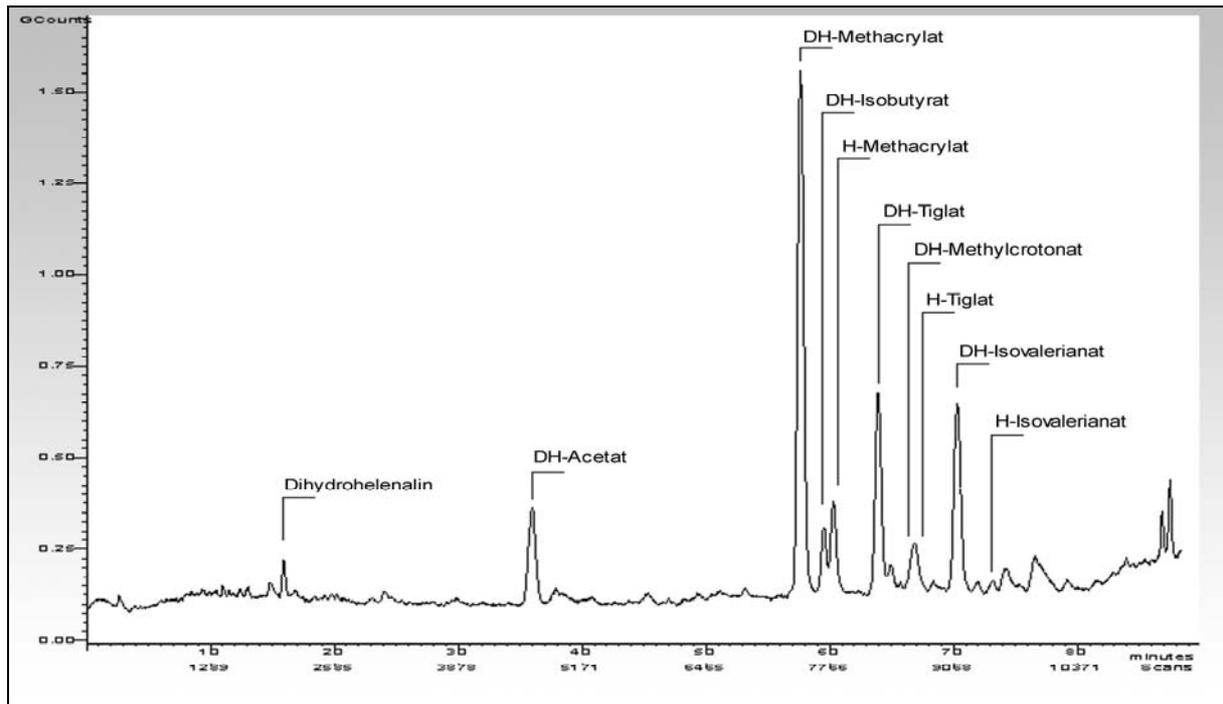


Abb. H-2 LC-MS-Chromatogramm (RIC) der Sesquiterpenlactone aus Arnikablüten. (DH: Dihydrohelenalin, H: Helenalin)

Tab. H-1 Ermittelte Werte der Santonin-Kalibriergerade zur Ermittlung der Wiederfindungsrate (n=5)

	Konzentration [mg/L]	Gemittelte Peakfläche	rel. Standardabweichung
Standard 1	66,12	549,2	0,07 %
Standard 2	77,14	640,2	0,06 %
Standard 3	88,16	735,8	0,06 %
Standard 4	99,18	823,2	0,12 %
Standard 5	110,20	917,2	0,09 %

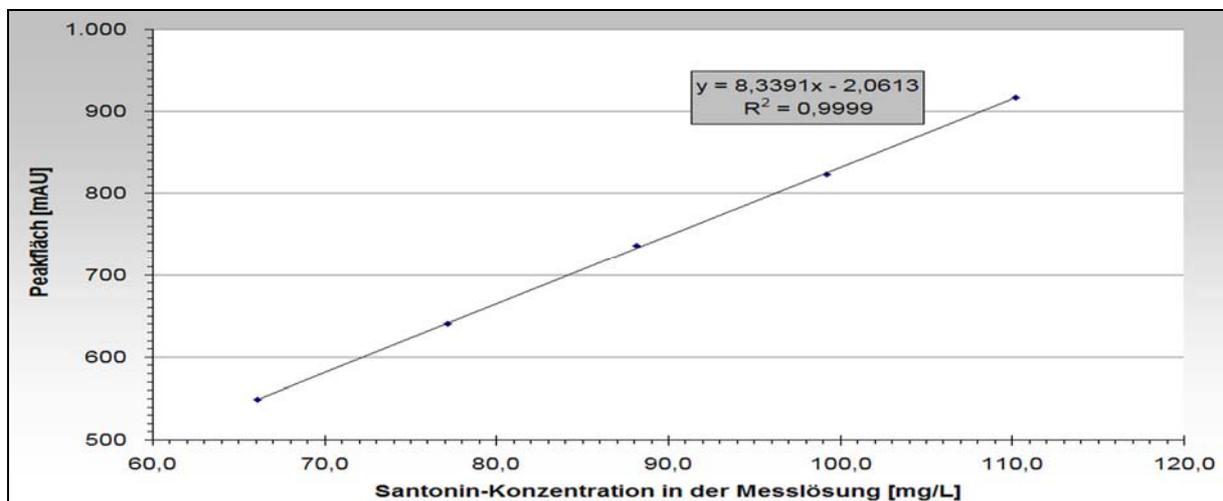


Abb. H-3 Kalibriergerade von Santonin

Tab. H-2 Wiederfindungsversuche des Sesquiterpenlactons Santonin aus Olivenöl

	Santonin-Konzentration im Öl [mg/kg]	Einwaage Öl [g]	Fläche des Santonin-Peaks [mAU]	Auffüllvolumen [mL]	ermittelte Konzentration [mg/kg]	Wiederfindung
Probe 1	551,0	4,003	650,6	25,0	489,2	88,8%
Probe 2	551,0	4,003	650,3	25,0	488,9	88,7%
Probe 3	551,0	4,003	651,0	25,0	489,4	88,8%
Probe 4	551,0	4,003	648,1	25,0	487,3	88,4%
Probe 5	551,0	4,003	651,2	25,0	489,6	88,9%
Probe 6	551,0	4,109	679,6	25,0	510,9	92,7%
Probe 7	551,0	4,109	681,3	25,0	512,2	93,0%
Probe 8	551,0	4,109	680,5	25,0	511,6	92,8%
Probe 9	551,0	4,109	681,5	25,0	512,3	93,0%
Probe 10	551,0	4,109	681,0	25,0	512,0	92,9%
Probe 11	551,0	4,109	681,3	25,0	512,2	93,0%
Probe 12	551,0	3,998	653,4	25,0	491,3	89,2%
Probe 13	551,0	3,998	652,7	25,0	490,7	89,1%
Probe 14	551,0	3,998	655,0	25,0	492,5	89,4%
Probe 15	551,0	3,998	655,6	25,0	492,9	89,5%
Probe 16	551,0	3,998	653,8	25,0	491,5	89,2%
Probe 17	551,0	3,998	653,5	25,0	491,3	89,2%
Probe 18	551,0	4,027	688,3	25,0	517,4	93,9%
Probe 19	551,0	4,027	689,8	25,0	518,5	94,1%
Probe 20	551,0	4,027	688,2	25,0	517,3	93,9%
Probe 21	551,0	4,027	687,7	25,0	517,0	93,8%
Probe 22	551,0	4,027	689,3	25,0	518,2	94,0%
Probe 23	551,0	4,027	690,5	25,0	519,0	94,2%

Tab. H-3 Blindwerte der verwendeten Destillationsapparaturen zur quantitativen Bestimmung des ätherischen Öls aus Kamillenblüten und den Pressrückständen der Ölauszugsherstellung

	Apparatur 1			Apparatur 2		
Einwaage Wasser [mL]	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Vorlage Xylol [mL]	0,500	0,500	0,500	0,515	0,505	0,510
Endvolumen [mL]	0,460	0,470	0,480	0,495	0,470	0,475
Differenz [mL]	0,040	0,030	0,020	0,020	0,035	0,035
Blindwert	0,030 mL			0,030 mL		

Tab. H-4 Ergebnisse der quantitativen Destillation des ätherischen Öls der Droge

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
Einwaage Droge [g]	50,0	50,0	50,0	50,0
Vorlage Xylol [mL]	0,515	0,520	0,490	0,500
Endvolumen [mL]	0,720	0,720	0,690	0,700
Volumen an ätherischem Öl [mL]	0,235 ^a	0,230 ^a	0,230 ^a	0,230 ^a
Gehalt an ätherischem Öl [mL/kg]	4,7	4,6	4,6	4,6

^a unter Berücksichtigung des ermittelten Apparaturenblindwertes (Tab. H-3)

Tab. H-5 Ergebnisse der quantitativen Destillation des ätherischen Öls der Pressrückstände aus der Herstellung des Ölauszugs W 10% aus Kamillenblüten

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
Einwaage extrahierte Droge [g]	50,0	50,0	50,0	50,0
Vorlage Xylol [mL]	0,500	0,500	0,520	0,490
Endvolumen [mL]	0,510	0,505	0,525	0,500
Volumen an ätherischem Öl [mL]	0,040 ^a	0,035 ^a	0,035 ^a	0,040 ^a
Gehalt an ätherischem Öl [mL/kg]	0,8	0,7	0,7	0,8

^a unter Berücksichtigung des ermittelten Apparaturenblindwertes (Tab. H-3)

Tab. H-6 Ergebnisse der quantitativen Destillation des ätherischen Öls der Pressrückstände aus der Herstellung des Ölauszugs H 10% aus Kamillenblüten

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
Einwaage extrahierte Droge [g]	50,0	50,0	50,0	50,0
Vorlage Xylol [mL]	0,500	0,500	0,505	0,515
Endvolumen [mL]	0,520	0,515	0,520	0,535
Volumen an ätherischem Öl [mL]	0,050 ^a	0,045 ^a	0,045 ^a	0,050 ^a
Gehalt an ätherischem Öl [mL/kg]	1,0	0,9	0,9	1,0

^a unter Berücksichtigung des ermittelten Apparaturenblindwertes (Tab. H-3)

Tab. H-7 Gemittelte Peakflächen und prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Pressrückständen der Herstellung des Ölauszugs W 10% aus Kamillenblüten (n=3)

	Gemittelte Peakfläche [mAU]	Gemittelter prozentualer Flächenanteil [%]	rel. Standardabweichung [%]
Artemisiaketon	3.217,0	0,7	0,00
Dodecansäure	9.051,1	1,9	0,13
Farnesen	28.429,2	5,7	0,01
Spathulenol	7.378,5	1,5	0,00
Bisabolonoxid A	70.599,2	14,2	0,01
Bisabolol	36.552,5	7,5	0,01
Chamazulen	11.702,8	2,3	0,01
Bisabololoxid A	226.987,5	45,7	0,33
cis-Spiroether	34.037,4	6,9	0,02

Tab. H-8 Gemittelte Peakflächen und prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Pressrückständen der Herstellung des Ölauszugs H 10% aus Kamillenblüten (n=3)

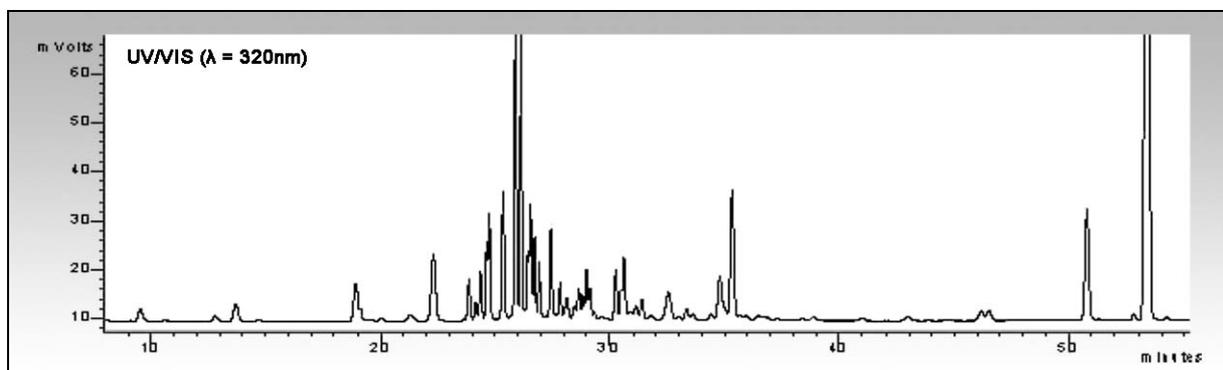
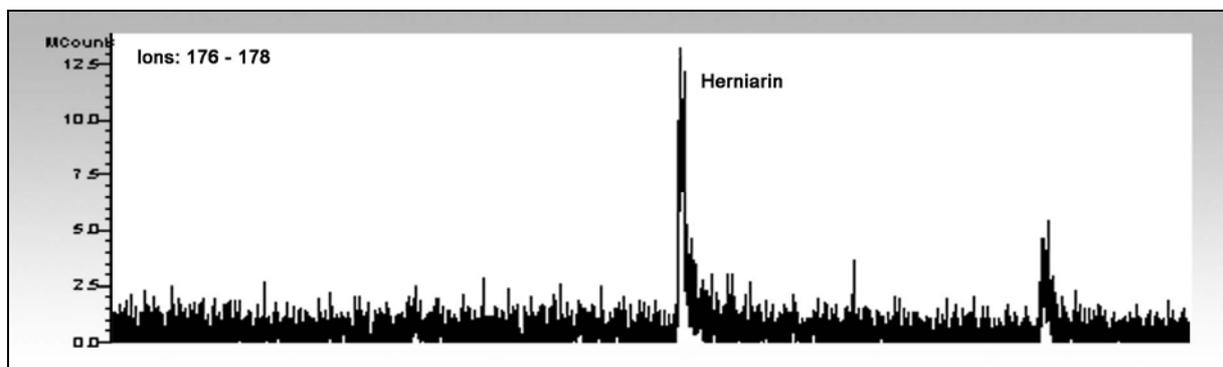
	Gemittelte Peakfläche [mAU]	Gemittelter prozentualer Flächenanteil [%]	rel. Standardabweichung [%]
Artemisiaketon	3.217,0	0,8	0,01
Dodecansäure	9.051,1	0,6	0,38
Farnesen	28.429,2	21,2	0,06
Spathulenol	7.378,5	3,1	0,16
Bisabolonoxid A	70.599,2	12,0	0,16
Bisabolol	36.552,5	9,2	0,56
Chamazulen	11.702,8	4,3	0,24
Bisabololoxid A	226.987,5	10,8	0,26
cis-Spiroether	34.037,4	1,6	0,28

Tab. H-9 Gemittelte Peakflächen und prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Ölauszügen W 10% aus Kamillenblüten nach Verseifen (n=3)

	Gemittelte Peakfläche [mAU]	Gemittelter prozentu- aler Flächenanteil [%]	rel. Standard- abweichung [%]
Farnesen	5.684,6	9,5	0,24
Spathulenol	445,4	0,8	0,01
Bisablonoxid A	5.555,6	9,9	0,15
Bisabolol	2.061,6	3,2	0,04
Chamazulen	326,0	0,5	0,10
Bisaboloxid A	20.751,0	36,7	0,22
cis-Spiroether	9.839,8	14,3	0,08

Tab. H-10 Gemittelte Peakflächen und prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Ölauszügen H 10% aus Kamillenblüten nach Verseifen (n=3)

	Gemittelte Peakfläche [mAU]	Gemittelter prozentu- aler Flächenanteil [%]	rel. Standard- abweichung [%]
Farnesen	2.793,9	7,0	0,47
Spathulenol	436,7	0,7	0,04
Bisablonoxid A	6.046,2	9,3	0,56
Bisabolol	1.719,5	2,5	0,00
Chamazulen	147,4	0,3	0,05
Bisaboloxid A	25.369,4	38,1	0,72
cis-Spiroether	10.083,8	13,4	0,31

**Abb. H-4 Begleitendes UV/VIS-LC-Chromatogramm der phenolischen Komponenten aus Kamillenblüten****Abb. H-5 ESI(+)-LC-MS Chromatogramm der phenolischen Komponenten aus Kamillenblüten, hier: Herniarin**

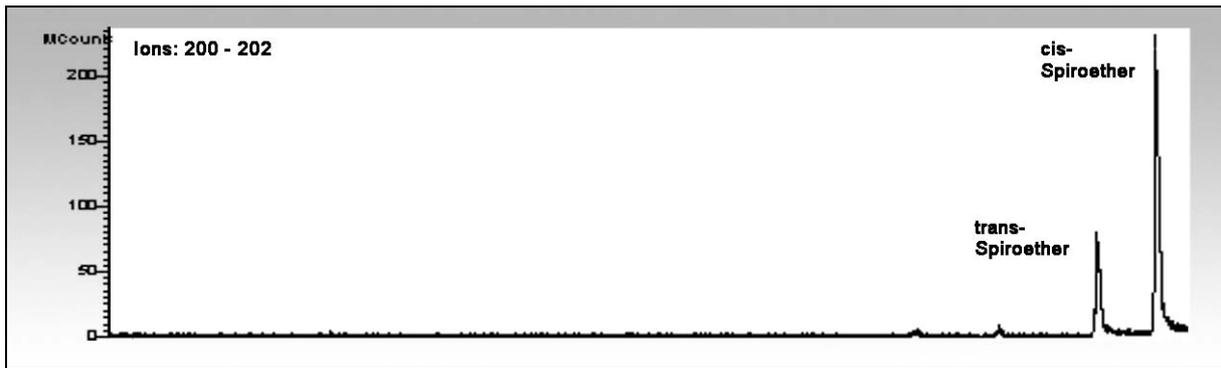


Abb. H-6 ESI(+)-LC-MS Chromatogramm, hier: trans- bzw. cis-Spiroether

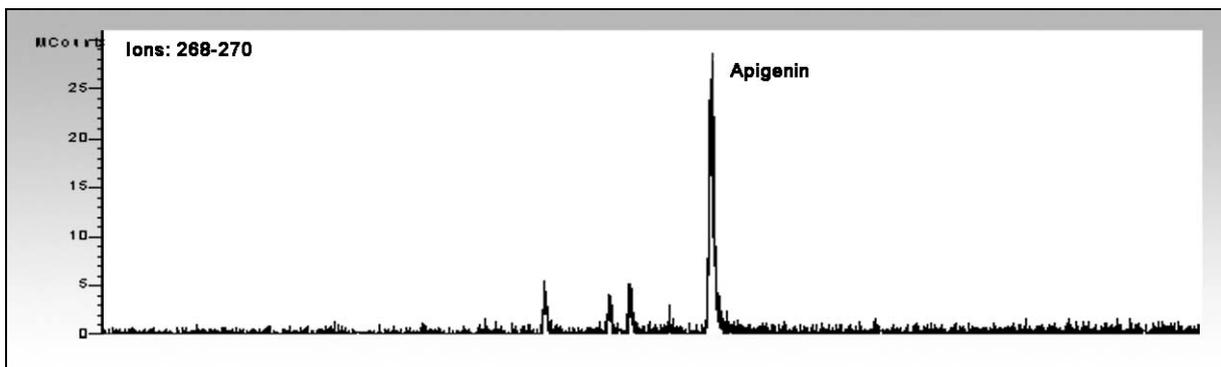


Abb. H-7 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Apigenin

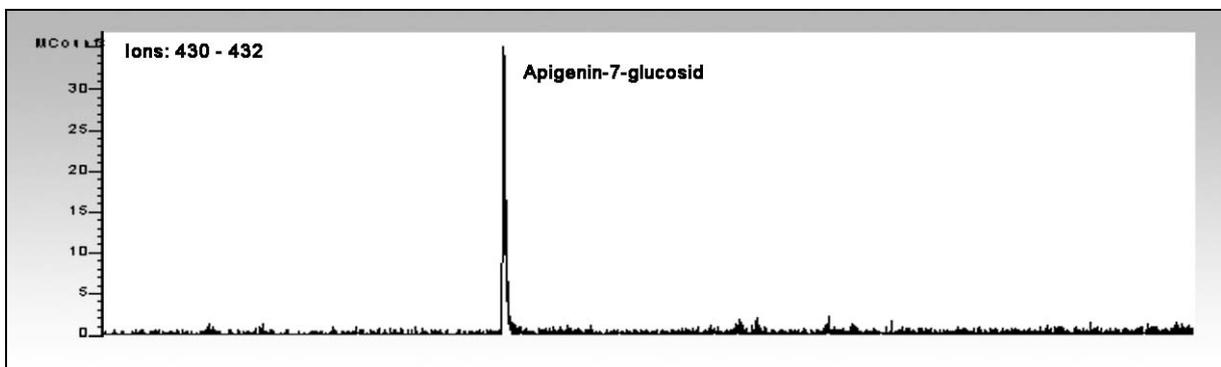


Abb. H-8 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Apigenin-7-glucosid

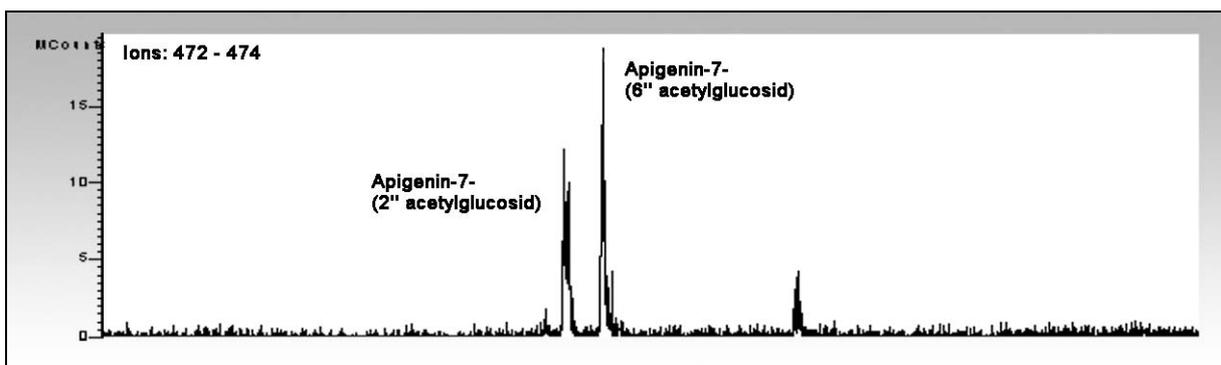


Abb. H-9 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Apigenin-7-acetylglucoside

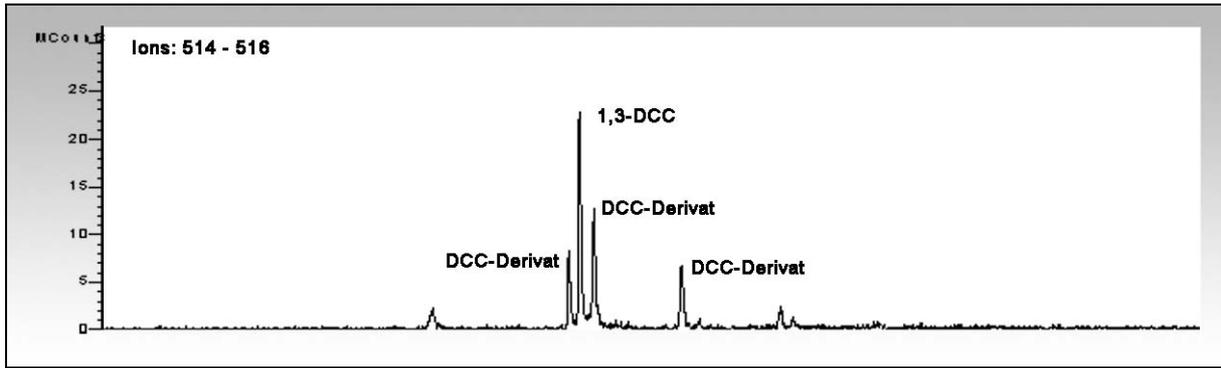


Abb. H-10 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Dicafeoylchinasäure-Derivate (DCC)

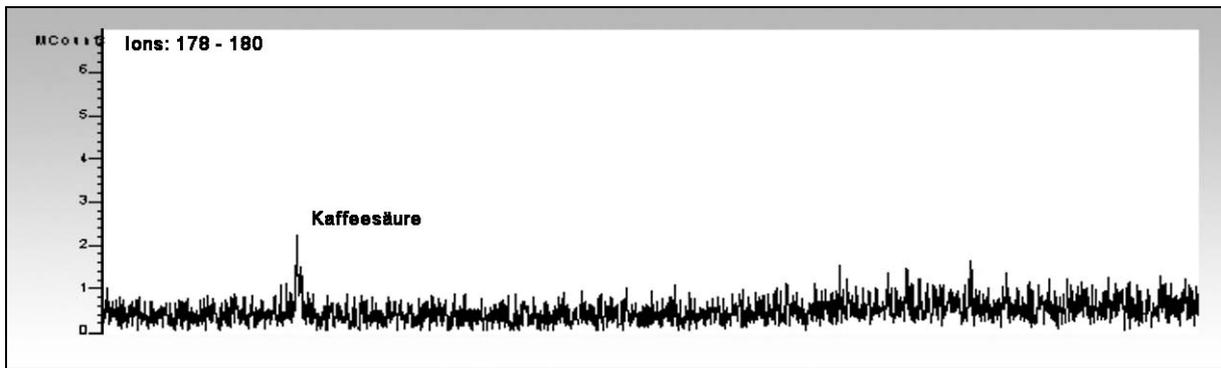


Abb. H-11 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Kaffeesäure

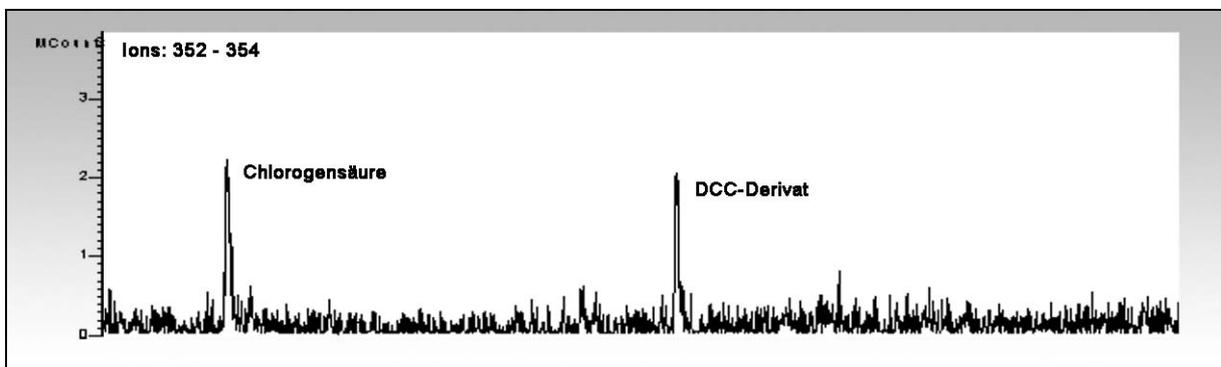


Abb. H-12 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Chlorogensäure und ein DCC-Derivat

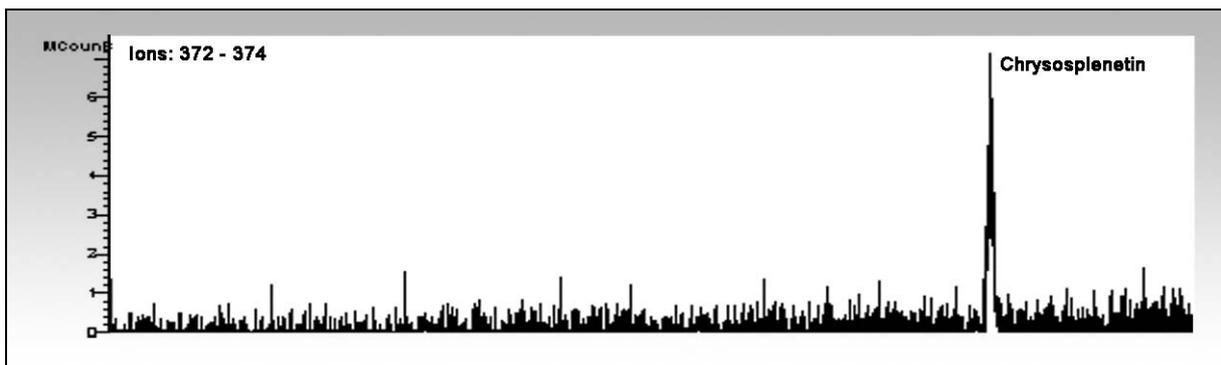


Abb. H-13 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Chrysoptenin

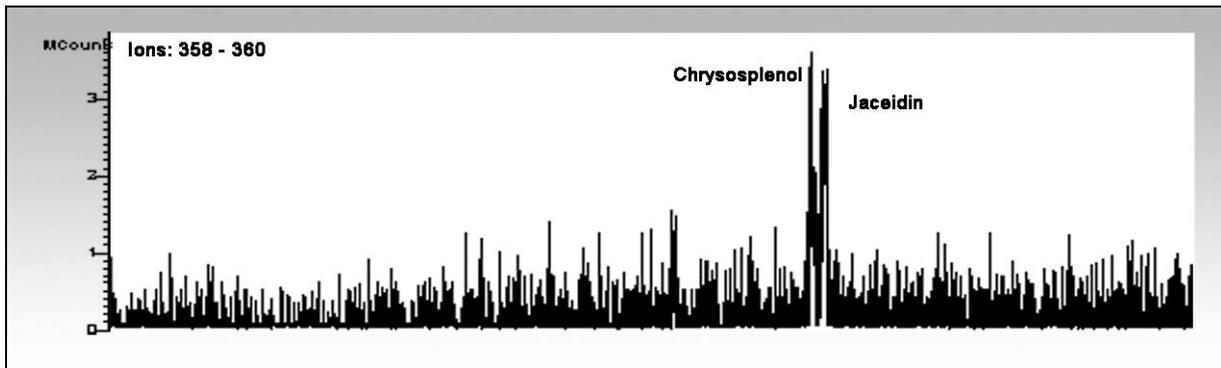


Abb. H-14 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Chrysofenol und Jaceidin

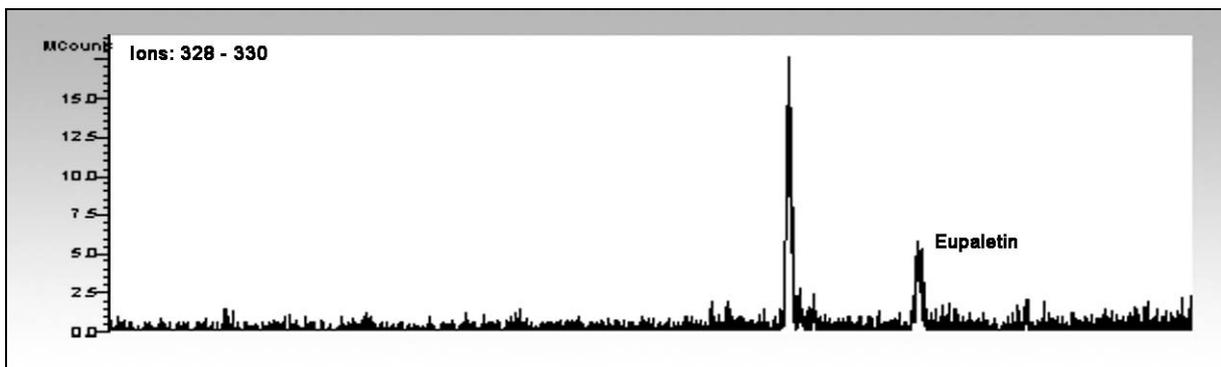


Abb. H-15 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Eupaletin

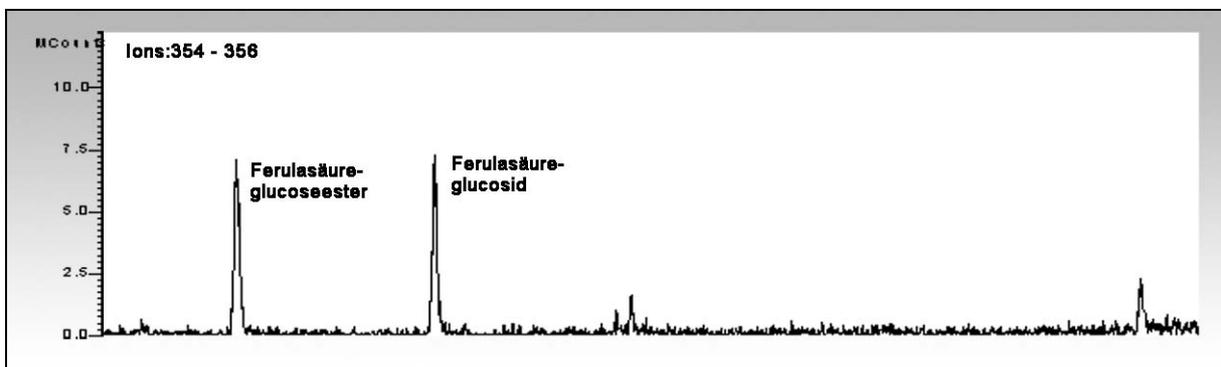


Abb. H-16 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier zwei Ferulasäure-Derivate

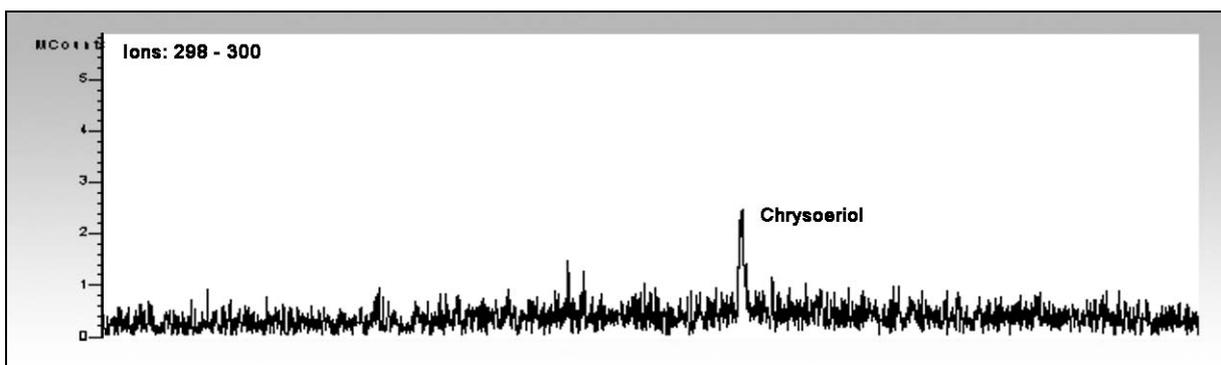


Abb. H-17 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Chrysoeriol

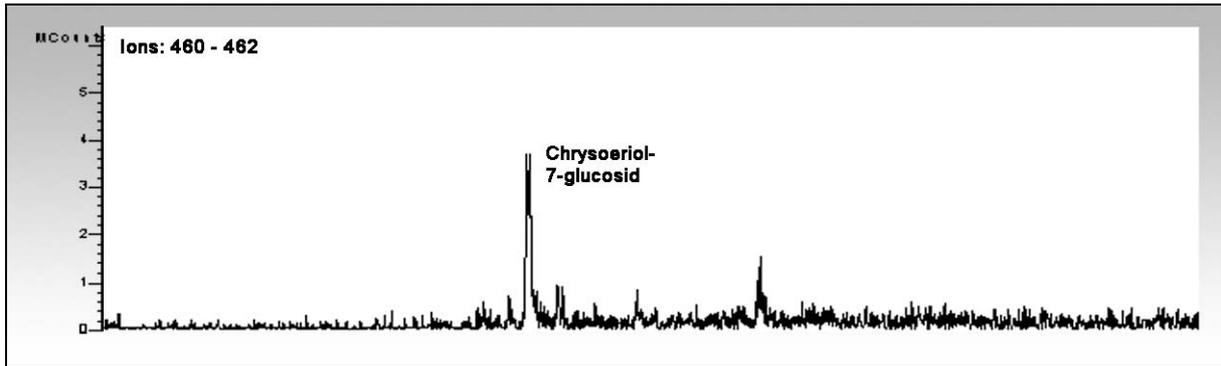


Abb. H-18 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Chrysoeriol-7-glucosid

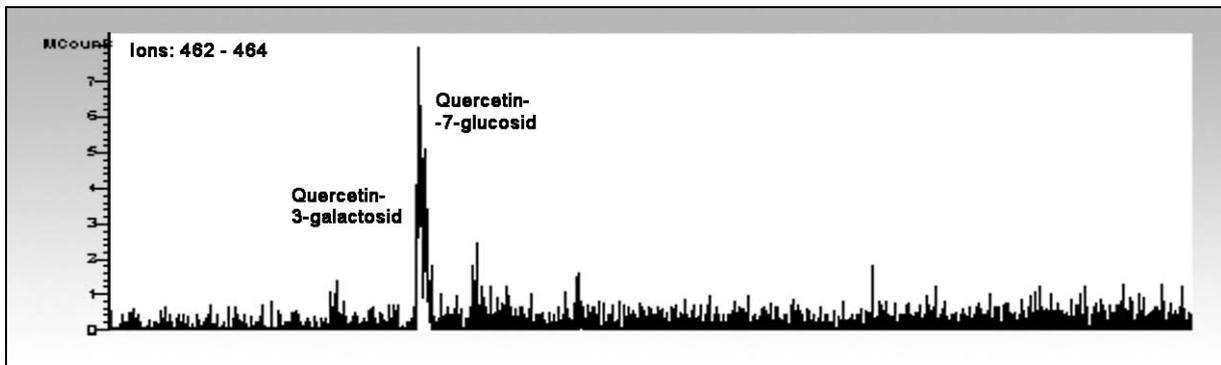


Abb. H-19 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Quercetin-7-glucosid und -7-galactosid

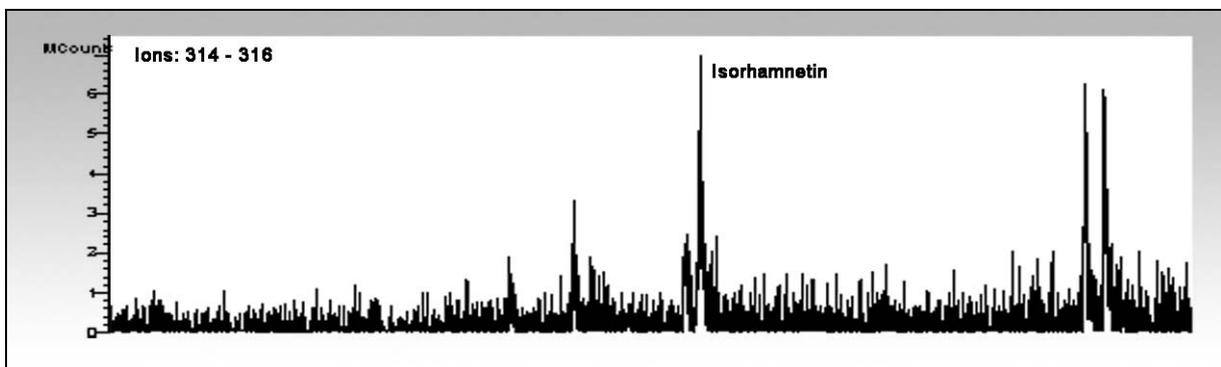


Abb. H-20 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Isorhamnetin

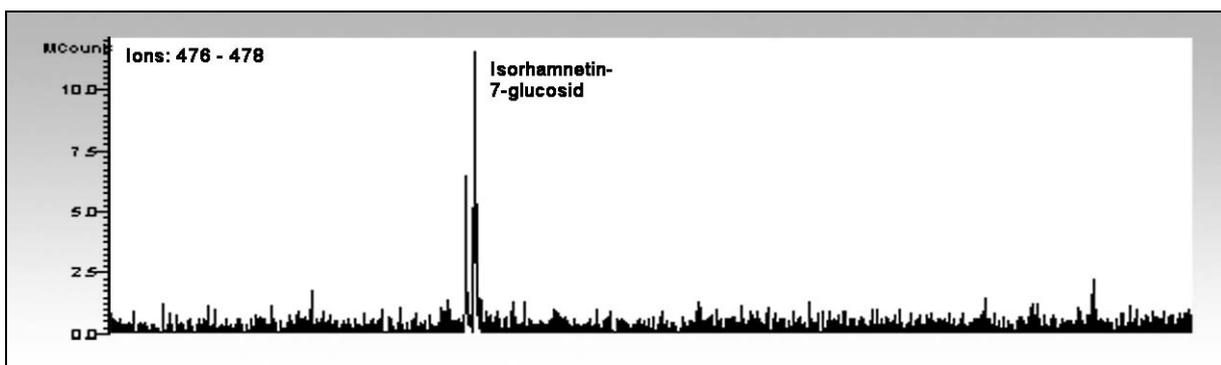


Abb. H-21 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Isorhamnetin-7-glucosid

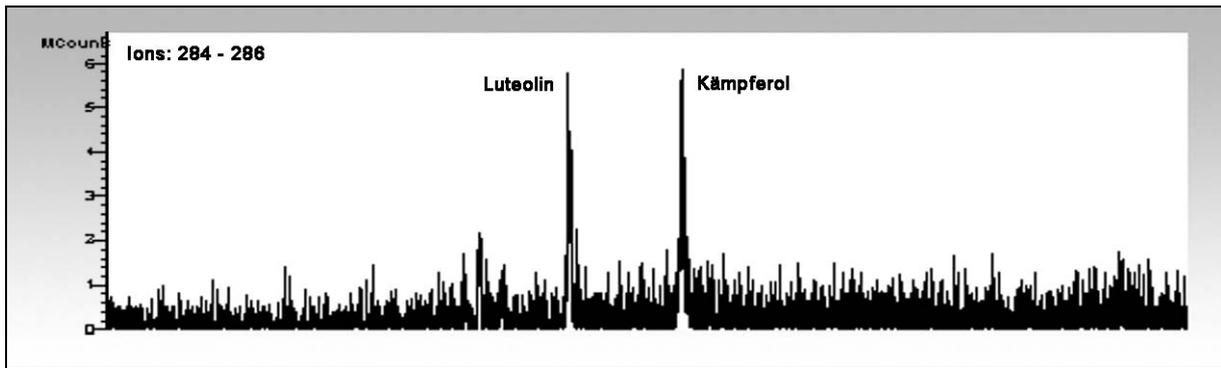


Abb. H-22 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Luteolin und Kämpferol

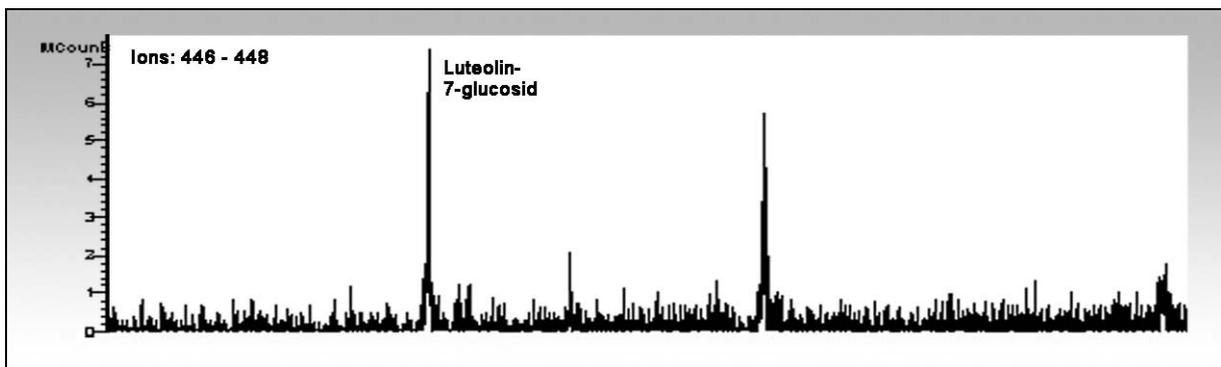


Abb. H-23 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Luteolin-7-glucosid

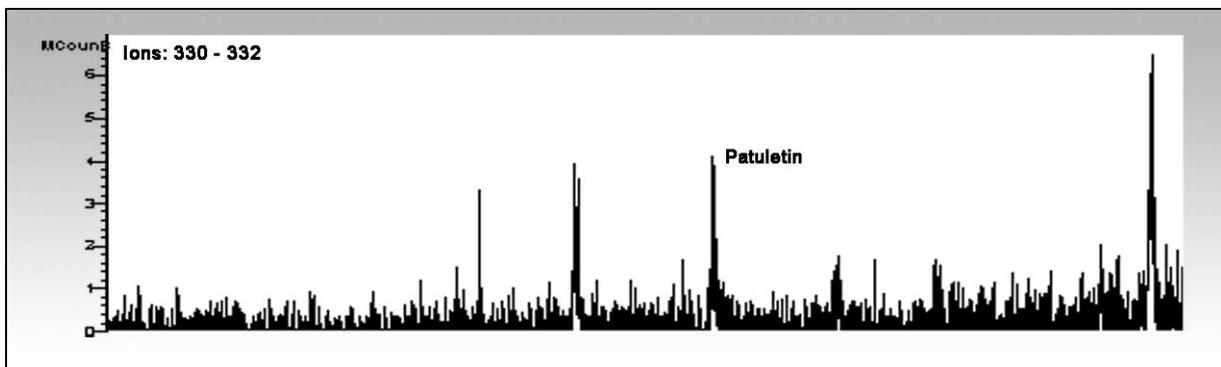


Abb. H-24 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Patuletin

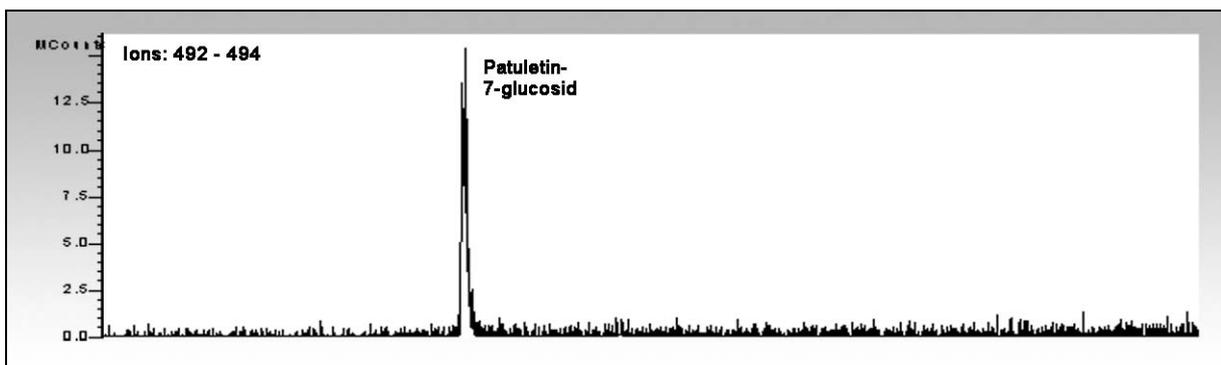


Abb. H-25 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Patuletin-7-glucosid

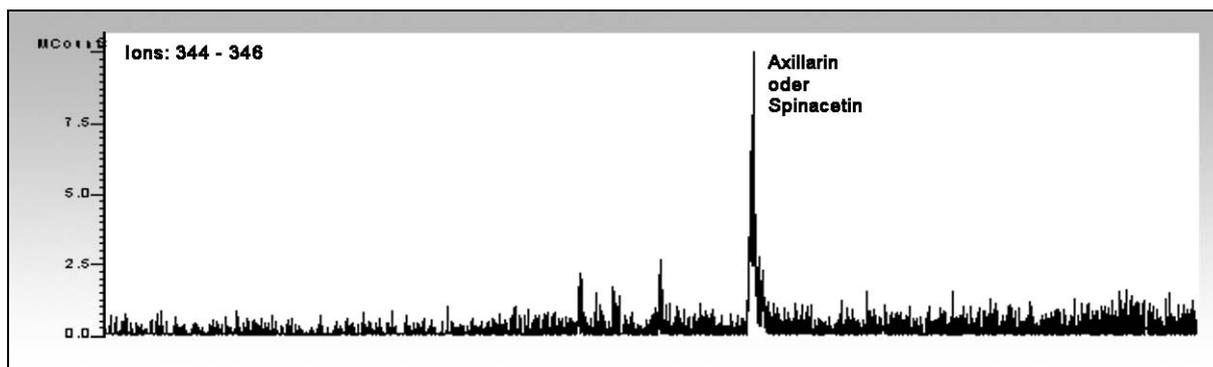


Abb. H-26 ESI(-)-LC-MS Chromatogramm, hier Axillarin oder Spinacetin

Tab. H-11 Ermittelte Peakflächen der phenolischen Komponenten aus Kamillenblüten normiert auf eine Einwaage von 1,0 g Kamillenblüten (n=4)

	Peakfläche [mAU]	Standard-abweichung	rel. Standard-abweichung
Umbelliferon	3.505,0	45,3	1,3%
Apigenin-7-(4"-acetyl)-glucosid	2.963,5	35,4	1,2%
Herniarin	16.305,0	398,1	2,4%
Apigenin	6.971,5	151,3	2,2%
Kämpferol	1.115,5	11,3	1,0%
Chrysoeriol	1.594,3	26,5	1,7%
Isorhamnetin	1.671,3	80,3	4,8%
Chrysosplenol	1.448,3	30,1	2,1%
Jaceidin	1.960,8	7,4	0,4%
Eupalitin	1.523,8	63,3	4,2%
Chrysosplenetin	9.357,3	47,7	0,5%

Tab. H-12 Ermittelte Peakflächen der phenolischen Komponenten des Ölauszugs W 10% normiert auf eine Einwaage von 1,0 g Kamillenblüten (n=4)

	Peakfläche [mAU]	Standard-abweichung	rel. Standard-abweichung
Umbelliferon	1.166,4	10,5	0,9%
Apigenin-7-(4"-acetyl)-glucosid	673,8	14,7	2,2%
Herniarin	6.175,7	176,8	2,9%
Apigenin	769,5	28,6	3,7%
Kämpferol	123,6	1,9	1,5%
Chrysoeriol	582,1	1,3	0,2%
Isorhamnetin	490,4	5,5	1,1%
Chrysosplenol	781,1	9,5	1,2%
Jaceidin	1.305,4	12,3	0,9%
Eupalitin	1.096,2	29,7	2,7%
Chrysosplenetin	6.497,9	26,6	0,4%

Tab. H-13 Ermittelte Peakflächen der phenolischen Komponenten des Ölauszugs H 10% normiert auf eine Einwaage von 1,0 g Kamillenblüten (n=4)

	Peakfläche [mAU]	Standard-abweichung	rel. Standard-abweichung
Umbelliferon	1.776,6	89,8	5,1%
Apigenin-7-(4"-acetyl)-glucosid	1.136,6	51,6	4,5%
Herniarin	10.323,2	51,8	0,5%
Apigenin	1.832,6	33,4	1,8%
Kämpferol	308,5	11,5	3,7%
Chrysoeriol	891,2	4,3	0,5%
Isorhamnetin	751,2	11,2	1,5%
Chrysosplenol	908,6	4,1	0,4%
Jaceidin	1.464,4	4,5	0,3%
Eupalitin	1.327,5	14,5	1,1%
Chrysosplenetin	7.365,3	105,2	1,4%

Tab. H-14 Regressionsgeraden: Stockrosenblüten extrahiert mit Methanol + 25%ige Salzsäure (9+1 VT) zur photometrischen Bestimmung des prozentualen Übergangs der Anthocyane (n=3)

	Konzentration an Droge [mg/L]	Gemittelte Extinktion	rel. Standard-abweichung
Standard 1	17,5	0,030	3,9%
Standard 2	175,0	0,249	0,2%
Standard 3	262,5	0,383	0,2%
Standard 4	350,0	0,507	0,1%
Standard 5	437,5	0,630	0,2%
Standard 6	700,0	1,053	0,1%

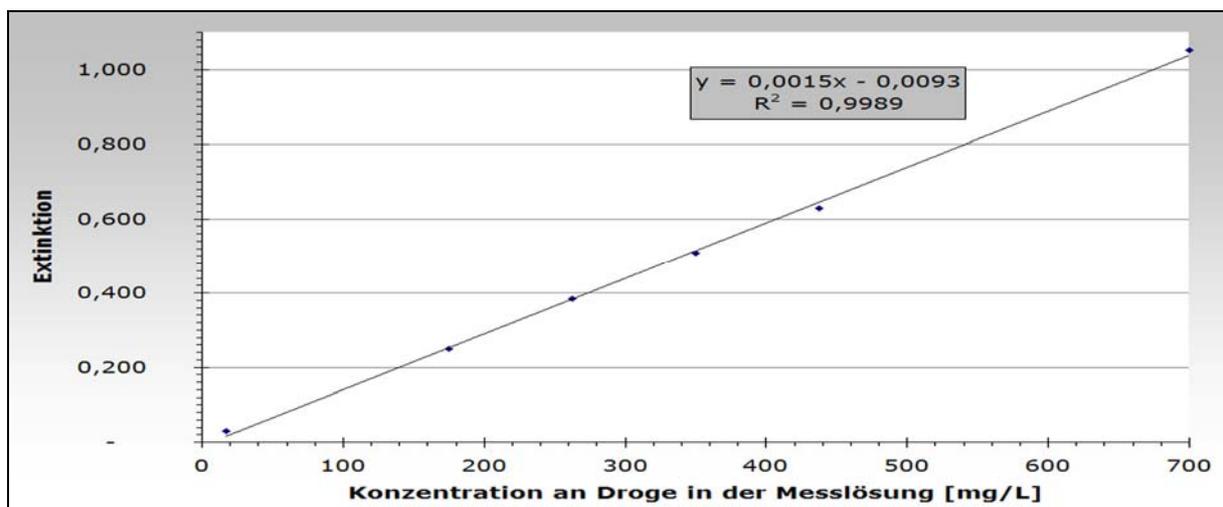


Abb. H-27 Regressionsgerade aus gemessener Absorption gegen die Konzentration an Stockrosenblüten in der Messlösung zur Bestimmung der Übergangsrate der Anthocyane

Tab. H-15 β -Carotin-Kalibriergerade erstellt in Aceton + Hexan (1+1 VT) zur photometrischen Bestimmung des Carotinoidgehaltes in Ringelblumenblüten (n=3)

	Konzentration [mg/L]	Gemittelte Extinktion	rel. Standard- abweichung
Standard 1	0,40	0,093	0%
Standard 2	0,80	0,181	0,32%
Standard 3	1,20	0,277	0,21%
Standard 4	1,60	0,380	0%
Standard 5	2,00	0,481	0%
Standard 6	2,40	0,575	0,27%
Standard 7	2,80	0,670	0,23%
Standard 8	3,20	0,771	0,07%
Standard 9	3,60	0,867	0,47%
Standard 10	4,00	0,961	0,26%

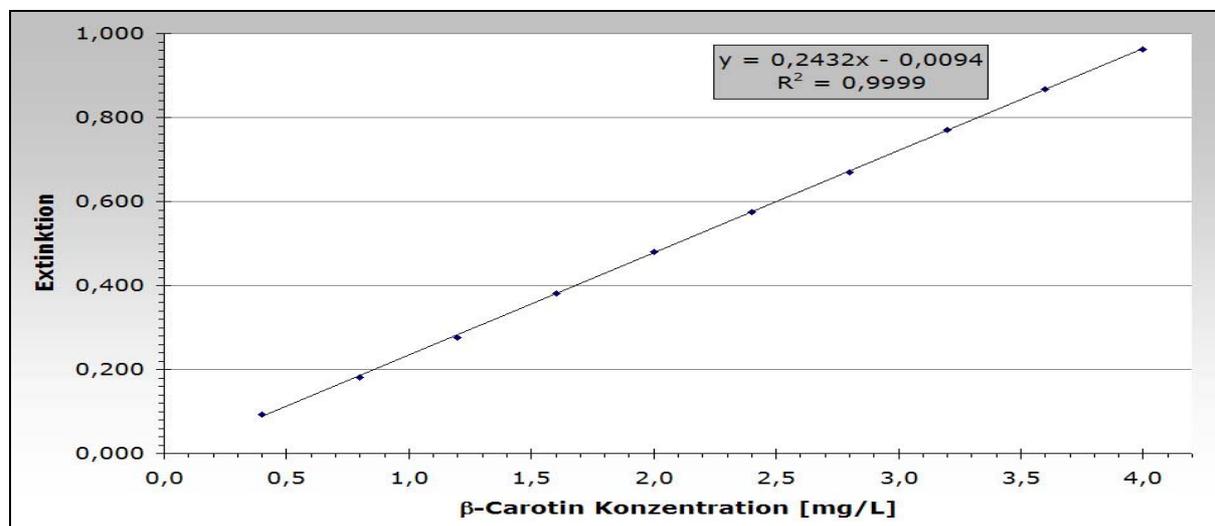


Abb. H-28 β -Carotin-Kalibriergerade erstellt in Aceton + Hexan (1+1 VT) zur photometrischen Bestimmung des Carotinoidgehaltes in Ringelblumenblüten

Tab. H-16 Gesamt-Carotinoidgehalt der Ringelblumenblüten nach Isolierung mit verschiedenen Lösungsmitteln (n=3)

Lösungsmittel	Carotinoid- gehalt [mg/g]	Standard abweichung [mg/g]	rel. Standard- abweichung
TBME	0,752	0,001	0,1%
TBME	0,731	0,001	0,1%
TBME	0,754	0,001	0,1%
Hexan+Aceton (1+1 VT)	0,836	0,003	0,3%
Hexan+Aceton (1+1 VT)	0,799	0,003	0,4%
Hexan+Aceton (1+1 VT)	0,793	0,005	0,6%
Ethanol	0,749	-	0,0%
Ethanol	0,763	0,001	0,1%
Ethanol	0,785	0,001	0,1%
Ethylacetat/Methanol/Petrolether (1/1/1 VT)	0,834	0,001	0,1%
Ethylacetat/Methanol/Petrolether (1/1/1 VT)	0,818	0,004	0,4%
Ethylacetat/Methanol/Petrolether (1/1/1 VT)	0,833	0,001	0,1%

Tab. H-17 β -Carotin-Kalibriergerade erstellt in Aceton + Hexan (1+1 VT) und Olivenöl (20 g/L) zur photometrischen Bestimmung des Carotinoidgehaltes in Ölauszügen (n=3)

	Konzentration [mg/L]	Gemittelte Extinktion	rel. Standard- abweichung
Standard 1	0,40	0,083	2,50%
Standard 2	0,80	0,166	1,25%
Standard 3	1,20	0,243	1,32%
Standard 4	1,60	0,322	0,31%
Standard 5	2,00	0,419	0,72%
Standard 6	2,40	0,478	0,67%
Standard 7	2,80	0,554	0,36%
Standard 8	3,20	0,626	0,09%
Standard 9	3,60	0,711	0,29%
Standard 10	4,00	0,803	0,14%

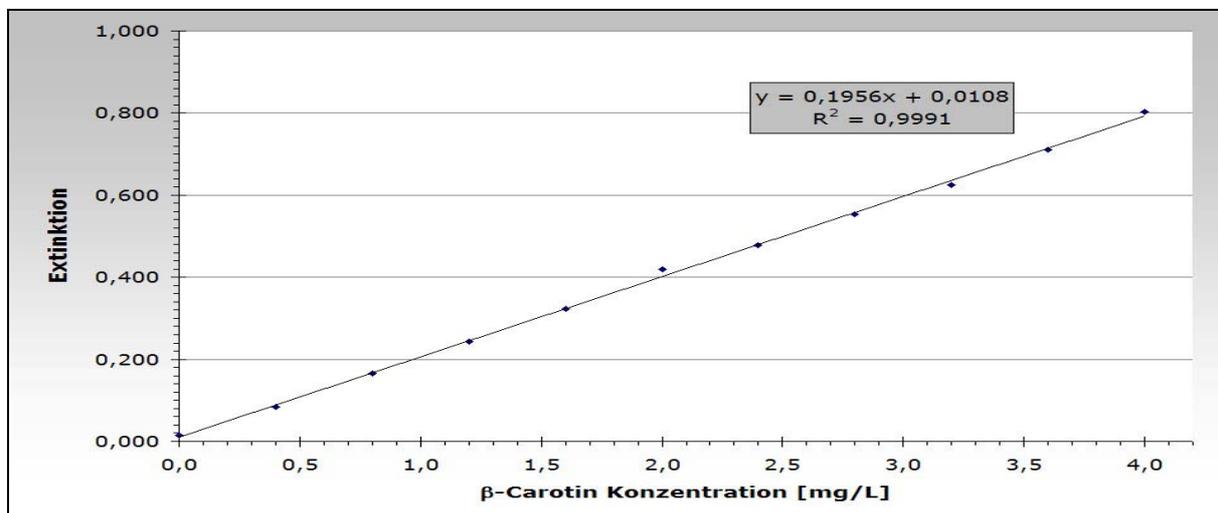


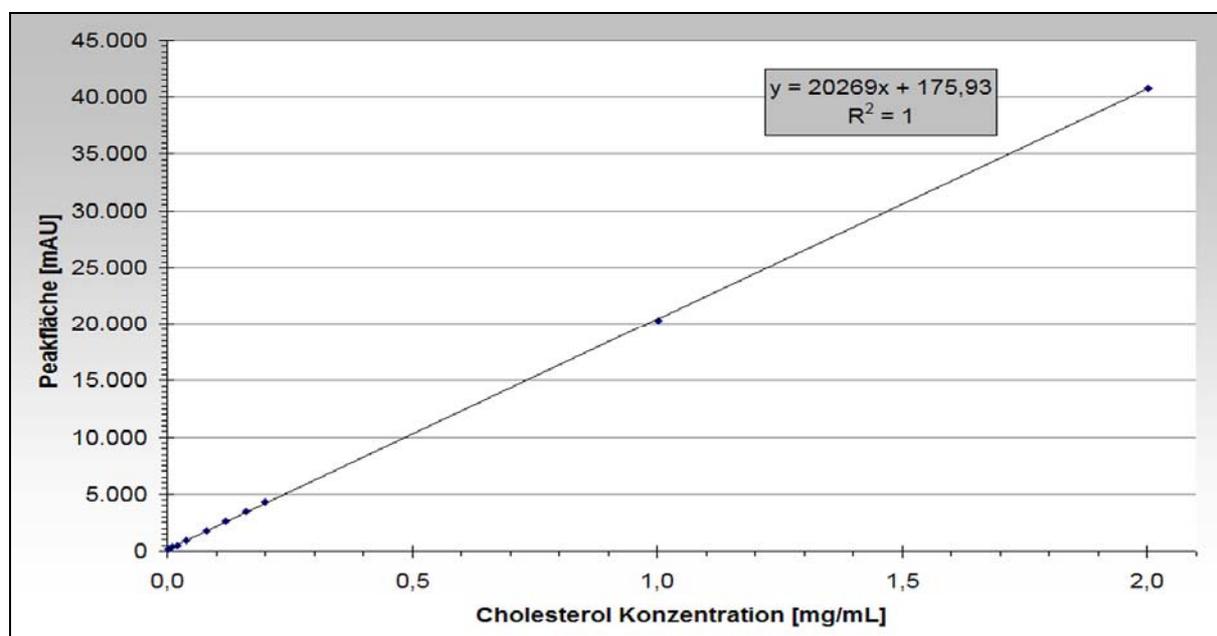
Abb. H-29 β -Carotin-Kalibriergerade erstellt in Aceton + Hexan (1+1 VT) und Olivenöl zur photometrischen Bestimmung des Carotinoidgehaltes in den Ölauszügen

Tab. H-18 Berechnete Konzentrationen der eingesetzten Sterol- und Triterpenalkohol-Standards zur Bestimmung der Wiederfindungsrate (in mg/mL)

	Cholesterol	Cholestanol	Betulin
Standard 1	0,002	2,000	2,010
Standard 2	0,010	2,000	2,010
Standard 3	0,020	2,000	2,010
Standard 4	0,040	2,000	2,010
Standard 5	0,080	2,000	2,010
Standard 6	0,120	2,000	2,010
Standard 7	0,160	2,000	2,010
Standard 8	0,200	2,000	2,010
Standard 9	1,001	2,000	2,010
Standard 10	2,002	2,000	2,010

Tab. H-19 Ermittelte Peakflächen aus den eingesetzten Sterol- und Triterpenalkohol-Standards zur Bestimmung der Wiederfindungsrate (in mAU) [n = 2]

	Cholesterol	Cholestanol	Betulin
Standard 1	195,08	39.230,50	44.928,60
Standard 2	341,85	38.751,80	42.422,90
Standard 3	516,03	39.534,40	44.144,70
Standard 4	976,71	39.589,95	45.119,90
Standard 5	1808,13	40.150,45	45.321,30
Standard 6	2642,04	40.669,05	45.911,65
Standard 7	3505,10	41.299,15	46.007,55
Standard 8	4339,68	39.482,15	45.109,50
Standard 9	20313,96	41.683,75	45.232,75
Standard 10	40812,47	40.043,47	44.910,98


Abb. H-30 Cholesterol-Kalibriergerade
Tab. H-20 Ermittelte Konzentrationen der verwendeten Standardlösungen für die Wiederfindungsversuche der Sterole und Triterpenalkohole (n=6)

	ermittelte Konzentration [mg/L]	Standardabweichung [mg/L]	rel. Standardabweichung
Cholesterol	86,12	1,95	2,3%
Cholestanol	84,91	1,75	2,1%
Betulin	91,47	1,28	1,4%

Tab. H-21 Ermittelte Konzentration nach Dotierung des Olivenöls mit den Sterol- und Triterpenalkohol-Standards (n=6)

	ermittelte Konzentration [mg/L]	Standardabweichung [mg/L]	rel. Standardabweichung	Gemittelte Wiederfindung* [%]
Cholesterol	83,42	2,17	2,6%	96,9 ± 4,8%
Cholestanol	80,77	2,35	2,9%	95,1 ± 4,8%
Betulin	90,99	2,84	3,1%	99,5 ± 4,5%

Berechnet anhand der Standardkonzentrationen nach Tab. H-20

Tab. H-22 Ermittelte Sterol- und Triterpenalkohol-Konzentrationen des Olivenöls (n=4)

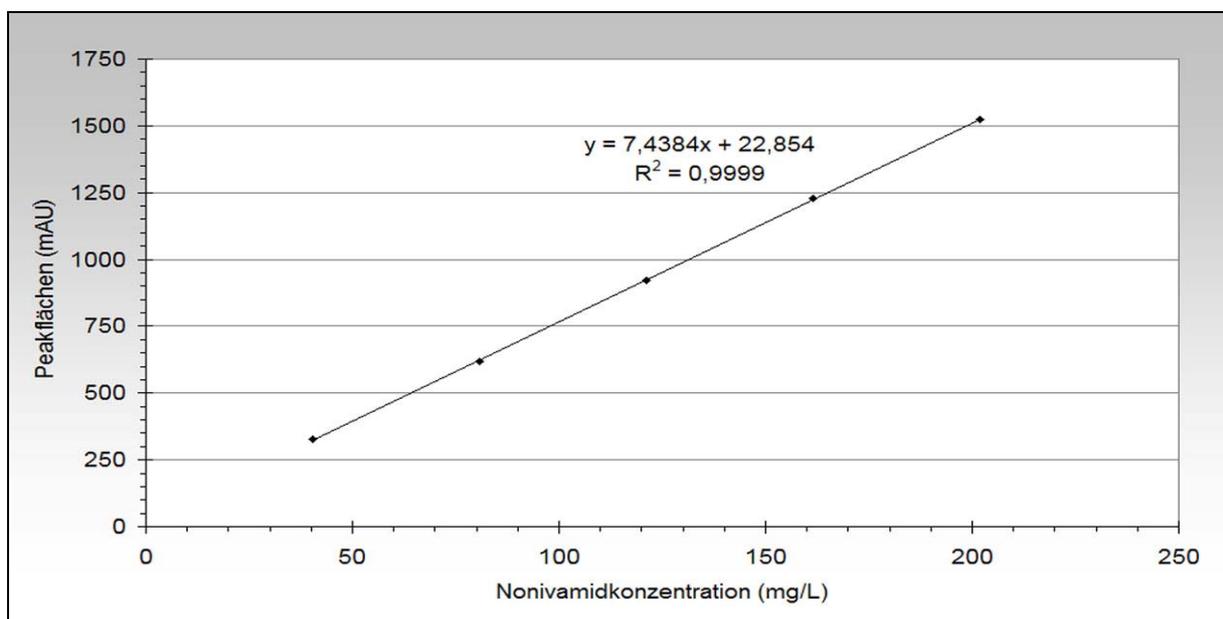
	ermittelte Kon- zentration [mg/kg]	Standardab- weichung [mg/kg]	rel. Standard- abweichung
Cholestanol	5,4	0,1	1,4%
Campesterol	48,3	0,8	1,6%
Campestanol	2,9	0,1	4,2%
Stigmasterol	15,0	0,4	2,9%
Δ 7-Campesterol	3,3	0,1	3,2%
Δ 5, 23-Stigmastadienol	22,6	0,5	2,4%
Clerosterol	15,4	0,6	3,9%
β -Sitosterol	992,1	27,9	2,8%
Sitostanol	106,5	3,0	2,8%
β -Amyrin	27,3	1,2	4,4%
Δ 5-Avenasterol	33,2	0,6	1,7%
α -Amyrin	103,3	2,5	2,4%
Δ 7-Stigmasterol	87,4	2,8	3,2%
Δ 7-Avenasterol	18,3	0,9	4,7%
Ursadiol	43,7	1,4	3,2%
Erythrodiol	180,2	6,7	3,7%
Uvaol	105,6	1,9	1,8%
Maniladiol	37,8	0,9	2,3%
Brein	101,8	2,8	2,7%
Summe	1.950,2	54,9	2,8%

Tab. H-23 Ermittelte Sterol- und Triterpenalkohol-Konzentrationen der Ringelblumenblüten (n=6)

	ermittelte Kon- zentration [mg/kg]	Standardab- weichung [mg/kg]	rel. Standard- abweichung
Campesterol	36,6	1,8	4,8%
Stigmasterol	693,0	40,8	5,9%
β -Sitosterol	354,9	17,4	4,9%
Sitostanol	726,6	37,8	5,2%
β -Amyrin	1.821,8	85,1	4,7%
Lupeol	1.420,3	70,7	5,0%
α -Amyrin	1.598,5	71,5	4,5%
Ursadiol	1.361,8	39,4	2,9%
ψ -Taraxasterol	5.999,5	227,4	3,8%
Taraxasterol	717,9	26,3	3,7%
Maniladiol	45,8	2,4	5,3%
Brein	2.041,4	40,9	2,0%
Calendualdiol	1.230,2	47,6	3,9%
Faradiol	29.417,2	1.585,0	5,4%
Arnidiol	247,8	8,2	3,3%
Longispinogenin	150,7	3,1	2,1%
Ursatriol	159,5	3,4	2,1%
Heliantriol B2	61,3	3,3	5,4%
Heliantriol C	298,7	18,1	6,1%
Heliantriol F	187,0	10,3	5,5%
Summe	48.570,6	2.340,4	4,8%

Tab. H-24 Nonivamid-Kalibriergerade zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Capsaicinoid-Untersuchung

	Volumen Stamm- lösung [mL]	Endvolumen der Messlösung [mL]	Konz. Nonivamid i.d. Messlösung [mg/L]	Peakfläche (mAU)
Standard 1	2,0	10,0	40,4	328,4
Standard 2	4,0	10,0	80,8	618,1
Standard 3	6,0	10,0	121,2	920,2
Standard 4	8,0	10,0	161,6	1.230,4
Standard 5	10,0	10,0	202,0	1.524,8

**Abb. H-31 Nonivamid-Kalibriergerade****Tab. H-25 Konzentration der einzelnen Capsaicinoide in der Verdünnungslösung des „Capsaicin-Standards“ zur Erstellung der Kalibriergeraden [mg/L]**

	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6	STD 7	STD 8
Nordihydrocapsaicin	1,3	2,6	5,2	7,8	10,3	12,9	19,4	25,9
Capsaicin	38,5	77,0	153,9	230,9	307,9	384,8	577,3	769,7
Dihydrocapsaicin	10,1	20,3	40,6	60,9	81,1	101,4	152,1	202,8
Homocapsaicin I	0,3	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0	4,5	6,0
Homocapsaicin II	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,1	1,6	2,1
Homodihydrocapsaicin I	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4	0,7	0,9
Homodihydrocapsaicin II	0,2	0,3	0,7	1,0	1,3	1,7	2,5	3,3

Tab. H-26 Ermittelte Peakflächen der untersuchten Standardverdünnungen zur Erstellung der Kalibriergeraden [mAU]

	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6	STD 7	STD 8
Nordihydrocapsaicin	9,0	18,0	34,4	51,8	70,9	89,4	135,6	179,7
Capsaicin	269,1	532,6	1.027	1.552	2.101	2.643	3.973	5.298
Dihydrocapsaicin	70,3	139,6	270,3	408,4	552,9	697,5	1.049,	1.401
Homocapsaicin I	1,1	3,4	7,8	12,4	16,6	21,0	30,9	41,6
Homocapsaicin II	-	1,3	2,8	4,3	5,6	7,0	10,4	14,1
Homodihydrocapsaicin I	-	-	1,2	1,9	2,4	3,1	4,6	6,1
Homodihydrocapsaicin II	1,5	2,4	4,4	6,4	8,7	10,8	16,2	21,5

Tab. H-27 Ermittelte Capsaicinoid-Kalibriergeraden

Nordihydrocapsaicin	$y = 6,99 x - 0,99$	(R ² : 0,9999)
Capsaicin	$y = 6,90 x - 15,70$	(R ² : 1,0000)
Dihydrocapsaicin	$y = 6,92 x - 5,73$	(R ² : 0,9999)
Homocapsaicin I	$y = 7,02 x - 0,67$	(R ² : 0,9998)
Homocapsaicin II	$y = 6,69 x - 0,06$	(R ² : 0,9998)
Homodihydrocapsaicin I	$y = 6,79 x + 0,03$	(R ² : 0,9998)
Homodihydrocapsaicin II	$y = 6,37 x + 0,25$	(R ² : 0,9998)

Tab. H-28 Capsaicinoid-Konzentrationen der Cayennepfefferfrüchte [mg/kg]

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Nordihydrocapsaicin	55,4	54,8	54,6	54,2	55,8	55,5
Capsaicin	341,7	341,9	342,1	341,2	347,0	346,3
Dihydrocapsaicin	184,1	184,8	188,2	189,0	187,9	188,8
Homocapsaicin I	9,6	9,6	9,5	9,8	10,0	10,1
Homocapsaicin II	9,9	9,9	10,5	10,7	10,0	10,0
Homodihydrocapsaicin I	3,3	3,0	-	3,3	3,4	3,1
Homodihydrocapsaicin II	20,9	20,4	21,4	21,9	22,5	21,5
Summe	624,7	624,5	626,2	630,0	636,6	635,4

Tab. H-29 Capsaicinoid-Konzentrationen des Ölauszuges W 10% [mg/kg]

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Nordihydrocapsaicin	3,8	3,8	3,7	3,8
Capsaicin	23,8	23,8	23,5	23,6
Dihydrocapsaicin	13,0	13,1	12,8	12,8
Homocapsaicin I	0,6	0,5	0,6	0,6
Homocapsaicin II	0,5	0,5	0,5	0,5
Homodihydrocapsaicin I	0,2	0,2	0,2	0,2
Homodihydrocapsaicin II	1,3	1,3	1,3	1,3
Summe	43,0	43,2	42,6	42,7

Tab. H-30 Capsaicinoid-Konzentrationen des Ölauszuges H 10% [mg/kg]

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Nordihydrocapsaicin	4,6	4,6	4,9	4,9
Capsaicin	28,7	28,6	30,4	30,2
Dihydrocapsaicin	15,0	14,9	15,8	16,1
Homocapsaicin I	0,8	0,8	0,8	0,8
Homocapsaicin II	0,7	0,7	0,8	0,7
Homodihydrocapsaicin I	0,2	0,2	0,2	0,2
Homodihydrocapsaicin II	1,7	1,7	1,7	1,8
Summe	51,7	51,5	54,6	54,7

Tab. H-31 Ermittelte Werte zur Erstellung der Berberin-Kalibriergeraden (n=3)

	Berberin-Konzentration [mg/L]	Gemittelte Peakfläche [mAU]	rel. Standardabweichung
Standard Nr 1	17,9	866,5	1,2%
Standard Nr 2	14,3	704,2	0,7%
Standard Nr 3	9,0	438,8	0,9%
Standard Nr 4	7,2	339,3	1,8%
Standard Nr 5	5,4	267,0	1,8%
Standard Nr 6	3,6	164,1	0,1%
Standard Nr 7	1,8	90,3	1,6%
Standard Nr 8	0,9	45,3	3,5%
Standard Nr 9	0,4	18,4	5,2%

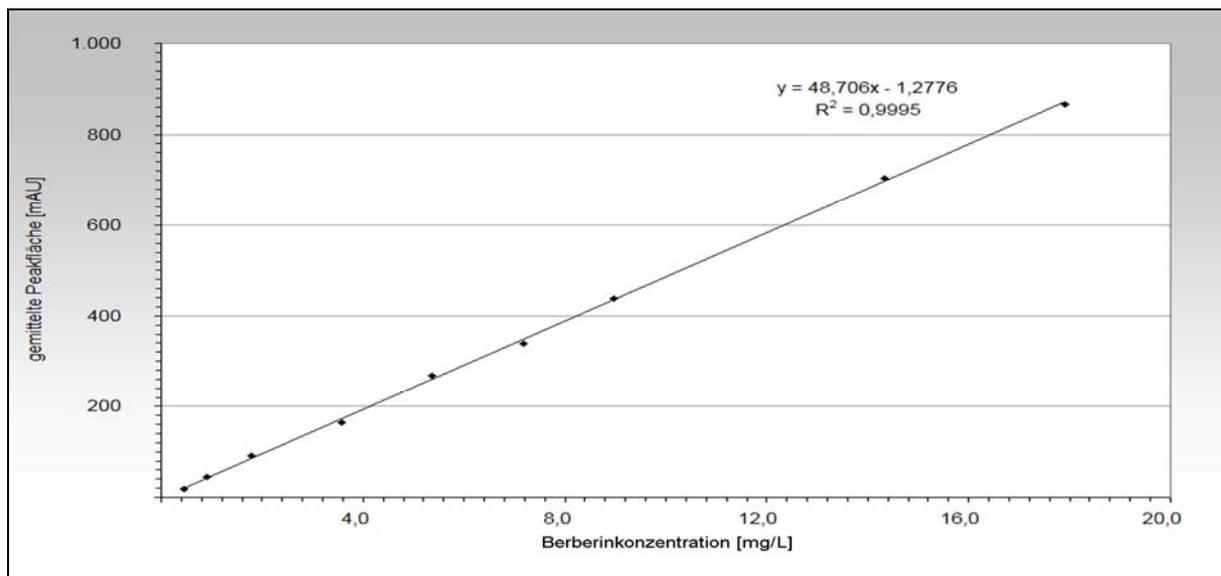


Abb. H-32 Kalibriergerade Berberin

Tab. H-32 Wiederfindungsversuche mit dem Isochinolinalkaloid Berberin aus Olivenöl

	Berberin-Konzentration im Öl [mg/g]	Einwaage Öl [g]	Fläche des Berberin-Peaks [mAU]	Volumen Untersuchungslösung [mL]	ermittelte Konzentration [mg/g]	Wiederfindung
Probe 1	0,671	1,999	313,8	10	0,647	96,5%
Probe 2	0,671	1,999	315,5	10	0,651	97,0%
Probe 3	0,671	1,550	252,0	10	0,671	100,0%
Probe 4	0,671	1,550	240,6	10	0,641	95,5%
Probe 5	0,189	1,993	342,9	5	0,177	93,8%
Probe 6	0,189	1,993	359,2	5	0,186	98,2%
Probe 7	0,189	2,005	353,1	5	0,181	96,0%
Probe 8	0,189	2,005	345,9	5	0,178	94,0%
Probe 9	0,177	1,790	299,5	5	0,172	97,4%
Probe 10	0,177	1,790	300,7	5	0,173	97,8%
Probe 11	0,177	2,012	333,5	5	0,171	96,4%
Probe 12	0,177	1,999	334,0	5	0,172	97,2%

Tab. H-33 Ermittelte Alkaloid-Peakflächen aus Berberitzenwurzelrinde nach Einwaage und Extraktion mit den entsprechenden Lösungsmitteln in 10 mL Untersuchungslösung

	Einwaage [g]	Fläche Jatrorrhizin [mAU]	Fläche Palmatin [mAU]	Fläche Berberin [mAU]
Methanol (100%)	0,2009	617,0	228,9	1.818,4
Methanol (100%)	0,2009	636,6	237,1	1.909,2
Methanol (75%)	0,2010	562,3	255,3	1.590,5
Methanol (75%)	0,2010	556,8	255,2	1.560,2
Methanol (50%)	0,2001	493,1	206,4	1.329,0
Methanol (50%)	0,2001	495,2	206,2	1.323,4
Methanol (25%)	0,1999	418,2	173,1	1.095,6
Methanol (25%)	0,1999	410,5	171,2	1.069,1
Wasser	0,2014	233,4	100,6	736,1
Wasser	0,2014	228,2	96,2	709,7
Methanol (50%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,2000	627,5	263,8	1.932,6
Methanol (50%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,2000	633,9	264,1	1.958,7
Methanol (50%) + Ammoniak [100+1 VT]	0,2001	617,1	170,4	939,7
Methanol (50%) + Ammoniak [100+1 VT]	0,2001	619,5	170,3	939,3
Ethanol (75%)	0,2001	558,1	220,3	1.622,8
Ethanol (75%)	0,2001	559,9	220,0	1.612,6
Ethanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,2001	558,1	220,3	1.622,8
Ethanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,2001	559,9	220,0	1.612,6
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,2144	439,1	175,9	1.251,7
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,2144	437,6	176,9	1.249,2
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,1890	371,8	166,6	1.038,4
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,1890	369,0	163,8	1.009,1
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,2166	414,5	181,4	1.144,7
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,2166	421,2	183,0	1.152,4
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,2086	430,2	168,7	1.180,9
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	0,2086	424,1	165,3	1.137,3

Tab. H-34 Berechnete Alkaloid-Gehalte der Berberitzenwurzelrinde je nach Extraktionsmittel

	Jatrorrhizin-Gehalt ¹ [mg/g]	Palmatin-Gehalt ¹ [mg/g]	Berberin-Gehalt [mg/g]
Methanol (100%)	3,08	0,65	10,63
Methanol (100%)	3,21	0,70	11,20
Methanol (75%)	2,7	0,8	9,2
Methanol (75%)	2,7	0,8	9,0
Methanol (50%)	2,3	0,5	7,6
Methanol (50%)	2,3	0,5	7,5
Methanol (25%)	1,8	0,3	6,1
Methanol (25%)	1,8	0,3	6,0
Wasser	0,7	- ²	3,8
Wasser	0,6	- ²	3,7
Methanol (50%) + Ameisensäure [100+1 VT]	3,2	0,9	11,4
Methanol (50%) + Ameisensäure [100+1 VT]	3,2	0,9	11,6
Methanol (50%) + Ammoniak [100+1 VT]	3,1	0,3	5,1
Methanol (50%) + Ammoniak [100+1 VT]	3,1	0,3	5,1
Ethanol (75%)	2,7	0,6	9,4
Ethanol (75%)	2,7	0,6	9,4
Ethanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	3,0	0,8	10,7
Ethanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	3,0	0,8	10,7
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	4,2	1,7	12,0
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	4,2	1,7	12,0
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	4,1	1,8	11,3
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	4,0	1,8	11,0
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	3,9	1,7	10,9
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	4,0	1,7	10,9
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	4,2	1,7	11,6
Methanol (75%) + Ameisensäure [100+1 VT]	4,2	1,6	11,2

¹ Berechnet anhand der Berberin-Kalibriergeraden nach Tab. H-31

² Wert unterhalb der Bestimmungsgrenze der Kalibriergeraden

Tab. H-35 Ermittelte Gehalte der ätherischen Öle in den Pressrückständen [mL/kg Droge]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Ölauszug 20°C	2,05	2,02	1,35 ¹	1,82	0,175	1,35	1,32
Ölauszug 35°C	1,85	1,65	1,42	1,35	0,95	0,95	0,91
Ölauszug 50°C	1,62	1,52	1,35	1,35	1,05	0,85	0,85
Ölauszug 65°C	2,02	1,65	1,25	0,65	0,62	- ²	0,65
Ölauszug 20°C Rühren	2,02	1,62	1,39	1,35	1,27	0,85	0,65
Ölauszug 35°C +EtOH	- ²	1,25	1,12	0,75	0,65	0,65	0,55

¹ Ausreißer ² kein Messwert

Tab. H-36 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls der Kamillenblüten

Farnesen	12,4 %
Spathulenol	1,7 %
Bisabololoxid B	0,8 %
Bisabolonoxid A	6,7 %
Bisabolol	7,6 %
Chamazulen	1,8 %
Bisabololoxid A	49,7 %
Spiroether	8,0 %

Tab. H-37 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Pressrückständen, extrahiert bei 20°C [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	24,47	24,12	24,98	22,75	23,53	25,96	24,38
Spathulenol	3,23	3,69	3,72	3,46	3,61	3,93	4,04
Bisabololoxid B	0,99	1,03	1,03	1,20	1,05	1,03	1,08
Bisabolonoxid A	8,44	8,68	8,56	9,19	8,48	8,52	8,26
Bisabolol	9,61	9,90	9,57	10,63	9,86	9,58	9,60
Chamazulen	1,53	1,59	1,61	1,58	1,74	2,04	2,07
Bisabololoxid A	38,19	37,43	34,31	37,00	37,00	33,64	32,31
Spiroether	8,99	9,70	9,57	9,63	10,19	9,39	9,58

Tab. H-38 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Pressrückständen, extrahiert bei 35°C [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	28,22	25,59	26,59	28,23	27,43	27,51	29,77
Spathulenol	3,58	3,24	3,54	3,78	3,74	4,06	4,32
Bisabololoxid B	0,99	1,00	1,04	1,06	1,06	1,07	1,10
Bisabolonoxid A	7,72	7,96	8,01	7,80	7,78	7,57	7,51
Bisabolol	8,96	9,29	9,41	9,23	9,01	8,70	8,86
Chamazulen	1,93	1,87	1,95	2,15	2,16	2,49	2,69
Bisabololoxid A	30,00	32,92	30,50	30,11	27,56	26,30	23,55
Spiroether	10,51	9,42	9,23	10,43	8,82	10,58	9,10

Tab. H-39 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Pressrückständen, extrahiert bei 50°C [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	26,74	25,22	25,65	23,84	22,58	26,30	28,28
Spathulenol	3,73	3,63	3,92	3,99	4,11	4,92	4,51
Bisabololoxid B	1,03	1,09	1,09	1,13	1,15	1,20	1,20
Bisabolonoxid A	7,74	8,34	8,17	8,27	8,22	7,63	7,29
Bisabolol	8,84	9,39	9,25	9,96	9,71	8,96	8,51
Chamazulen	1,88	2,08	2,04	2,16	2,25	2,50	2,99
Bisabololoxid A	31,22	31,94	32,09	34,07	34,31	26,93	21,59
Spiroether	10,42	9,81	9,70	10,48	9,84	9,88	7,89

Tab. H-40 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den

Pressrückständen, extrahiert bei 65°C [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	24,48	25,02	27,49	31,16	37,47	- ²	- ²
Spathulenol	3,60	3,87	4,44	4,82	5,77	- ²	- ²
Bisaboloxid B	0,98	1,26	1,04	1,16	1,23	- ²	- ²
Bisablonoxid A	8,52	8,12	8,05	7,16	7,05	- ²	- ²
Bisabolol	9,84	9,45	9,50	8,66	8,68	- ²	- ²
Chamazulen	1,47	1,66	1,98	1,97	2,17	- ²	- ²
Bisaboloxid A	37,00	35,23	31,27	27,37	21,75	- ²	- ²
Spiroether	10,46	11,92	11,87	10,06	8,86	- ²	- ²

² kein Messwert**Tab. H-41 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Pressrückständen, extrahiert bei 20°C unter kontinuierlichem Rühren [%]**

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	26,16	28,39	29,09	28,56	29,36	31,33	31,04
Spathulenol	3,84	4,21	4,68	4,68	5,05	5,59	5,70
Bisaboloxid B	1,07	1,12	1,02	1,02	0,91	0,89	0,96
Bisablonoxid A	8,16	8,03	7,81	7,58	7,02	6,31	6,47
Bisabolol	9,43	9,10	8,75	8,58	8,14	6,78	6,88
Chamazulen	1,46	1,56	1,52	1,60	1,67	1,73	1,96
Bisaboloxid A	31,17	27,72	23,87	25,01	24,00	18,94	17,68
Spiroether	9,14	10,15	11,19	10,95	12,20	10,75	10,73

Tab. H-42 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls aus den Pressrückständen, extrahiert bei 35°C nach Vorbehandlung der Droge mit Ethanol (94%) [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	- ²	46,82	35,75	43,99	38,36	38,65	37,32
Spathulenol	- ²	6,06	5,75	6,18	5,78	5,36	5,28
Bisaboloxid B	- ²	1,51	1,49	1,28	1,36	1,11	1,04
Bisablonoxid A	- ²	8,14	8,88	7,33	7,92	6,15	5,08
Bisabolol	- ²	12,48	11,04	10,24	10,81	8,65	7,87
Chamazulen	- ²	3,07	2,98	2,73	3,32	3,13	3,24
Bisaboloxid A	- ²	6,51	12,19	6,29	7,49	5,45	3,80
Spiroether	- ²	1,96	3,06	2,29	2,04	1,81	1,06

² kein Messwert**Tab. H-43 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls nach Verseifung der Ölauszüge, extrahiert bei 20°C [%]**

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	10,59	11,57	12,56	11,78	11,91	11,26	13,13
Spathulenol	0,74	1,09	1,03	0,89	0,91	0,94	0,73
Bisaboloxid B	0,56	0,44	0,51	0,47	0,51	0,49	0,64
Bisablonoxid A	4,36	4,93	4,81	4,58	4,88	4,44	4,59
Bisabolol	4,01	3,88	3,72	3,82	4,34	3,91	4,06
Bisaboloxid A	42,05	47,52	46,54	43,97	47,74	41,66	44,12
Spiroether	14,69	17,83	18,73	17,10	15,85	16,38	17,71

Tab. H-44 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls nach Verseifung der Ölauszüge, extrahiert bei 35°C [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	11,88	13,00	12,67	13,36	14,21	14,31	14,66
Spathulenol	0,71	0,80	0,72	0,79	0,79	0,78	0,77
Bisabololoxid B	0,44	0,43	0,51	0,38	0,42	0,43	0,40
Bisabolonoxid A	4,92	5,12	4,71	4,74	4,79	4,65	4,57
Bisabolol	4,24	3,98	4,03	4,05	4,01	3,82	3,95
Bisabololoxid A	48,71	49,99	45,35	45,88	46,02	44,20	43,59
Spiroether	15,27	17,19	15,98	17,19	17,60	18,63	18,20

Tab. H-45 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls nach Verseifung der Ölauszüge, extrahiert bei 50°C [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	11,74	12,52	13,29	12,04	10,70	11,65	9,05
Spathulenol	0,76	0,74	0,75	0,82	0,77	0,91	0,83
Bisabololoxid B	0,51	0,77	0,42	0,57	0,44	0,68	0,36
Bisabolonoxid A	5,19	4,91	4,88	4,86	4,64	4,56	4,89
Bisabolol	4,38	3,89	4,09	4,45	4,08	3,87	4,32
Bisabololoxid A	48,57	42,57	41,25	44,55	42,31	41,81	45,85
Spiroether	18,11	17,84	19,22	21,01	21,12	22,47	22,87

Tab. H-46 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls nach Verseifung der Ölauszüge, extrahiert bei 65°C [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	9,61	9,39	9,20	9,05	10,27	– ²	– ²
Spathulenol	0,78	0,95	0,78	0,85	0,87	– ²	– ²
Bisabololoxid B	0,50	0,39	0,57	0,45	0,70	– ²	– ²
Bisabolonoxid A	5,11	4,89	4,52	4,86	4,74	– ²	– ²
Bisabolol	4,70	4,58	4,36	4,19	4,31	– ²	– ²
Bisabololoxid A	48,73	46,23	42,61	45,06	44,38	– ²	– ²
Spiroether	19,27	18,63	18,41	19,09	19,80	– ²	– ²

² kein Messwert**Tab. H-47 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls nach Verseifung der Ölauszüge, extrahiert bei 20°C unter kontinuierlichem Rühren [%]**

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	8,97	7,46	9,30	9,25	10,22	13,38	11,87
Spathulenol	0,93	0,94	0,74	0,89	0,82	0,89	0,84
Bisabololoxid B	0,66	0,58	0,51	0,66	0,64	0,60	0,56
Bisabolonoxid A	4,94	4,97	4,81	4,59	4,76	4,47	4,35
Bisabolol	5,07	4,98	4,61	4,31	4,01	3,93	4,04
Bisabololoxid A	51,95	54,41	50,75	50,12	50,80	47,49	44,23
Spiroether	12,15	11,70	12,19	12,68	13,74	15,40	14,68

Tab. H-48 Prozentuale Zusammensetzung des ätherischen Öls nach Verseifung der Ölauszüge, extrahiert bei 35°C nach Vorbehandlung der Droge mit Ethanol (94%) [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Farnesen	- ²	7,23	6,59	7,88	5,82	6,09	6,43
Spathulenol	- ²	0,86	0,84	0,88	0,89	0,89	0,85
Bisabololoxid B	- ²	0,60	0,62	0,59	0,59	0,63	0,64
Bisabolonoxid A	- ²	4,13	4,15	3,97	4,65	4,76	4,42
Bisabolol	- ²	1,93	1,97	1,84	2,46	2,36	2,15
Bisabololoxid A	- ²	41,63	42,72	40,45	45,01	46,28	42,44
Spiroether	- ²	16,82	16,80	19,72	17,73	18,76	20,70

² kein Messwert**Tab. H-49 Prozentuale Übergangsraten der phenolischen Komponenten aus den Kamillenblüten in die Ölauszüge, extrahiert bei 20°C [%]**

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Cumarine	9,74	10,08	12,47	18,87	24,57	21,58	38,37
acetylierte	2,80	3,54	4,90	6,59	8,58	8,05	14,60
Flavonoid-glycoside							
Flavonoidaglyka	2,21	3,20	4,72	4,35	5,43	6,07	7,87
methoxylierte	23,97	28,75	34,37	34,39	43,73	48,28	55,76
Flavonoidaglyka							

Tab. H-50 Prozentuale Übergangsraten der phenolischen Komponenten aus den Kamillenblüten in die Ölauszüge, extrahiert bei 35°C [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Cumarine	11,37	16,08	22,21	17,59	21,67	32,99	38,88
acetylierte	3,68	5,95	8,64	6,24	9,21	14,13	16,40
Flavonoid-glycoside							
Flavonoidaglyka	5,32	6,02	8,07	7,72	7,55	10,02	10,01
methoxylierte	39,24	45,66	51,68	48,87	54,25	63,49	62,04
Flavonoidaglyka							

Tab. H-51 Prozentuale Übergangsraten der phenolischen Komponenten aus den Kamillenblüten in die Ölauszüge, extrahiert bei 50°C [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Cumarine	21,61	32,58	40,92	50,38	60,89	88,82	98,43
acetylierte	11,04	14,55	17,56	20,56	24,38	37,81	41,27
Flavonoid-glycoside							
Flavonoidaglyka	7,72	8,98	10,83	14,60	18,75	32,49	32,15
methoxylierte	43,38	42,21	43,66	52,18	57,45	67,55	70,39
Flavonoidaglyka							

Tab. H-52 Prozentuale Übergangsraten der phenolischen Komponenten aus den Kamillenblüten in die Ölauszüge, extrahiert bei 65°C [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Cumarine	39,94	50,33	59,40	79,65	86,76	- ²	- ²
acetylierte	17,92	20,85	21,23	28,82	27,73	- ²	- ²
Flavonoid-glycoside							
Flavonoidaglyka	12,43	16,00	19,41	27,97	31,08	- ²	- ²
Methoxylierte	46,58	51,96	51,66	67,54	69,96	- ²	- ²
Flavonoidaglyka							

² kein Messwert**Tab. H-53 Prozentuale Übergangsraten der phenolischen Komponenten aus den Kamillenblüten in die Ölauszüge, extrahiert bei 20°C unter kontinuierlichem Rühren [%]**

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Cumarine	11,35	11,54	14,65	19,48	23,72	19,64	23,28
acetylierte	4,71	5,31	7,12	8,68	11,18	8,27	9,46
Flavonoid-glycoside							
Flavonoidaglyka	3,14	4,24	6,01	6,07	7,14	8,08	8,90
Methoxylierte	40,20	49,01	54,95	53,31	56,41	62,28	64,75
Flavonoidaglyka							

Tab. H-54 Prozentuale Übergangsraten der phenolischen Komponenten aus den Kamillenblüten in die Ölauszüge, extrahiert bei 35°C nach Behandlung der Droge mit Ethanol (94%) [%]

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Cumarine	- ²	37,15	46,63	54,45	63,22	72,09	75,11
acetylierte	- ²	16,99	27,62	34,29	36,98	43,75	45,65
Flavonoid-glycoside							
Flavonoidaglyka	- ²	14,77	16,31	23,00	22,96	30,86	34,92
Methoxylierte	- ²	40,62	51,02	59,01	63,41	78,91	79,44
Flavonoidaglyka							

² kein Messwert**Tab. H-55 Ermittelte Carotinoidgehalte in den Ölauszügen [mg β -Carotin/kg Droge]**

	2h	4h	12h	24h	48h	7d	14d
Ölauszug 20°C	26,3	33,9	30,5	22,0 ¹	42,1	49,1	55,7
Ölauszug 35°C	29,7	27,5	30,3	38,4	46,2	58,1	67,6
Ölauszug 50°C	25,9	30,4	35,7	40,7	45,1	51,4	59,5
Ölauszug 65°C	30,0	38,6	44,4	45,4	54,6	65,6	72,8
Ölauszug 20°C Rühren	34,3	33,6	36,6	42,7	49,5	- ²	- ²
Ölauszug 35°C +EtOH	- ²	35,4	42,1	45,5	52,1	58,1	63,1

¹ Ausreißer ² kein Messwert

GEFAHRSTOFFE

Chemikalie	CAS	Gefahrensymbol	R/S-Sätze
0,1%ige Phenolphthalein-Lösung in Ethanol	77-09-8	entzündlich	R 10
Acetanhydrid	108-24-7	entzündlich, gesundheitsschädlich, ätzend	R 10-20/22-34 S 26-36/37/39-45
Aceton p.a.	67-64-1	leicht entzündlich, reizend	R 11-36-66-67 S 9-16-26
Acetonitril	75-05-8	leicht entzündlich, gesundheitsschädlich, reizend	R 11-20/21/22-36 S 16-36/37
Aluminiumoxid 90 aktiv neutral	1344-28-1		S 22
Aluminiumoxid, neutral	1344-28-1		S 22
Ameisensäure	64-18-6	ätzend	R 35 S 23.2-26-45
Capsaicin	404-86-4]	giftig	R 25-37/38-41 S 26-36/37/39-45
Chloroform	67-66-3	gesundheitsschädlich, reizend, krebserzeugend	R 22-38-40-48/20/22 S 36/37
Chlortrimethylsilan	75-77-4	leicht entzündlich, ätzend	R 11-14-35-37 S 7/9-16-26-36/37/39-45
Dichlormethan	75-09-2	krebserzeugend	R 40 S 23.2-24/25-36/37
Diethylether	60-29-7	hochentzündlich, gesundheitsschädlich	R 12-19-22-66-67 S 9-16-29-33
Eisessig	64-19-7	entzündlich, ätzend	R 10-35 S 23.2-26-45
Ethanol	64-17-5	leicht entzündlich	R 11 S 7-16
Ethylacetat	141-78-6	leicht entzündlich, reizend	R 11-36-66-67 S 16-26-33
Extrelut NT	68855-54-9	gesundheitsschädlich	R 48/20 S 22
Furfural	98-01-1	giftig, reizend, krebserzeugend	R 21-23/25-36/37-40 S 26-36/37/39-45
Hexamethyldisilazan	999-97-3	leicht entzündlich, gesundheitsschädlich, ätzend	R 11-20/21/22-34 S 16-36/37/39-45
Hexan	110-54-3	leicht entzündlich, reizend, gesundheitsschädlich, umweltgefährlich, fortpflanzungsgefährdend	R 11-38-48/20-51/53-62-65-67 S 9-16-29-33-36/37-61-62
Kaliumhydroxid	1310-58-3	gesundheitsschädlich, ätzend	R 22-35 S 26-36/37/39-45
Kaliumjodat	7758-05-6	brandfördernd, reizend	R 8-41 S 17-26-39
Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm)	7631-86-9		S 22

Chemikalie	CAS	Gefahrensymbol	R/S-Sätze
Methanol	67-56-1	leicht entzündlich, giftig	R 11-23/24/25- 39/23/24/25 S 7-16-36/37-45
Molybdätophosphorsäure		leicht entzündlich, reizend	R 11-36/38-67 S 7-16-23.3-24-26- 51
Natriumhydroxid	1310-73-2	ätzend	R 35 S 26-37/39-45
Nonivamid	2444-46-4	giftig	R 25-36/37/38 S 26-36/37/39-45
Oxalsäure, wasserfrei	6153-56-6	gesundheitsschädlich	R 21/22 S 24/25
Petrolether (tiefsiedend)		leicht entzündlich, reizend, gesundheitsschädlich, umweltgefährlich, fortpflanzungsgefährdend	R 11-38-48/20- 51/53-62-65-67 S 16-23.2-24-33- 36/37-61-62
Pyridin	110-86-1	leicht entzündlich, gesundheitsschädlich	R 11-20/21/22 S 26-28.1
Salzsäure, 25%		ätzend	R 34-37 S 26-36/37/39-45
Santonin	481-06-1	giftig	R 22 S 22-24/25
Schwefelsäure, konz.	7664-93-9	ätzend	R 35 S 26-30-45
tert-Butyl-methylether (TBME)	1634-04-4	leicht entzündlich	R 11-66 S 16-23.2-29-33
Xylol	1330-20-7	entzündlich, gesundheitsschädlich, reizend	R 10-20/21-38 S 25

I. LITERATURVERZEICHNIS

Adler, G. und Kasprzyk, Z.

Free sterols, steryl esters, glucosides, acylated glucosides, and water-soluble complexes in *Calendula officinalis*.

Phytochemistry 14, 627-631 (1975)

Adler, G. und Kasprzyk, Z.

Distribution of triterpene alcohols in subcellular fractions from *Calendula officinalis* flowers.

Phytochemistry 15, 205-207 (1976)

Afifi, M. S. und Karawya, M. S.

Investigation of flower anthocyanin pigments of *Althea rosea* Cav. and *Malva viscosus-arborea* L. growing in Egypt.

Bulletin of Pharmaceutical Sciences, Assiut University 11, 185-195 (1988)

Aitzetmüller, K.; Brühl, L. und Fiebig, H. J.

Analysis of sterol content and composition in fats and oils by capillary-gas liquid chromatography using an internal standard. Comments on the German sterol method.

Fett/Lipid 100, 429-435 (1998)

Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Oinuma, H.; Kasahara, Y.; Yamanouchi, S.; Takido, M.; Kumaki, K. und Tamura, T.

Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects.

Phytochemistry 43, 1255-1260 (1996)

Attuquayefio, V. K. und Buckle, K. A.

Rapid sample preparation method for HPLC analysis of capsaicinoids in capsicum fruits and oleoresins.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 35, 777-779 (1987)

Bajaj, K. L.

Colorimetric determination of capsaicin in *Capsicum* fruits.
Journal - Association of Official Analytical Chemists 63, 1314-1316 (1980)

Bako, E.; Deli, J. und Toth, G.

HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products.
Journal of Biochemical and Biophysical Methods 53, 241- 250 (2002)

Basalo, C.; Mohn, T. und Hamburger, M.

Are extraction methods in quantitative assays of pharmacopoeia monographs exhaustive? A comparison with pressurized liquid extraction.
Planta Medica 72, 1157-1162 (2006)

Bender, S.

Körperpflegekunde - Körperlotionen und -öle.
2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S.106-107 (2004)

Bezbradica, D.; Milic-Askrabic, J.; Petrovic, S. D. und Siler-Marinkovic, S.

An investigation of influence of solvent on the degradation kinetics of carotenoids in oil extracts of *Calendula officinalis*.
Journal of the Serbian Chemical Society 70, 115-124 (2005)

Bicchi, C.; Brunelli, C.; Galli, M. und Sironi, A.

Conventional inner diameter short capillary columns: an approach to speeding up gas chromatographic analysis of medium complexity samples.
Journal of Chromatography A 931, 129-140 (2001)

Bicchi, C. und Rubiolo, P.

High-performance liquid chromatographic-particle beam mass spectrometric analysis of sesquiterpene lactones with different carbon skeletons.
Journal of Chromatography A 727, 211-221 (1996)

Bilia, A. R.; Salvini, D.; Mazzi, G. und Vincieri, F. F.

Characterization of calendula flower, milk-thistle fruit, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS.
Chromatographia 53, 210-215 (2001)

Blaschek, W.

Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe - Alcea.
HagerRom (Version 4.1), Springer, Berlin Heidelberg New York (2004)

Bomme, U.; Hölzl, J. und Schneider, E.

Wie beeinflusst die Sorte Wirkstoffgehalt und Ertrag von Ringelblume (*Calendula officinalis* L) im Hinblick auf die pharmazeutische Nutzung?
Herba Hungarica 29, 19-28 (1990)

Bonerz, D.; Würth, K.; Patz, C. D. und Dietrich, H.

Die "Monomerisch Index" Methode: Eine schnelle und kostengünstige Untersuchungsmethode für Anthocyanin und Anthocyaninabkömmlinge in Fruchtsäften, Naktaren, Konzentraten und Rotwein. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 102, 195-201 (2006)

Boskou, D.

Olive oil.

World Review of Nutrition and Dietetics 87(Mediterranean Diets), S. 56-77 (2000)

Carle, R.

Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe - Chamomilla.

HagerRom (Version 4.1), Springer, Berlin Heidelberg New York (2004)

Carle, R.; Fleischhauer, I. und Fehr, D.

Qualitätsbeurteilung von Kamillenölen.

Deutsche Apotheker Zeitung 127, 2451-2457 (1987)

Carle, R. und Isaac, O.

Fortschritte in der Kamillenforschung in den Jahren 1974 bis 1984.

Deutsche Apotheker Zeitung 125(Suppl. I), 2-8 (1985)

Cartoni, G.; Goretti, G.; Russo, M. V. und Zacchei, P.

Microcapillary gas chromatographic analysis of chamomile.

Annali Di Chimica (Rome, Italy) 80, 523-535 (1990)

Ceska, O.; Chaudhary, S. K.; Warrington, P. J. und Ashwood-Smith, M. J.

Coumarins of chamomile, *Chamomilla recutita*.

Fitoterapia 63, 387-394 (1992)

Cichelli, A. und Pertesana, G. P.

High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification.

Journal of Chromatography A 1046, 141-146 (2004)

Constant, H. L.; Cordell, G. A.; West, D. P. und Johnson, J. H.

Separation and quantification of capsaicinoids using complexation chromatography.

Journal of Natural Products 58, 1925-1928 (1995)

D'Amelio, F. S.

Botanical Phytocosmetic Desk Reference.

CRC Press, London (1999)

De Wasch, K.; De Brabander, H.; Impens, S.; Okerman, L. und Kamel, C.

Detection of the major components of *Capsicum* oleoresin and zingerone by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Special Publication - Royal Society of Chemistry 269 (Biologically-Active Phytochemicals in Food), 134-139 (2001)

De, F., V.; Aquino, R.; Menghini, A.; Ramundo, E. und Senatore, F.

Traditional phytotherapy in the Peninsula Sorrentina, Campania, southern Italy.
Journal of Ethnopharmacology 36, 113-125 (1992)

Diemunsch, A. M. und Mathis, C.

Preparation and control of plant extracts for cosmetic use.
Labo-Pharma - Problemes et Techniques 28(294), 55-63 (1980)

Dolman, D. M.; Knight, D. W.; Salan, U. und Toplis, D.

A quantitative method for the estimation of parthenolide and other sesquiterpene lactones containing a-methylenebutyrolactone functions present in feverfew, *Tanacetum parthenium*.
Phytochemical Analysis 3, 26-31 (1992)

Douglas, J. A.; Smallfield, B. M.; Burgess, E. J.; Perry, N. B.; Anderson, R. E.; Douglas, M. H. und Glennie, V. L.

Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: a rapid analytical method and the effects of flower maturity and simulated mechanical harvesting on quality and yield.
Planta Medica 70, 166-170 (2004)

Europäisches Arzneibuch (Ph.Eur.)

5. Ausgabe mit Nachträgen, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (2005 - 2007)

Feng, S. I.; Hu, F. d. und Zhao, J. x.

Determination of seven compounds in *Tang Maikang* granule by high-performance liquid chromatography.
Journal of Chromatographic Science 43, 522-525 (2005)

Feng, Y.; Xu, L.; Yang, S. und Zou, Z.

Chemical constituents isolated from flowers of *Althaea rosea* L.
Zhongcaoyao 36, 1610-1612 (2005)

Flamini, G.; Cioni, P. L. und Morelli, I.

Volatiles from leaves, fruits, and virgin oil from *Olea europaea* cv. Olivastra Seggianese from Italy.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 1382-1386 (2003)

Folin, O. und Denis, W.

A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine.
Journal of Biological Chemistry 22, 305-308 (1915)

Fonseca, F. N. und Tavares, M. F. M.

Validation of a capillary electrophoresis method for the quantitative determination of free and total apigenin in extracts of *Chamomilla recutita*.
Phytochemical Analysis 15, 65-70 (2004)

Fonseca, F. N.; Kato, M. J.; Oliveira, L., Jr.; Pinto Neto, N. und Tavares, M. F. M.

Critical assessment of electrolyte systems for the capillary electrophoresis analysis of phenolic compounds in herbal extracts.
Journal of Microcolumn Separations 13, 227-235 (2001)

Franz, G.; Bauer, R.; Blaschek, W.; Hamacher, H. und Nahrstedt, A.

Zukunftsperspektiven für pflanzliche Extrakte .
Pharmazeutische Zeitung - Online-Archiv 146, S. (2001)

Frohne, D. und Pfänder, H. J.

Giftpflanzen -Ein Handbuch für Apotheker, Ärzte, Toxikologen und Biologen.
4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2004)

Fujiwake, H.; Suzuki, T. und Iwai, K.

Formation and metabolism of the pungent principle of *Capsicum* fruits. Part VIII. Intracellular localization of capsaicin and its analogs in *Capsicum* fruit. II. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit.
Plant and Cell Physiology 21, 1023-1030 (1980)

Gerst, N.; Ruan, B.; Pang, J.; Wilson, W. K. und Schroepfer, G. J., Jr.

An updated look at the analysis of unsaturated C27 sterols by gas chromatography and mass spectrometry.
Journal of Lipid Research 38, 1685-1701 (1997)

Gibbs, H. A. A. und O'Garro, L. W.

Capsaicin content of West Indies hot pepper cultivars using colorimetric and chromatographic techniques.
Horticultural Science 39, 132-135 (2004)

Giesselmann, G. und Müller, H.

Simplified analysis of chamomile drugs.
Pharmazeutische Industrie 63, 516-519 (2001)

Gimeno, E.; Castellote, A. I.; Lamuela-Raventos, R. M.; De la Torre, M. C. und Lopez-Sabater, M. C.

The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil.
Food Chemistry 78, 207-211 (2002)

Gomez-Alonso, S.; Salvador, M. D. und Fregapane, G.

Phenolic compounds profile of cornicabra virgin olive oil.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 6812-6817 (2002)

Gora, J.; Kalemba, D.; Kurowska, A. und Swiatek, L.

Chemical substances from inflorescences of *Arnica montana* L. and *Calendula officinalis* L. soluble in isopropyl myristate and propylene glycol.
Herba Hungarica 19, 165-171 (1980)

Haas, K.; Bauer, M. und Wollenweber, E.

Cuticular waxes and flavonol aglycons of mistletoes.
Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences 58, 464 -470 (2003)

Hamburger, M.; Adler, S.; Baumann, D.; Forg, A. und Weinreich, B.

Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*).

Fitoterapia 74, 328-338 (2003)

Hangya, G. und Kelen, A.

Investigation of medical and cosmetic products containing Marigold flower extracts, with special respect to detergents.

Olaj, Szappan, Kozmetika 50, 183-188 (2001)

Harborne, J. B. und Williams, C. A.

Advances in flavonoid research since 1992.

Phytochemistry 55, 481-504 (2000)

Harborne, J. B. und Williams, C. A.

Anthocyanins and other flavonoids.

Natural Product Reports 18, 310-333 (2001)

Harborne, J. B.

The natural distribution in angiosperms of anthocyanins acylated with aliphatic dicarboxylic acids.

Phytochemistry 25, 1887-1894 (1986)

Hausen, B. M. und Vieluf, I. K.

Pflanzenmonographien von A-Z: *Arnica montana* L. In: Allergiepflanzen – Pflanzenallergene, 2. Auflage, ecomed Verlagsgesellschaft mbH, Landsberg/München S. 74-77 (1997a)

Hausen, B. M. und Vieluf, I. K.

Pflanzenmonographien von A-Z: *Calendula officinalis* L. In: Allergiepflanzen – Pflanzenallergene, 2. Auflage, ecomed Verlagsgesellschaft mbH, Landsberg/München S. 85-87 (1997b)

Hausen, B. M. und Vieluf, I. K.

Pflanzenmonographien von A-Z: *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. In: Allergiepflanzen – Pflanzenallergene, 2. Auflage, ecomed Verlagsgesellschaft mbH Landsberg/München S. 91-93 (1997c)

Hawer, W. S.; Ha, J.; Hwang, J. und Nam, Y.

Effective separation and quantitative analysis of major heat principles in red pepper by capillary gas chromatography.

Food Chemistry 49, 99-103 (1993)

Hänsel, R. und Sticher, O.

Pharmakognosie - Phytopharmazie.

8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (2007)

Heisig, W.

Methodenentwicklung zur Identitätsprüfung pflanzlicher Drogen.

Dissertation Marburg (1991)

Heldmaier, M. und Stahl-Biskup, E.

Extraction with olive oil.

Deutsche Apotheker Zeitung 146, 52-57 (2006)

Henrique Dos Santos, O. D.; Miotto, J. V.; Moreira De Morais, J.; Alves Da Rocha-Filho, P. und Pereira De Oliveira, W.

Attainment of emulsions with liquid crystal from Marigold oil using the required HLB method.

Journal of Dispersion Science and Technology 26, 243-249 (2005)

Hiepler, C.

Capsaicinoide in *Capsicum*-Früchten definierter Herkunft und ihre Stabilität bei Verarbeitung und Lagerung.

Dissertation Wuppertal (2004)

Homöopatisches Arzneibuch (HAB 2006)

Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (2006)

Informationsgemeinschaft Olivenöl

<http://www.olivenoel-info.de/index.html> (2007)

International Olive Council

Trade Standard applying to olive oil and olive pomace oil.

COI/T. 15/NC No. 3, Rev. 2 (2006)

Isaac, O.

Die Ringelblume - Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mgH, Stuttgart (1992)

Iwai, K.; Suzuki, T.; Fujiwake, H. und Oka, S.

Simultaneous microdetermination of capsaicin and its four analogs by using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.

Journal of Chromatography 172, 303-311 (1979)

Janiszowska, W. und Kasprzyk, Z.

Intracellular distribution and origin of sterols in *Calendula officinalis* leaves.

Phytochemistry 16, 473-476 (1977)

Johnson, E. K.; Thompson, H. C., Jr. und Bowman, M. C.

Trace analysis of natural capsaicinoids in animal feed, human urine, and wastewater by high-pressure liquid chromatography.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 30, 324-329 (1982)

Junge, F.; Junge, W. und Roemer, F.

Das Öldispersionsbad.

Wala Med - Information Für Ärzte, Herbst, 5-7 (1998)

Jurenitsch, J.; David, M.; Heresch, F. und Kubelka, W.

Detection and identification of new pungent compounds in fruits of *Capsicum*.
Planta Medica 36, 61-67 (1979)

Jurenitsch, J. und Leinmueller, R.

Quantification of nonyllic acid vanillyl amide and other capsaicinoids in the pungent principle of *Capsicum* fruits and preparations by gas-liquid chromatography on glass capillary columns.
Journal of Chromatography 189, 389-397 (1980)

Kaale, E.; Van Schepdael, A.; Roets, E. und Hoogmartens, J.

Determination of capsaicinoids in topical cream by liquid-liquid extraction and liquid chromatography.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30, 1331-1337 (2002)

Karnka, R.; Rayanakorn, M.; Watanesk, S. und Vaneesorn, Y.

Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method.
Analytical Sciences 18, 661-665 (2002)

Kasprzyk, Z.; Grzelczak, Z. und Pyrek, J.

Thin-layer chromatographic characterization of ether-soluble terpenoid compounds in plants of the Compositae family.
Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, Serie Biologiques 13, 661-665 (1965)

Kasprzyk, Z. und Kozirowska, T.

Distribution of sterols and triterpenic alcohols in plants of the Compositae family.
Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, Serie Biologiques 14, 645-649 (1966)

Kasprzyk, Z.; Pyrek, J. und Turowska, G.

The variations of free and bound sterols in *Calendula officinalis* during growth.
Acta Biochimica Polonica 15, 149-159 (1968)

Kasprzyk, Z. und Pyrek, J.

Sterols of five plants of the Compositae family.
Roczniki Chemii 41, 201-208 (1967)

Kasprzyk, Z. und Pyrek, J.

Triterpenic alcohols of *Calendula officinalis* flowers.
Phytochemistry 7, 1631-1639 (1968)

Kasprzyk, Z.; Pyrek, J. und Sliwowski, J.

Free and ester-bound methyl sterols and triterpenic monools in *Calendula officinalis*.
Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, Serie Biologiques 15, 723-726 (1967)

Kasprzyk, Z.; Sliwowski, J. und Boleslawska-Kokosza, D.

The variations of triterpenoids in germinating seeds of *Calendula officinalis*.
Acta Biochimica Polonica 17, 11-18 (1970)

Kohlmünzer, S.; Konska, G. und Wiatr, E.

Anthocyanosides of *Alcea rosea* L. var. *nigra* as vasoprotective agents.
Herba Hungarica 22, 13-23 (1983)

Korel, F.; Bagdatlioglu, N.; Balaban, M. O. und Hisil, Y.

Ground red peppers: capsaicinoids content, scoville scores, and discrimination by an electronic nose.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 3257-3261 (2002)

Kos, O.; Lindenmeyer, M. T.; Tubaro, A.; Sosa, S. und Merfort, I.

New sesquiterpene lactones from arnica tincture prepared from fresh flower heads of *Arnica montana*.
Planta Medica 71, 1044-1052 (2005)

Kozukue, N.; Han, J. S.; Kozukue, E.; Lee, S. J.; Kim, J. A.; Lee, K. R.; Levin, C. E. und Friedman, M.

Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 9172-9181 (2005)

Kunde, R. und Isaac, O.

Flavones of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and a new acetylated apigenin-7-glucoside.
Planta Medica 37, 124-130 (1979)

Ladislav, F.; Vera, P.; Karel, S. und Karel, V.

Reliability of carotenoid analyses: a review.
Current Analytical Chemistry 1, 93-102 (2005)

Lee, H. S.; Eom, Y. E. und Eom, D. O.

Narrowbore high performance liquid chromatography of berberine and palmatine in crude drugs and pharmaceuticals with ion-pair extraction using cobalt thiocyanate reagent.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 21, 59-63 (1999)

Leven, W. und Willuhn, G.

Sesquiterpene lactones from *Arnica chamissonis* Less. VI. Identification and quantitative determination by high-performance liquid and gas chromatography.
Journal of Chromatography 410, 329-342 (1987)

Lu, T.; Liang, Y.; Song, J.; Xie, L.; Wang, G. J. und Liu, X. D.

Simultaneous determination of berberine and palmatine in rat plasma by HPLC-ESI-MS after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Huang-Lian-Jie-Du decoction and the pharmacokinetic application of the method.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 40, 1218-1224 (2006)

Magiatis, P.; Michaelakis, A.; Skaltsounis, A. L. und Haroutounian, S. A.

Volatile secondary metabolite pattern of callus cultures of *Chamomilla recutita*.
Natural Product Letters 15, 125-130 (2001)

Magni, P.; Facchetti, R.; Cadoppi, A.; Pigozzo, F. und Brunelli, C.

Analysis of essential oils by ultra fast GC: an effective technique for 30-fold speed increase.
LC-GC Europe (Applications Book), 59 (2004)

Manirakiza, P.; Covaci, A. und Schepens, P.

Pungency principles in *Capsicum* - analytical determination and toxicology
In *Capsicum* - The genus *Capsicum*, ed. De, A.K., Taylor & Francis, London New York, S. (2003)

Martinez, S. und Buchwald-Werner, S.

New cosmetic application concepts of vegetal actives.
Comunicaciones Presentadas a Las Jornadas Del Comite Espanol De La Detergencia 33, 83-95 (2003)

Massart, D. L. und Vander Heyden, Y.

From tables to visuals: principal component analysis, Part 1.
LC-GC Europe 17, 586-591 (2004)

Mateos, R.; Dominguez, M. M.; Espartero, J. L. und Cert, A.

Antioxidant effect of phenolic compounds, α -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 7170-7175 (2003)

Matlawska, I.

Flavonoids in the flowers of *Althaea rosea* Cav. var. *nigra* (Malvaceae).
Herba Polonica 38, 163-172 (1992)

Merfort, I.

Heil- und Nutzpflanzen mit Haut-Tücken.
Pharmazeutische Zeitung 147, 96-101 (2001)

Merfort, I.

Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones.
Journal of Chromatography A 967, 115-130 (2002)

Merfort, I.; Pietta, P. G.; Mauri, P. L.; Zini, L.; Catalano, G. und Willuhn, G.

Separation of sesquiterpene lactones from Arnicae flos DAB 10 by micellar electrokinetic chromatography.
Phytochemical Analysis 8, 5-8 (1997)

Mikhailovna, A. A. und Savinov, B. G.

Solubility of carotene in vegetable oils.
Ukrains'Kii Khemichnii Zhurnal 16, 183-187 (1950)

Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M. und Miniati, E.

Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 40, 1571-1576 (1992)

Mulinacci, N.; Romani, A.; Pinelli, P.; Vincieri, F. F. und Prucher, D.

Characterization of *Matricaria recutita* L. flower extracts by HPLC-MS and HPLC-DAD analysis.
Chromatographia 51, 301-307 (2000)

Neukirch, H.; D'Ambrosio, M.; Dalla Via, J. und Guerriero, A.

Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester.
Phytochemical Analysis 15, 30-35 (2004)

Otakulov, M. K.; Salikhov, S. A. und Saidova, T. T.

Hollyhock pigments.
Pishchevaya Promyshlennost (Moscow, Russian Federation) 9, 43-44 (1989)

Perbellini, L.; Gottardo, R.; Caprini, A.; Bortolotti, F.; Mariotto, S. und Tagliaro, F.

Determination of alpha-bisabolol in human blood by micro-HPLC-ion trap MS and head space-GC-MS methods.
Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 812, 373-377 (2004)

Perkins, B.; Bushway, R.; Guthrie, K.; Fan, T.; Stewart, B.; Prince, A. und Williams, M.

Determination of capsaicinoids in salsa by liquid chromatography and enzyme immunoassay.
Journal of AOAC International 85, 82-85 (2002)

Petcu, P. und Goina, T.

Extraction of alkaloids from *Berberis vulgaris*.
Planta Medica 18, 372-375 (1970)

Peusch, M.; Müller-Seitz, E.; Petz, M.; Müller, A. und Anklam, E.

Extraction of capsaicinoids from chillies (*Capsicum frutescens*) and paprika (*Capsicum annuum*) using supercritical fluids and organic solvents.
Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A: Food Research and Technology 204, 351-355 (1997)

Piccaglia, R. und Venturi, G.

Dye plants: a renewable source of natural colors.
Agro-Food-Industry Hi-Tech 9, 27-30 (1998)

Piccaglia, R.; Marotti, M.; Chiavari, G. und Gandini, N.

Effects of harvesting date and climate on the flavonoid and carotenoid contents of marigold (*Calendula officinalis* L.).
Flavour and Fragrance Journal 12, 85-90 (1997)

Pietta, P. G.; Mauri, P. L.; Bruno, A. und Merfort, I.

MEKC as an improved method to detect falsifications in the flowers of *Arnica montana* and *A. chamissonis*.
Planta Medica 60, 369-372 (1994)

Pino, J. A.; Bayat, F.; Marbot, R. und Aguero, J.

Essential oil of chamomile *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. from Iran.
Journal of Essential Oil Research 14, 407-408 (2002)

Pitea, M.

Quantitative determination of the alkaloids of *Berberis vulgaris*.
Planta Medica 27, 213-216 (1975)

Pitea, M.; Petcu, P.; Goina, T. und Preda, N.

Thin-layer chromatographic study of the alkaloids of *Berberis vulgaris*.
Planta Medica 21, 177-181 (1972)

Pruthi, J. S.

Chemistry and quality control of *Capsicum* and *Capsicum* products.
In *Capsicum - The genus Capsicum*, ed. De, A.K., Taylor & Francis, London New York, S. (2003)

Pyrek, J. S.

Terpene of compositae plants. Part IX. Structure of two new γ -taraxene derivatives: heliantriols C and F. Mass spectrometry of 16-substituted ψ -taraxenes.
Polish Journal of Chemistry 53, 1071-1084 (1979)

Rakhimkhanov, Z. B.; Karimdzhanov, A. K.; Ismailov, A. I. und Mukhamedova, F. K.

Red food colorings from plants.
Uzbekskii Khimicheskii Zhurnal 5, 46-49 (1983)

Redaelli, C.; Formentini, L. und Santaniello, E.

Reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of apigenin and its glucosides in flowers of *Matricaria chamomilla* and chamomile extracts.
Planta Medica 42, 288-292 (1981a)

Redaelli, C.; Formentini, L. und Santaniello, E.

HPLC determination of coumarins in *Matricaria chamomilla*.
Planta Medica 43, 412-413 (1981b)

Reichling, J.; Becker, H. und Beiderbeck, R.

Vergleichende Untersuchungen über sekundäre Inhaltstoffe bei Pflanzentumoren, Blüten, Kraut und Wurzel von *Matricaria chamomilla* L.
Planta Medica 36, 322-332 (1979a)

Reichling, J.; Becker, H.; Exner, J. und Draeger, P. D.

Comparative studies of various commercial samples of *Matricaria* flowers. Essential oil, flavonoids, coumarins, phenolic acids and plant protectant residues.
Pharmazeutische Zeitung 124, 1998-2005 (1979b)

Reilly, C. A.; Crouch, D. J.; Yost, G. S. und Fatah, A. A.

Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
Journal of Chromatography A 912, 259-267 (2001)

Repcak, M.; Imrich, J. und Garcar, J.

Quantitative evaluation of the main sesquiterpenes and polyacetylenes of *Chamomilla recutita* essential oil by high-performance liquid chromatography.
Phytochemical Analysis 10, 335-338 (1999a)

Repcak, M.; Svehlikova, V.; Imrich, J. und Pihlaja, K.

Jaceidin and chrysosplenetin chemotypes of *Chamomilla recutita* L. Rauschert.
Biochemical Systematics and Ecology 27, 727-732 (1999b)

Reznicek, G. und Zitterl-Eglseer, K.

Quantitative determination of the faradiol esters in marigold flowers and extracts.
Scientia Pharmaceutica 71, 121-128 (2003)

Rubiolo, P.; Belliardo, F.; Cordero, C.; Liberto, E.; Sgorbini, B. und Bicchi, C.

Headspace-solid-phase microextraction fast GC in combination with principal component analysis as a tool to classify different chemotypes of chamomile flower-heads (*Matricaria recutita* L.).
Phytochemical Analysis 17, 217-225 (2006)

Rücker, G.

Substanzen in Ölextrakten aus Arnika.
Scientia Pharmaceutica 38, 255-258 (1970)

Santamaria, R. I.; Reyes-Duarte, M. D. ; Barzana, E.; Fernando, D.; Gama, F. M.; Mota, M. und Lopez-Munguia, A.

Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicum annum* L.) using ethanol as solvent.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 3063-3067 (2000)

Sato, K.; Sasaki, S. S.; Goda, Y.; Yamada, T.; Nunomura, O.; Ishikawa, K. und Maitani, T.

Direct connection of supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography as a rapid quantitative method for capsaicinoids in placentas of *Capsicum*.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 4665-4668 (1999)

Scalia, S.; Giuffreda, L. und Pallado, P.

Analytical and preparative supercritical fluid extraction of *Chamomile* flowers and its comparison with conventional methods.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 21, 549-558 (1999)

Schilcher, H.

Qualitative Bewertung von Kamillenblüten oder Kamillenöl. I. Quantitative Untersuchung des ätherischen Öls in Chamomillae flos.
Deutsche Apotheker Zeitung 112, 1497-1500 (1972)

Schilcher, H.

Die Kamille - Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mgH, Stuttgart (1987)

Schilcher, H.

Wirkungsweise und Anwendungsformen der Kamillenblüten.
BMV Berliner Medizinische Verlagsanstalt GmbH (2004)

Schilcher, H.; Imming, P. und Goeters, S.

Active chemical constituents of *Matricaria chamomilla* L. syn. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert.
In: Medicinal and Aromatic Plants--Industrial Profiles 42 (Chamomile), S. 55 -76 (2005a)

Schilcher, H.; Imming, P. und Goeters, S.

Chemical analysis of the active principles of chamomile.
In: Medicinal and Aromatic Plants--Industrial Profiles 42 (Chamomile), S. 221-244 (2005b)

Schmidt, P. C.; Weibler, K. und Soyke, B.

Kamillenblüten und –extrakt: Bestimmung von Matricin und Chamazulen - ein Vergleich von GC, HPLC und photometrischen Methoden.
Deutsche Apotheker Zeitung 131, 175-181 (1991)

Schmidt, T. J. und Willuhn, G.

Sesquiterpene lactone and flavonoid variability of the *Arnica angustifolia* aggregate (Asteraceae).
Biochemical Systematics and Ecology 28 , 133-142 (2000)

Schulz, H.

Identifizierung von Inhaltsstoffen aus Kamillenextrakten mittels HPLC.
Dragoco Report 1992, 59-70 (1992)

Schulz, H. und Albroseheit, G.

High-performance liquid chromatographic characterization of some medical plant extracts used in cosmetic formulas.
Journal of Chromatography 442, 353-361 (1988)

Schweiggert, U.; Carle, R. und Schieber, A.

Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.
Analytica Chimica Acta 557, 236-244 (2006)

Scoville, W. L.

Note on Capsicums.
Journal of the American Pharmaceutical Association 1, 453-454 (1912)

Seppanen, C. M.; Rahmani, M. und Csallany, A. S.

Simultaneous determination of chlorophylls, pheophytins, β -carotene, tocopherols, and tocotrienols in olive and soybean oils by high-performance liquid chromatography.
Journal of Food Science 68, 1644-1647 (2003)

Sliwowski, J. und Kasprzyk, Z.

Stereospecificity of sterol biosynthesis in *Calendula officinalis* flowers.
Phytochemistry 13, 1451-1457 (1974)

Soldner, U. und Soldner, G.

Ölanwendungen in der Krankenpflege und ärztlichen Praxis.
Wala Med - Information Für Ärzte, Herbst 1998, 2-5 (1998)

Stevenson, R.

Some constituents of *Calendula officinalis*.
Journal of Organic Chemistry 26, 5228-5230 (1961)

Stuppner, H.; Huber, M. und Bauer, R.

Untersuchung des ätherischen Öls aus Kamillenpräparaten – Headspace-Gaschromatographie.
PZ Wissenschaft 6, 46-49 (1993)

Sturm, S. und Stuppner, H.

Analysis of isoquinoline alkaloids in medicinal plants by capillary electrophoresis - mass spectrometry.
Electrophoresis 19, 3026-3032 (1998)

Su, Q.; Rowley, K. G.; Itsiopoulos, C. und O'Dea, K.

Identification and quantitation of major carotenoids in selected components of the Mediterranean diet: green leafy vegetables, figs and olive oil.
European Journal of Clinical Nutrition 56, 1149-1154 (2002a)

Su, Q.; Rowley, K. G. und Balazs, N. D. H.

Carotenoids: separation methods applicable to biological samples.
Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 781, 393-418 (2002b)

Suau, R.; Rico, R.; Lopez-Romero, J. M.; Najera, F. und Cuevas, A.

Isoquinoline alkaloids from *Berberis vulgaris* subsp. *australis*.
Phytochemistry 49, 2545-2549 (1998)

Svehlikova, V.; Bennett, R. N.; Mellon, F. A.; Needs, P. W.; Piacente, S.; Kroon, P. A. und Bao, Y.

Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert).
Phytochemistry 65, 2323-2332 (2004)

Teuscher, E.; Melzig, M. F. und Lindequist, U.

Biogene Arzneimittel.
6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2004)

Thomas, B. V.; Schreiber, A. A. und Weisskopf, C. P.

Simple method for quantitation of capsaicinoids in peppers using capillary gas chromatography.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 2655-2663 (1998)

Thompson, R. Q.; Phinney, K. W.; Sander, L. C. und Welch, M. J.

Reversed-phase liquid chromatography and argentation chromatography of the minor capsaicinoids.
Analytical and Bioanalytical Chemistry 381, 1432-1440 (2005a)

Thompson, R. Q.; Phinney, K. W.; Welch, M. J. und White, V.

Quantitative determination of capsaicinoids by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 381, 1441-1451 (2005b)

Timberlake, C. F. und Bridle, P.

The anthocyanins.
Flavonoids 1, 214-266 (1975)

Todd, P. H., Jr.; Bensinger, M. G. und Biftu, T.

Determination of pungency due to *Capsicum* by gas-liquid chromatography. Journal of Food Science 42, 660-5, 680 (1977)

Unger, M. und Stöckigt, J.

Improved detection of alkaloids in crude extracts applying capillary electrophoresis with field amplified sample injection.
Journal of Chromatography A 791, 323-331 (1997)

Vichi, S.; Pizzale, L.; Conte, L. S.; Buxaderas, S. und Lopez-Tamames, E.

Solid-phase microextraction in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: modifications induced by oxidation and suitable markers of oxidative status.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 6564-6571 (2003)

Vidal-Ollivier, E.; Balansard, G.; Faure, R. und Babadjamian, A.

Revised structures of triterpenoid saponins from the flowers of *Calendula officinalis*.
Journal of Natural Products 52, 1156-1159 (1989a)

Vidal-Ollivier, E.; Elias, R.; Faure, F.; Babadjamian, A.; Crespin, F.; Balansard, G. und Boudon, G.

Flavonol glycosides from *Calendula officinalis* flowers.
Planta Medica 55, 73-74 (1989b)

Villinski, J. R.; Dumas, E. R.; Chai, H. B.; Pezzuto, J. M.; Angerhofer, C. K. und Gafner, S.

Antibacterial activity and alkaloid content of *Berberis thunbergii*, *Berberis vulgaris* and *Hydrastis canadensis*.
Pharmaceutical Biology (Lisse, Netherlands) 41, 551-557 (2003)

Visioli, F. und Galli, C.

Olive oil phenols and their potential effects on human health.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 4292-4296 (1998)

Visioli, F.; Poli, A. und Galli, C.

Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil.
Medicinal Research Reviews 22, 65-75 (2001)

Vogelsang, K.

Ringelblume - Sanfte Pflege für die Haut.
Pharmazeutische Zeitung 21 (Supplemental PTA-Forum 5), 22-24 (2006)

Weber, H. A.; Zart, M. K.; Ferguson, S. L.; Greaves, J. G.; Clark, A. P.; Harris, R. K.; Overstreet, J. D. und Smith, C.

Separation and quantitation of isoquinoline alkaloids occurring in goldenseal.
Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 24, 87-95 (2001)

Weber, H. A.; Zart, M. K.; Hodges, A. E.; Molloy, H. M.; O'Brien, B. M.; Moody, L. A.; Clark, A. P.; Harris, R. K.; Overstreet, J. D. und Smith, C. S.

Chemical comparison of goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) root powder from three commercial suppliers.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 7352-7358 (2003)

Weidenhamer, J. D.; Jordan, E. D. und Fischer, N. H.

Evaluation of high-performance liquid and capillary gas chromatography for analysis of sesquiterpene lactones of the Melampodiinae.
Journal of Chromatography 504, 151-161 (1990)

Wilkomirski, B.

Pentacyclic triterpene triols from *Calendula officinalis* flowers.
Phytochemistry 24, 3066-3067 (1985a)

Wilkomirski, B.

Thin-layer and gas-liquid chromatographic separation of trihydroxy pentacyclic triterpene alcohols from *Calendula officinalis* flowers.
Journal of Chromatography 330, 177-179 (1985b)

Wilkomirski, B. und Kasprzyk, Z.

Gas-liquid chromatographic separation of oxidation products of triterpene pentacyclic alcohols.
Journal of Chromatography 129, 440-443 (1976)

Wilkomirski, B. und Kasprzyk, Z.

Free and ester-bound triterpene alcohols and sterols in cellular subfractions of *Calendula officinalis* flowers.
Phytochemistry 18, 253-255 (1979)

Williams, C. M. und Mander, L. N.

Chromatography with silver nitrate.
Tetrahedron 57, 425-447 (2001)

Willuhn, G.

Arnika-Kontaktdermatitis und die verursachenden Kontaktallergene.
Deutsche Apotheker Zeitung 126, 2038-2044 (1986)

Willuhn, G.

Arnika montana - Portrait einer Arzneipflanze.
Pharmazeutische Zeitung 136, 9-24 (1991)

Willuhn, G.

Arnica flowers: pharmacology, toxicology, and analysis of the sesquiterpene lactones - their main active substances.

ACS Symposium Series 691(Phytomedicines of Europe), 118-132 (1998)

Willuhn, G. und Leven, W.

Zur qualitative und quantitative Analyse der Sesquiterpenlactone von Arnikablüten DAB 9.

PZ Wissenschaft 4, 32-39 (1991)

Willuhn, G.; Leven, W. und Luley, C.

Arnikablüten DAB 10: Qualitative und quantitative Untersuchung der Variabilität von Sesquiterpenlactonen in offizinellen Arnikadrogen.

Deutsche Apotheker Zeitung 134, 49-55 (1994)

Willuhn, G.; Roettger, P. M. und Matthiesen, U.

Helénalin and 11,13-dihydrohelenalin esters from flowers of *Arnica montana*.

Planta Medica 49, 226-231 (1983)

Wojciechowski, Z.; Bochenska-Hryniewicz, M.; Kucharczak, B. und Kasprzyk, Z.

Sterol and triterpene alcohol esters from *Calendula officinalis*.

Phytochemistry 11, 1165-1168 (1972)

Wu, W.; Song, F.; Yan, C.; Liu, Z. und Liu, S.

Structural analyses of protoberberine alkaloids in medicine herbs by using ESI-FT-ICR-MS and HPLC-ESI-MSⁿ.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37, 437-446 (2005)

Zeh, K.

Nostalgie oder zeitgemäße Alternative.

Pharmazeutische Zeitung, Supplement 05/2004, 6-10 (2004)

Zitterl-Eglseer, K.; Novak, J. und Franz, C.

Content of triterpenediol esters in *Calendula officinalis* L.

Beiträge zur Züchtungsforschung 2, 372-373 (1996)

Zitterl-Eglseer, K.; Reznicek, G.; Jurenitsch, J.; Novak, J.; Zitterl, W. und Franz, C.

Morphogenetic variability of faradiol monoesters in marigold *Calendula officinalis* L.

Phytochemical Analysis 12, 199-201 (2001)

LEBENS LAUF

MICHAEL HELDMAIER

Diplom-Lebensmittelchemiker, staatl. geprüft

*** 24.06.1976 in Böblingen**

WERDEGANG

1986 – 1995

Naturwissenschaftliches Gymnasium in Holzgerlingen

1995 – 1996

Zivildienst im Kreiskrankenhaus Böblingen

1996 – 1999

Grundstudium Lebensmittelchemie, Universität Stuttgart

1999 – 2001

Hauptstudium Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim

07.2001 – 04.2002

Diplomarbeit am Institut für Lebensmitteltechnologie, der Universität Hohenheim bei Herrn Prof. Dr. R. Carle: „Chemische Charakterisierung von Wertstoffen in Apfeltrester“

05.2002 – 04.2003

Praktisches Jahr am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt in Karlsruhe

BERUFSPRAXIS

08.2000 – 11.2000

Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Lebensmittelchemie und Analytische Chemie der Universität Hohenheim bei Herrn Prof. Dr. W. Schwack

06.2003 – 09.2003

Mitarbeiter der Gesellschaft für Bioanalytik in Hamburg

10.2003 – dato

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie, Abt. pharmazeutische Biologie der Universität Hamburg bei Frau Prof. Dr. E. Stahl-Biskup

PUBLIKATIONEN

Vegetable oil extracts of herbal drugs. Posterpräsentation auf der GA-Tagung in Florenz (2005)

Extraktion mit Olivenöl – was geben Blütendrogen her? Deutsche Apotheker Zeitung 146: 52 – 57 (2006)

Oil extracts of herbal drugs – optimisation of the extraction parameters. (zur Veröffentlichung eingereicht)